

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
DÉBORA GONÇALVES DA SILVA

**DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA:
IMPLICAÇÕES FISIOPATOLÓGICAS DA SENESCÊNCIA CELULAR
E DESAFIOS DIAGNÓSTICOS E TERAPÊUTICOS**

BRASÍLIA

2022

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
DÉBORA GONÇALVES DA SILVA

**DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA:
IMPLICAÇÕES FISIOPATOLÓGICAS DA SENESCÊNCIA CELULAR
E DESAFIOS DIAGNÓSTICOS E TERAPÊUTICOS**

Tese apresentada como requisito para a obtenção do Título de Doutora em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Área de Concentração: Fisiopatologia Médica

Orientadora: Prof. Dra. Angélica Amorim Amato

BRASÍLIA

2022

DÉBORA GONÇALVES DA SILVA

**DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA:
IMPLICAÇÕES FISIOPATOLÓGICAS DA SENESCÊNCIA CELULAR
E DESAFIOS DIAGNÓSTICOS E TERAPÊUTICOS**

**Tese apresentada como requisito
para a obtenção do Título de Doutora
em Ciências da Saúde pelo Programa
de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde da Universidade de Brasília.**

Aprovado em: 04 de julho de 2022

BANCA EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dra. Angélica Amorim Amato

Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade de Brasília

Prof. Dr. Luiz Augusto Casulari Roxo da Motta

Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade de Brasília

Prof. Dr. Paulo Augusto Carvalho de Miranda

Centro Universitário de Belo Horizonte – MG

Prof. Dra Lara Benigno Porto Dantas

Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal (SES-DF) – Hospital
Regional de Taguatinga

Prof. Dra Carolina Martins Ribeiro (suplente)

Ministério da Saúde

DEDICATÓRIA

À minha pequena Clara, que trouxe luz a essa escrita e alegria renovada aos meus dias.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me fortaleceu no empenho e dedicação à pesquisa e estudos.

Agradeço a perseverança do meu marido Heverton na compreensão das ausências e impaciências.

Agradeço aos meus pais, minha irmã e sobrinhos pelo amor e compreensão.

Agradeço especialmente a minha orientadora Angélica Amorim Amato pelo altruísmo, disponibilidade e elevada integração entre a capacidade intelectual e humana para orientar.

Agradeço a coordenação do Centro Universitário Atenas, em especial aos professores Delander Neiva e Marcos Buzinaro, pela abertura à pesquisa e apoio financeiro, pessoal e intelectual.

Agradeço a Eva Márcia do Laboratório Paulo Netto em João Pinheiro e Fernando do Laboratório Bioclínica em Paracatu pela parceria na coleta e processamento dos resultados e ao Deniel da Clínica Vitta em Paracatu pelo empenho na realização das imagens.

Agradeço a cada colega médico que encaminha os pacientes para a pesquisa.

Agradeço aos agora médicos Josué e Beatriz que se empenharam na busca e contato com os pacientes e se dedicam a vida científica com sagacidade e leveza.

Agradeço à família que me acolheu em Brasília, vocês são especiais: Orlinda, Antônio, Daniele e Isabela.

Agradeço a cada paciente que confia em minhas mãos os cuidados de saúde.

EPÍGRAFE

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana”
Carl Jung

RESUMO

Introdução: A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é um grande termo que envolve desde a simples deposição de tecido adiposo no fígado a um progressivo processo de esteatose hepática associado a hepatite, fibrose, cirrose e, em alguns casos, carcinoma hepatocelular cuja prevalência da DHGNA encontra-se em torno de 20-30% em países do Ocidente (alguns estudos relatam até 40-50%) e 5-18% em países asiáticos.

Objetivos: avaliação de fatores clínicos e metabólicos associados ao conteúdo hepático de gordura determinado por ressonância magnética, correlação de concentrações séricas de IGF-1 e comprimento de telômeros de leucócitos com fração hepática de gordura e avaliação da efetividade de dapagliflozina e comprimento de telômeros em um ensaio clínico piloto em sujeitos com DHGNA com e sem DM2.

Materiais e Métodos: Realizamos o estudo em duas partes: 1) estudo transversal para avaliação de fatores associados à fração hepática de gordura 2) ensaio clínico piloto com dapagliflozina controlado por placebo por 12 meses com avaliação de comprimento de telômeros de leucócitos. A avaliação bioquímica incluiu concentrações séricas de glicose, hemoglobina glicada, lipoproteínas, AST, ALT, gama-glutamil transferase, ferritina, saturação de transferrina, tireotropina. Testes sorológicos para exclusão de infecção pelos vírus da hepatite B e C também foram realizados. As concentrações séricas de insulina no plasma em jejum foram realizadas para participantes com tolerância normal à glicose. As concentrações séricas basais de IGF1 foram determinadas pelo método quimioluminescência. Todos os participantes foram submetidos à ressonância magnética usando um scanner de corpo inteiro de 1,5 T (Philips Multiva). O comprimento relativo dos telômeros dos leucócitos foi medido pela reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR).

Resultados: No estudo transversal, foram incluídos 47 indivíduos com DHGNA e treze (27,7%) participantes tinham o diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2. Examinamos a associação entre as variáveis clínicas e bioquímicas e a FHG determinada por ressonância magnética agrupando os sujeitos do estudo em dois grupos, de acordo com a fração hepática de gordura abaixo ou acima da mediana da fração hepática de gordura (15,9%). As concentrações séricas de triglicerídeos séricos foram significativamente maiores entre os indivíduos com fração hepática de gordura acima da mediana. A análise de subgrupo entre os sexos indicou que as concentrações séricas de insulina no plasma em jejum e HOMA-IR foram positiva e moderadamente correlacionados com a fração hepática de gordura em homens, mas não em mulheres, entre os participantes com tolerância normal à glicose. As concentrações séricas de glicose em jejum foram moderadas e significativamente correlacionadas com a fração hepática de gordura em mulheres, mas não em homens.

Para a avaliação de comprimento de telômeros de leucócitos, foram incluídos 32 indivíduos com DHGNA. A mediana de idade foi de 40 (34,5-56,7) anos, sendo a maioria homens (20; 62,5%). Examinamos a associação entre variáveis clínicas e bioquímicas e comprimento relativo de telômeros comparando indivíduos com comprimento relativo de telômeros abaixo e acima da mediana (0,64). Indivíduos com comprimento relativo de telômeros abaixo da mediana tinham idade significativamente maior, IMC menor, concentrações séricas de AST e GGT mais altas, concentrações séricas de ferritina mais baixas e maior

pontuação no escore FIB4, quando comparados com aqueles que apresentaram comprimento relativo de telômeros acima da mediana. Um modelo de regressão logística multivariável considerando comprimento relativo de telômeros abaixo ou acima da mediana como variável dependente e idade, IMC, AST e GGT ferritina séricas e pontuação FIB4 como variáveis independentes indicaram que apenas a idade estava significativamente associada comprimento relativo de telômeros.

Para o ensaio clínico piloto, acompanhamos por 12 meses, 18 pacientes, 12 pacientes no grupo tratamento e 6 pacientes no grupo placebo. Não houve diferença entre o grupo tratamento e placebo quanto à redução igual ou superior a 30% da fração hepática de gordura e normalização da AST, ALT e GGT. A correlação de Spearman para o grupo tratamento mostrou correlação moderada com circunferência abdominal, AST, ALT, GGT na avaliação final. Avaliamos o comprimento de telômeros de leucócitos em 9 pacientes (7 pacientes do grupo tratamento 2 pacientes do grupo placebo) antes e após o tratamento e não houve alteração em comprimento relativo de telômeros nos 12 meses de seguimento.

Conclusão: nossos dados sugerem que as concentrações séricas de triglicerídeos séricos podem estar associadas ao conteúdo de gordura hepática medido por ressonância magnética em adultos com sobrepeso / obesidade com DHGNA, embora outras anormalidades metabólicas clínicas e bioquímicas relacionadas à resistência à insulina não tenham sido capazes de predizê-lo. As concentrações séricas de IGF-1 não se correlacionaram com a gordura hepática, possivelmente por nossa amostra ser constituída de pacientes de baixo risco para fibrose. Os ISGLT2 devem ser mais bem estudados para o tratamento de pacientes com DHGNA sem DM2. No que se refere à senescência celular, nossos achados reiteram que a idade é o fator mais importante associado ao comprimento dos telômeros e a obesidade por si só não prediz CTL mais curto. Maiores concentrações séricas de AST, GGT e maior pontuação no escore FIB-4 foram associadas ao menor comprimento dos telômeros, e este é um ponto que deve ser estudado.

Palavras-chave: DHGNA, fração de gordura hepática, ressonância magnética, comprimento de telômeros, dapagliflozina.

ABSTRACT

Introduction: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a term that ranges from the simple deposition of fatty tissue in the liver to a progressive process of hepatic steatosis associated with hepatitis, fibrosis, cirrhosis and, in some cases, hepatocellular carcinoma. The prevalence of NAFLD is around 20-30% in Western countries (some studies report up to 40-50%) and 5-18% in Asian countries.

Objectives: evaluation of clinical and metabolic factors associated with liver fat content determined by MRI, correlation of serum IGF-1 concentrations and leukocyte telomere length with liver fat fraction by MRI, and assessment of the effectiveness of dapagliflozin and telomere length in a pilot clinical trial in NAFLD subjects with and without T2DM.

Materials and Methods The study was carried out in two parts: 1) cross-sectional study to assess predictors of hepatic fat assessment 2) 12-month placebo-controlled clinical trial with dapagliflozin for NAFLD and assessment of leukocyte telomere length. Biochemical evaluation includes glucose, ALT, AST, glycated hemoglobin, lipoproteins, gamma-glutamyl transferase, ferritin, saturation, thyrotropin. Serological tests to exclude hepatitis B virus infection and were also performed. Plasma insulin levels were performed in subjects with normal glucose tolerance. Basal serum IGF1 were made by the chemiluminescent method. All participants were picked by all magnetic shield bodies of a 1.5 T scanner (Philips Multiva). of leukocyte telomeres was measured by the real-time polymer chain reaction (qPCR).

Results: In the cross-sectional study 47 individuals, 13 with the diagnosis of diabetes mellitus and NAFLD were included (27.7%). We evaluated in two groups, according to the hepatic fat fraction, below or above the median value of the hepatic fat fraction (15.9 %). Serum triglycerides were significantly higher among subjects with hepatic fat fraction above the median. Subgroup analysis based on gender indicated that women with fasting plasma insulin and HOMA-IR were moderately positive correlated to hepatic fat fraction in men, but not in women, among patients with normal glucose tolerance. Fasting serum glucose concentrations were moderately and significantly correlated with hepatic fat fraction in women, but not in men.

In the assessment of leukocyte telomere length, 32 subjects with NAFLD were included. The median age was 40 (34.5-56.7) years, with the majority being men (20; 62.5%). We examined the associations between clinical and biochemical variables and telomere length comparing two groups of telomere length, below and above the median (0.64). Subjects with telomere length below the median had significantly older age, lower BMI, higher serum AST and GGT and higher FIB4 score, compared to those with telomere length above the median. A multivariable logistic regression model considering telomere length as a dependent variable and age, BMI, AST, GGT FIB4 as independent variables, indicated that only age was significantly associated with telomere length.

In the pilot clinical trial, we followed for 12 months, 18 patients, 12 patients in the treatment group and 6 patients in the placebo group. There was no difference between the group and the treatment in the reduction or 30% reduction of the hepatic fat fraction in the group of dapagliflozin compared to the placebo as well as there is no difference in the normalization AST, ALT, GGT. Spearman's correlation for the treatment group showed moderate correlation with waist

circumference, AST, ALT and GGT in the final evaluation. We evaluated leukocyte telomere length in 9 patients (7 patients in the treatment group 2 patients in the placebo group) before and after treatment and there was no change in the 12 months of treatment.

Conclusion: our data suggest that serum triglyceride concentrations may be associated with hepatic fat content as measured by MRI in overweight/obese adults with NAFLD, although other clinical and biochemical metabolic abnormalities related to insulin resistance were not able to predict it. Serum IGF-1 concentrations did not correlate with liver fat, possibly because our sample consisted of patients at low risk for fibrosis. ISGLT2 should be further studied for the treatment of NAFLD patients without T2DM. About cellular senescence, our findings reiterate that age is the most important factor associated with telomere length and obesity alone does not predict shorter leukocyte telomere length. Higher serum concentrations of AST, GGT and higher FIB-4 score were associated with shorter telomere length, and this is a point that should be studied.

Keywords: NAFLD, liver fat fraction, MRI, telomere length, dapagliflozin.

PREFÁCIO

Essa tese foi estruturada a partir de uma apresentação unificada de introdução, revisão de literatura sobre a Doença Hepática Gordurosa não alcoólica seguida pelos objetivos e metodologias gerais. Todas as etapas do estudo foram baseadas em uma única coorte pacientes que foi avaliada com relação a diferentes desfechos. No primeiro capítulo foi estudada a associação entre variáveis clínicas e bioquímicas e a fração hepática de gordura medida por ressonância magnética em uma análise transversal. O segundo capítulo, por sua vez, consistiu em análise transversal da correlação entre comprimento de telômeros e variáveis clínicas, bioquímicas e a fração hepática de gordura, e um ensaio clínico piloto com seguimento de 48 semanas para avaliar o efeito da dapagliflozina em redução da fração hepática de gordura, comprimento telomérico e concentrações séricas de IGF-1. Os capítulos estão redigidos no formato de artigos, que foram escritos na língua inglesa e se encontram em revisão nos periódicos *Journal of Clinical and Experimental Hepatology* e *American Journal of Medical Sciences*.

LISTA DE FIGURAS

Revisão da literatura

Figura 1. Prevalência da doença hepática gordurosa não alcoólica

Figura 2. Fisiopatologia da doença hepática gordurosa não alcoólica e resistência a insulina

Figura 3. Escores de avaliação de fibrose

Figura 4. Estrutura do telômero e suas seis subunidades proteicas

Figura 5. Linha do tempo do estudo

Capítulo 1

Figura 1. Associação entre as variáveis clínicas e bioquímicas e a fração hepática de gordura

Capítulo 2

Figura 1. Desenho do estudo

Figura 2. Comprimento de telômeros inicial e final nos grupos tratamento e controle.

Figura 3. Associação entre as variáveis clínicas e bioquímicas e a mediana T/S relativo abaixo e acima da mediana

LISTA DE TABELAS

Revisão de literatura

Tabela 1. Antidiabéticos orais e seus efeitos sobre a doença hepática gordurosa não alcoólica

Capítulo 1

Tabela 1. Características dos participantes do estudo transversal

Tabela 2. Correlação entre a FHG e variáveis clínicas

Capítulo 2

Tabela 1. Mediana dos parâmetros clínicos e metabólicos dos pacientes do grupo placebo e tratamento na avaliação inicial

Tabela 2. Tabela 2 x 2 para comparação entre tratamento e placebo quanto aos desfechos metabólicos e FHG

Tabela 3. Correlações da FHG com parâmetros clínicos e metabólicos dos pacientes do grupo tratamento na avaliação inicial e final

Tabela 4. Correlações da FHG com parâmetros clínicos e metabólicos dos pacientes do grupo placebo na avaliação inicial e final

Tabela 5. Características dos participantes avaliados por comprimento de telômeros

Tabela 6. Modelo de Regressão Logística entre as variáveis clínicas e bioquímicas e relação T/S relativa abaixo e acima da mediana entre pacientes com DHGNA.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AACE - *American Association of Clinical Endocrinology*

AADVL – cadeia muito longa da acil coA desidrogenase

AASLD – *American Association for the Study of Liver Disease*

AB – ácidos biliares

ACADM – acil-CoA desidrogenase

AFRI – impulso de fora de radiação acústica

AGL – ácidos graxos livre

AKT/PBK – proteína quinase B *RAC-alpha kinase serine/threonine-protein* ou *protein kinase B*

ALT – alanina aminotransferase

ALFIE – *Abnormal Liver Function Investigation Evaluation*

AMP- adenosina monofosfato

AMPK – proteína quinase adenosina monofosfato

APRI – índice de AST/plaquetas

AST – aspartato aminotransferase

ATP – adenosina trifosfato

BCAA – aminoácidos de cadeia ramificada

CAC – escore de cálcio coronariano

CAP – coeficiente de atenuação programada

CHC – carcinoma hepatocelular

CHG – conteúdo hepático de gordura

ChREBP – proteína de ligação ao elemento responsivo aos carboidratos

CLR – receptores da lecitina do tipo C

CPT1A – carnitina palmitina-coA transferase 1^a

CT – comprimento de telômeros

CTL – comprimento de telômeros de leucocitos

DAMPs - padrões moleculares associados a danos

DGH – deficiência do hormônio de crescimento

DHGNA – doença hepática gordurosa não-alcoólica

DM1 – Diabetes mellitus tipo 1

DM2 – Diabetes mellitus tipo 2

DPP-4 – dipeptilpeptidase tipo 4

DEXA – absorciometria por raios-X de dupla energia

DGYR – derivação gástrica com reconstrução intestinal em Y de Roux

EDV – velocidade diastólica final da artéria esplênica

EH – esteatose hepática

EHL – *enhanced liver fibrosis* – fibrose hepática aumentada

EHNA – esteatohepatite gordurosa não-alcoólica

ETL – encurtamento da telômeros de leucócitos

eNOS – óxido nítrico sintetase

ERM – elastografia por ressonância magnética

EROS – espécies reativas de oxigênio

FA – fosfatase alcalina

FF – fração de gordura

FIAF – fator adipocitário induzido pelo jejum

Fib-4 – Fibrosis-4

FHG – fração hepática de gordura

FGF 19 – fator de crescimento de fibroblastos 19

FS – ferritina sérica

FSF – sinal de fração lipídico

FXR – receptor farnesóide X

HMGCS2 – hidroximetilglutaril-CoA sintase mitocondrial

GGT – gamaglutamiltransferase

GH – hormônio de crescimento

GHR – receptor do hormônio de crescimento

GIP – glucose-dependent insulinotropic polypeptide

GLP-1 – glucagon like peptide 1 – peptídeo semelhante ao glucagon

GLUT – insulin-responsive glucose transporter

GWAS – estudos de associação genômica ampla

HR – hazard risk

HbA1c/A1c – hemoglobina glicada

HCV – vírus da hepatite C

HDAC – histona desacetilase de classe 1

HLA – human leukocyte antigen – sistema antígeno leucocitário humano

HMGCS2 – enzima cetogênica comprometedora do destino 3-hidroximetilglutarilcoA sintase mitocondrial

HOMA IR – homeostatic model assesment insulin resistance

HR – hazard risk – risco relativo

HSL – lípase sensível à hormônio

IC 95% – intervalo de confiança de 95%

IDPP4 – inibidores da peptidilpeptidase tipo 4

IFA – índice de fração de gordura

IGF-1 – *insulin growth factor type 1* / fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1

IGBP1 e 2 – proteínas de ligação ao IGF tipo 1 e 2

IGF1 R – receptor de IGF1

IL 1 beta – interleucina 1 beta

IL 6 – interleucina 6

IMC – índice de massa corporal

IMP – inosina monofosfato

IR – receptor de insulina

IRAH – índice de resistência da artéria hepática

IRS – substrato do receptor de insulina

ISGLT2 – inibidores de co-transportador de sódio e glicose tipo 2

LPL – lipoproteína lipase

MAP-K – proteína quinase ativada por mitógenos

mtDNAcn – cópias do DNA mitocondrial

mTOR – *mammalian target of rapamycina* – receptor alvo de rapamicina

NAFLD – *non alcoholic fatty liver disease*

NASH – *non alcoholic steatohepatitis*

NHANES – Inquérito Nacional de Saúde e Nutrição

NFLS – escore de gordura hepática da NAFLD

NLRs – receptores tipo NOD

NNT – número necessário para tratar

OCA – ácido obeticólico

OMS – Organização Mundial de Saúde

OR – odds ratio

RR – risco relativo

PAMPs - padrões moleculares associados a patógenos

PCR – reação em cadeia de polimerase

PCR-as – proteína C reativa de alta sensibilidade

Pi3k – fosfoinositol 3 quinase

PNPLA3 – proteína 3 domínios fosfolipase semelhante a patatina

P3NP – peptídeo aminoterminal pró-colágeno 3

POT 1 – proteína de proteção de telômeros tipo 1

PPAR – receptor ativador de peroxissomo

PPRs – padrões codificados por linha germinativa

pSWE – elastografia por onda de cisalhamento pontual

PSV – velocidade de pico sistólica

PTX – pentoxifilina

RAP1 - proteína repressora / ativadora 1

RI – resistência a insulina

RM – ressonância magnética

RM-DP – RNM com densidade de prótons

rs – correlação

RT-qPCR – reação em cadeia de polimerase em tempo real

SCOT – succinil-CoA:3-oxoacid CoA transferase

SGLT2 – co-transportador de sódio e glicose tipo 2

SM – síndrome metabólica

SREPB1 – proteína de ligação ao elemento regulador do esterol

TCFL2 – fator de transcrição semelhante ao gene 2

TERC – componente RNA da telomerase

TERT – transcriptase reversa da telomerase

TC – tomografia computadorizada

TFG – taxa de filtração glomerular

TG – triglicerídeos

TGR 5 – receptor transmembrana acoplado à proteína G tipo 5

TIN - proteína interativa-TRF1-2

TLRs – toll-like-receptors

TM6SF2 – superfamília 2 do receptor transmembrana tipo 6

TNF – fator de necrose tumoral

TONIC – Treatment for NAFLD in children

TPP1 - proteína que interage com TIN2 e POT1

TRF 1 e 2 – telomere restriction fragment / fragmentos de restrição terminal

T/S relativo – comprimento de telômeros relativo

UH – Unidades Hounsfield

US – ultrassonografia

VCTE – elastografia transiente de controle de vibração ou Fibroscan

VP – vasopressina

2D SWE – elastografia 2D de onda de cisalhamento

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO -----	23
2. REVISÃO DA LITERATURA -----	26
2.1 EPIDEMIOLOGIA DA DHGNA -----	26
2.2 HISTÓRIA NATURAL DA DHGNA -----	27
2.3 RESISTÊNCIA INSULÍNICA, ÁCIDOS BILIARES E DHGNA -----	31
2.4 GH, IGF-1 E DHGNA -----	37
2.5 CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS PARA DHGNA -----	40
2.5.1 Avaliação por Imagem -----	41
2.5.2 Escores de Avaliação de Fibrose em DHGNA -----	48
2.5.3 Citoqueratina 18 -----	54
2.6 AVALIAÇÃO LABORATORIAL DA FUNÇÃO HEPÁTICA -----	55
2.6.1 Enzimas Hepáticas -----	56
2.6.2 Avaliação da Função hepática -----	58
2.6.3 Ferritina -----	59
2.6.4 Outros Potenciais Biomarcadores: Vasopressina -----	62
2.7 TRATAMENTO DA DHGNA: RECOMENDAÇÃO ATUAL -----	63
2.7.1 Pioglitazona -----	69
2.7.2 Vitamina E -----	72
2.7.3 Cirurgia Bariátrica -----	73
2.7.4 Justificativa Para o Uso de Antidiabéticos Orais em DHGNA -----	74

2.7.4.1	Metformina	75
2.7.4.2	Análogos do GLP-1	77
2.7.4.3	Gliptinas ou Inibidores da Dipeptidilpeptidase Tipo 4	79
2.8	ISGLT2 para DHGNA	81
2.9	COMPRIMENTO DE TELÔMEROS E DHGNA	87
3.	OBJETIVOS GERAIS	93
4.	METODOLOGIA GERAL	94
5.	CAPÍTULO 1: FATORES ASSOCIADOS À FRAÇÃO HEPÁTICA DE GORDURA AVALIADA POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA	96
5.1.	INTRODUÇÃO	97
5.2.	MATERIAIS E MÉTODOS	98
5.2.1.	Desenho do Estudo	98
5.2.2.	Procedimentos	98
5.2.3.	Avaliação Quantitativa da FHG por RM	99
5.2.4.	Análise Estatística	99
5.3.	RESULTADOS	100
5.3.1.	Características da População do Estudo	100
5.3.2.	Variáveis Clínicas e Bioquímicas de acordo com o grau de FHG	104
5.3.3.	Correlação entre as Variáveis Clínicas e Bioquímicas e FHG	105

5.4. DISCUSSÃO -----	107
5.5. CONCLUSÃO -----	117
6. CAPÍTULO 2 - ENSAIO CLÍNICO PILOTO COM DAPAGLIFLOZINA E AVALIAÇÃO DE COMPRIMENTO DE TELÔMEROS EM DHGNA-----	119
6.1 INTRODUÇÃO -----	120
6.2 MATERIAIS E MÉTODOS -----	122
6.2.1. Grupos de Randomização e Tratamento -----	122
6.2.2 Procedimento de Imagem -----	123
6.2.3 Comprimento de Telômeros de Leucócitos -----	124
6.2.4 Desfechos Primários e Secundários -----	124
6.2.5 Análise Estatística -----	125
6.3 RESULTADOS -----	126
6.3.1 Resultados do Ensaio Clínico Piloto -----	126
6.3.2. Resultados do Estudo do Comprimento de Telômeros de Leucócitos -----	132
6.4 DISCUSSÃO -----	137
6.4.1. Discussão para o Ensaio Clínico Piloto -----	137
6.4.2 Discussão para o Estudo do Comprimento de Telômeros de Leucócitos -----	144
6.5 CONCLUSÃO -----	152
7. REFERÊNCIAS -----	154

1 INTRODUÇÃO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é um grande termo que envolve desde a simples deposição de tecido adiposo no fígado a um progressivo processo de esteatose hepática associado a hepatite, fibrose, cirrose e, em alguns casos, carcinoma hepatocelular (1). A primeira descrição da DHGNA ocorreu em 1980 através de biópsia hepática demonstrando esteatose macrovesicular, inflamação lobular e periportal, enquanto os achados de dano celular e fibrose que descreviam o diagnóstico de esteatohepatite gordurosa não alcoólica (EHNA) (2). Patologicamente, o grande termo DHGNA descreve esteatose envolvendo mais de 5% do parênquima hepático. Em seu estágio inicial, não há evidência de injúria ao hepatócito. Por outro lado, a EHNA designa uma definição histológica onde há um processo necroinflamatório por lesão de hepatócitos em um contexto de esteatose. O risco de progressão de DHGNA para EHNA pode ser estimado em até 44% conforme estudos realizados através de biópsias seriadas por cinco anos (1,2).

A prevalência da DHGNA encontra-se em torno de 20-30% em países do Ocidente (alguns estudos relatam até 40-50%) e 5-18% em países asiáticos. É, hoje, a segunda causa mais frequente de necessidade de transplante hepático. A projeção para os próximos 20 anos é de que DHGNA será a maior causa de morbimortalidade hepática assim como indicação de transplante hepático (1,2).

Um modelo foi usado para estimar a progressão da doença de DHGNA e EHNA em oito países, com base em dados de prevalência de obesidade em adultos e diabetes mellitus tipo 2 (DM2). O modelo Markov foi construído para China, França, Alemanha, Itália, Japão, Espanha, Reino Unido e EUA. A seleção dos países baseou-se na disponibilidade de dados, na disposição dos especialistas nacionais em colaborar e na capacidade de realizar análises paralelas. Esses países representam regiões com níveis variados de fatores de risco para o desenvolvimento de DHGNA. As estimativas publicadas e o consenso de especialistas foram usados para construir e validar as projeções do modelo. Se a obesidade e o DM2 se nivelarem no futuro, foi estimado um crescimento modesto no total de casos de DHGNA de até 30% entre 2016 e 2030, com o maior crescimento na China como resultado da urbanização e o menor crescimento no Japão como resultado de uma população em

encolhimento. No entanto, ao mesmo tempo, a prevalência de EHNA aumentará de 15 a 56%, enquanto a mortalidade hepática e a doença avançada do fígado mais que dobrarão como resultado do envelhecimento/aumento da população (3).

Os fatores de risco para desenvolvimento da DHGNA são inúmeros, incluindo resistência à insulina/DM2, etnia (hispânicos e norte-americanos, em comparação com afro-americanos), homozigose para o polimorfismo rs738409 do gene que codifica a PNPLA3 (proteína 3 domínios fosfolipase semelhante a patatina) especialmente entre hispânicos, sexo (ainda conflitante, parece ser mais grave em mulheres), filhos de gestantes diabéticas, obesidade especialmente se iniciada infância, dieta (consumo de carne vermelha, grãos refinados, pastelaria, bebidas açucaradas), síndrome de ovários policísticos, síndrome da apneia obstrutiva do sono, variante do gene TM6SF2 (superfamília 2 do receptor transmembrana 6) em europeus, afro-americanos e hispânicos (4).

A patogênese envolve o acúmulo de ácidos graxos livres e triglicerídeos como alteração inicial e tem sido atribuída, pelo menos em parte, à resistência insulínica e obesidade. A disfunção do tecido adiposo na obesidade, DM2 e DHGNA envolve um prejuízo no metabolismo da glicose e lipídios por dois mecanismos: a gordura como órgão endócrino com liberação de várias citocinas derivadas dos adipócitos e a deposição de gordura ectópica induzida por ácidos graxos livres e lipotoxicidade. Estresse oxidativo, inflamação hepática, disfunção mitocondrial, citocinas pró-inflamatórias desequilibradas, fibrose, resistência à insulina, hiperinsulinemia, ácidos graxos livres plasmáticos, fígado gorduroso e lesão de hepatócitos são condições que apoiam o desenvolvimento de EHNA e fibrogênese (5,6). A disfunção do tecido adiposo em DHGNA tem sido associada a redução do catabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) e ácidos graxos. Esta alteração está inversamente relacionada aos níveis séricos de BCAA e de conteúdo hepático de gordura (7).

No que tange ao tratamento, atualmente, atividade física e redução do peso corporal constituem o padrão-ouro uma vez que não há nenhum medicamento registrado para o tratamento específico de DHGNA/EHNA e a biópsia hepática ainda é uma exigência para iniciar o tratamento de acordo com a *American Association for the Study of Liver Disease (AASLD)* (8). Vários outros

medicamentos com atuação em diferentes vias do metabolismo hepático de gordura, antioxidantes e anti-hiperglicemiantes (9) conforme será discutido detalhadamente.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. EPIDEMIOLOGIA DA DHGNA

A obesidade é a doença crônica não transmissível mais prevalente no século XXI e, quando associada à deposição de triglicerídeos nos hepatócitos, potencializa o risco para o desenvolvimento de DHGNA. Atualmente, cerca de 1 bilhão de pessoas são afetadas pela DHGNA em todo o mundo. A DHGNA não pode ser considerada uma doença apenas prevalente em países ocidentais ricos, pois altas taxas de DHGNA são relatadas no Oriente Médio (32%) e na América do Sul (31%) seguido pela Ásia (27%). Menor prevalência é observada nos EUA (24%) e na Europa (23%), e taxas são relatadas em 14% na África (10,11).

Em consonância com o aumento mundial da prevalência de seus fatores de risco principais, como diabetes, obesidade e idade, ocorre o aumento na prevalência de DHGNA. Os últimos estudos mostram uma prevalência global de DHGNA estimada em cerca de 25% (11,12).

A DHGNA é uma doença multifatorial complexa que envolve uma série de fatores genéticos, metabólicos e ambientais. Está intimamente associada à resistência à insulina, síndrome metabólica, obesidade, diabetes e muitas outras doenças (12). A obesidade pode ser um fator que explica as taxas mais altas de DHGNA em hispânicos que apresentam uma maior prevalência em comparação com outros grupos étnicos. Quando comparadas a mulheres com obesidade e nível socioeconômico similares, mulheres hispânicas também apresentam maior adiposidade. Da mesma forma, fatores de risco socioeconômicos e culturais têm sido indicados nessas coortes. Evidências mostram que a residência em áreas de maior pobreza está correlacionada com a maior prevalência de alimentos e bebidas ricas em açúcar e gorduras de baixo custo, fatores especialmente prevalentes nas comunidades latinas (10).

As diferenças étnicas podem ser importantes na correlação da DHGNA com o conteúdo de triglicerídeos intra-hepáticos. Estudos mostraram que, embora afro americanos tenham mais obesidade e HAS, eles têm menor risco para DHGNA comparados aos latinos, o que seria parcialmente atribuído a

menor gordura visceral. O conteúdo de triglicerídeos intra-hepáticos tem se correlacionado positivamente com o aumento do metabolismo oxidativo mitocondrial e são vistos cerca de duas vezes mais na DHGNA. Os latinos parecem apresentar maior conteúdo de triglicerídeos intra-hepáticos (13). A figura 1 mostra a prevalência mundial da DHGNA.

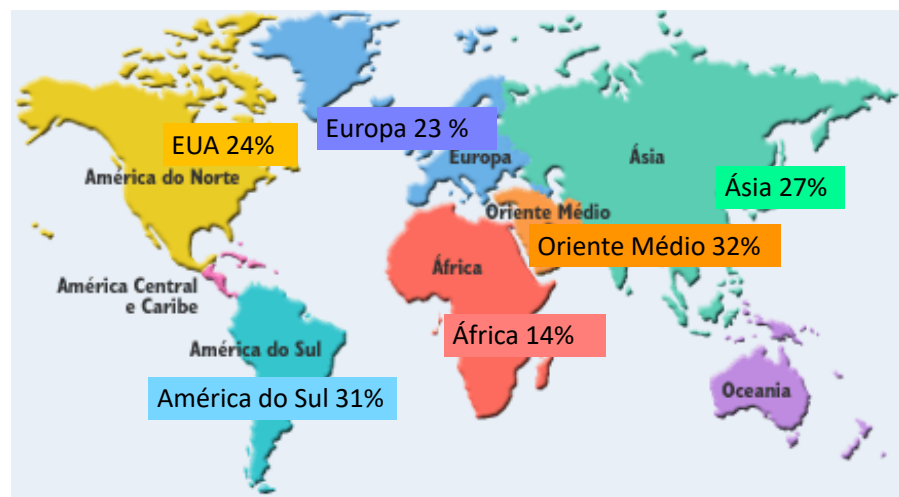


Figura 1 Prevalência da Doença Hepática Gordurosa Não alcoólica.
Fonte: autora.

2.2 HISTÓRIA NATURAL DA DHGNA

É crucial examinar a progressão da doença e os fatores que determinam a evolução de DHGNA para EHNA, fibrose e cirrose. Embora a fibrose pareça estar associada à progressão natural da DHGNA ao longo do tempo, os pacientes podem permanecer estáveis por vários anos, estabelecendo uma janela potencial para intervenção (10).

Esteatose envolvendo menos de 5% do parênquima hepático não é considerada clinicamente significativa. Em adultos, a esteatose estabelece um padrão de acometimento centrolobular, enquanto em crianças a zona periportal é inicialmente a mais acometida. A degeneração espumosa alcoólica é a característica da esteatose microvesicular. As gotículas de lipídios são

constituídas por um núcleo de triacilglicerol com ou sem ésteres de colesterol e uma monocamada periférica de fosfolipídios. A inativação do gene da proteína 3 domínios semelhante a patatina (PNPLA3) mostrou que o acúmulo na superfície de gotículas lipídicas está ligado a um aumento da esteatose macrovesicular (1,2).

O envolvimento do *background* genético é avaliado por estudos de associação genômica ampla (GWAS). O GWAS identificou polimorfismos em numerosos genes, como PNPLA3 e o membro 2 da superfamília da transmembrana 6 (TM6SF2) que mais se correlacionam com a DHGNA. A variante PNPLA3 rs738409 (I148M) tem uma frequência alélica de 49% em hispânicos, 23% em ancestralidade europeia e 17% em afro-americanos, que é muito mais alta do que de TM6SF2. O polimorfismo rs58542926 (E167K) de TM6SF2 foi visto em 7% em europeus, 4% em hispânicos e 2% em afro-americanos. Indivíduos com essas variantes têm um risco maior de desenvolver DHGNA - PNPLA3 rs738409: odds ratio (OR) 3,26 (IC 95%: 2,11-7,21); TM6SF2 rs58542926: OR 2,13 (IC 95%: 1,36–3,30) (14).

A esteatose é classificada como leve quando atinge 5-33% do parênquima hepático, moderada 34-66% e grave acima de 66%. Quando não-abundante concentra-se na zona centrolobular do hepatócito (zona 3) e, quando mais intensa, localiza-se panacinar. O acometimento da zona periportal (zona 1) relaciona-se com progressão para cirrose levando a distribuição irregular ou perda completa de gorduras esteatóticas. A inflamação e/ou fibrose caracteriza-se por infiltrado inflamatório crônico mononuclear, poucas células plasmáticas e monócitos. O lipogranuloma hepático trata-se do hepatócito esteatótico central ou gota de gordura e acúmulo periférico de células mononucleares ou macrófagos. As células de Kupffer (macrófagos hepáticos) correlacionam-se com o grau de atividade necroinflamatória, injúria e fibrose. De fato, esta é a célula que comanda e regula estes processos de lesão/inflamação e estoque de triglicérides hepáticos (1-2,4). A figura 1 ilustra achados histológicos da DHGNA.

A esteatohepatite com seus hepatócitos balonizados com esteatose e inflamação são encontrados tipicamente na zona centro lobular. A aparência de balão pode ser devido a alteração do estresse oxidativo dos microtúbulos, perda do filamento intermediário do citoesqueleto, retenção de fluido, modificação para

pequeno teor de gordura e dilatação do retículo endoplasmático. Os corpúsculos de Mallory-Denk (inclusões patológicas no citoplasma) caracterizados por núcleos glicogenizados, lipogranulomas acinares, megamitocôndria, fibrose pericelular e corpos acidófilos são frequentemente vistos na EHNA, mas não são necessários para o diagnóstico (1-2,4).

A fibrose também tem aparência característica de lesões precoces mostrando uma deposição perissinusoidal em zona 3. As fibras de colágeno podem ser vistas cercando os hepatócitos em lesões mais avançadas. Evidências sugerem que a fibrose portal em associação com a pericentral é um componente central para a estágio de hepatite com fibrose e posterior cirrose. A coloração de Masson Tricrômio é útil na identificação de fibrose precoce em EHNA. A classificação da esteatose pelo escore NAS utiliza os critérios de esteatose, balonização e inflamação lobular e a fibrose é classificada como ausente, leve ou perissinusoidal zona 3, moderada, periportal/portal, fibrose em ponte ou cirrose (1,2).

O carcinoma hepatocelular (CHC) variante esteatohepatite foi primeiramente visto em pacientes com vírus da hepatite C (VHC). Nos Estados Unidos da América, houve um aumento de 80% de CHC em 20 anos, sendo o quinto câncer mais comum e a terceira causa de mortalidade relacionada ao câncer (1,2).

Estudo de revisão conduzido por Wong avaliou os termos “doença hepática gordurosa não alcoólica” ou “fígado gorduroso” e “carcinoma hepatocelular”. A análise de 35 artigos revelou que, em regiões do Oeste e da Ásia-Pacífico, existe uma incidência menor de CHC entre pacientes com DHGNA quando comparados a outras doenças do fígado, como o VHC. Nos Estados Unidos, um grande estudo de centro único de 510 pacientes com cirrose verificou uma incidência cumulativa anual de CHC de 2,6% em pacientes com cirrose por EHNA, em comparação com 4% em pacientes com cirrose por VHC. No Japão, a taxa de 5 anos de VHC foi de 11,3% para cirrose por EHNA e 30,5% para cirrose por HCV (15).

Para avaliação dos fatores relacionados a progressão, McPherson avaliou 108 pacientes com biópsia seguidos por 6,6 anos. Entre os 81 pacientes com

esteatohepatite na biópsia inicial, 75 (93%) ainda apresentavam EHNA no seguimento, enquanto 6 haviam regredido à DHGNA. Entre os 27 pacientes com DHGNA na linha de base, 12 (44%) pacientes progrediram para EHNA na biópsia de acompanhamento. O principal fator associado com mudanças significativas no escore de avaliação entre as biópsias hepáticas foi a mudança no índice de massa corporal (IMC) com $r_s = 0,23$ ($p = 0,026$). No acompanhamento, a adiposidade do paciente medida pelo IMC aumentou significativamente (média de $34,9 \pm 5,0$ vs. $33,9 \pm 5,2$ kg/m²; $p = 0,004$). Os pacientes foram mais propensos a ter DM2 (65% vs 48%, $p < 0,001$) assim como fibrose hepática mais avançada (16).

Embora DM2 e obesidade sejam os fatores de risco mais estudados, a DHGNA na ausência de obesidade vem sendo descrita, chamada DHGNA magra (*lean NAFLD*). Esta foi inicialmente descrita em asiática e pode acometer 10-20% dos europeus e americanos. Embora não tenham a obesidade, descrita pelo IMC, esse perfil de paciente também apresenta aspectos de sedentarismo e resistência insulínica. Quando comparados ao grupo de obesidade/sobrepeso são mais jovens e apresentam menos componentes da síndrome metabólica (SM). Esses dados ressaltam a complexidade dos fatores ambientais inter-relacionados com a predisposição genética na fisiopatologia da DHGNA (17). Um estudo avaliando 78 voluntários jamaicanos urbanos, 52% do sexo masculino, com idade média de 28,5 anos e IMC 22,4 kg/m² mostrou que em avaliação por ultrassom (US), o coeficiente de atenuação média do fígado (CA) e a relação fígado/baço, estavam ambas inversamente correlacionadas com a gordura do fígado e nas correlações ajustadas por idade, sexo e IMC, o MLA foi negativamente associado ao peso ($r = 0,30$; $p = 0,009$) e estatura ($r = 0,28$; $p = 0,017$) e associado à glicemia de jejum ($r = 0,23$; $p = 0,05$), insulina em jejum ($r = 0,42$; $p = 0,001$) e HOMA-IR ($r = 0,35$; $p = 0,004$) mesmo em indivíduos magros (18).

No que se refere aos fatores metabólicos, a ingestão de frutose estimula a lipogênese de novo, conforme estudos em humanos, e bloqueia a oxidação de ácidos graxos no fígado. A ingestão aguda de frutose aguda estimula a termogênese e a taxa metabólica, mas foi demonstrado que cronicamente (dias a semanas) reduz o gasto de energia em repouso. O metabolismo hepático da frutose pela frutoquinase C resulta na decomposição da adenosina monofostato

(AMP) em inosina monofosfato (IMP) e síntese de ácido úrico, que se deve principalmente a uma queda no fosfato intracelular que ocorre após a rápida fosforilação da frutose pela frutoquinase C no fígado. Por outro lado, a frutoquinase A é uma segunda isoforma da frutoquinase e é expressa de forma mais ubíqua, diferindo da frutoquinase C por fosforilar a frutose com menos eficiência e não causar depleção significativa de ATP (19).

A ingestão de bebida açucarada está associada à DHGNA conforme Ouyang et al compararam indivíduos com DHGNA, 49 sem cirrose a 24 controles pareados por idade, sexo e IMC. Indivíduos com DHGNA tiveram uma ingestão duas a três vezes maior de frutose de bebidas açucaradas (365 kcal vs 170 kcal) do que os controles, e isso foi associado a um aumento da expressão de frutoquinase no fígado (20).

2.3 RESISTÊNCIA INSULÍNICA, ÁCIDOS BILIARES E DHGNA

A correlação entre resistência insulínica (RI) e depósito hepático de gordura encontra-se no cerne da fisiopatologia da DHGNA. Sedentarismo e dieta rica em gordura e carboidratos levam ao acúmulo de ácidos graxos livres e triglicerídeos configurando o marco inicial da doença relacionado diretamente a resistência insulínica (chamada de primeira agressão ou primeiro *hit*). Em sequência, desencadeiam eventos inflamatórios e fibrogênese (chamada de segunda agressão ou segundo *hit*). A resistência insulínica leva a lipogênese “de novo” e redução da lipólise em tecido adiposo com aumento dos ácidos graxos hepáticos (1-2,4).

A microbiota intestinal diante do excesso de nutrientes sofre com a sobrecarga do retículo endoplasmático que desencadeia resposta proteica desdobrada, com piora da resistência insulínica por uma série de mecanismos incluindo a ativação do terminal c-Jun-N-kinase e inflamação. Esta microbiota é um dos pontos-chave para a DHGNA, pois influencia não apenas a absorção e disposição dos nutrientes, mas também condiciona a inflamação hepática favorecendo e disponibilizando *toll-like-receptors* (TLRs) os quais estimulam as células hepáticas para a produção de citocinas pró-inflamatórias (1-2,4).

O excesso de ácidos graxos livres também promove disfunção mitocondrial, aumento do estresse oxidativo e desacoplamento da fosforilação

oxidativa. Eles também ativam uma resposta fibrogênica nas células estreladas hepáticas que podem promover a progressão para EHNA e cirrose, assim como produção de espécies reativas de oxigênio. A disfunção do tecido adiposo e a RI levam ao aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, MCP-1, TNF- α , TGF- β , PAI-1, IL-6) e liberação reduzida de adipocinas anti-inflamatórias (por exemplo, adiponectina) e produção de espécies reativas de oxigênio (EROS). Essas moléculas podem danificar diretamente o fígado ou agir indiretamente, aumentando o estresse oxidativo, o dano hepatocelular, a fibrose hepática e o desenvolvimento de tumores, por exemplo, através da ativação do fator oncogênico transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3). Ceramidas, diacilgliceróis e ácidos graxos não saturados não apenas desencadeiam a inflamação, mas também a apoptose. Eles também alteram a sinalização e a ação da insulina, diminuem a síntese de adenosina trifosfato (ATP) muscular e a produção de óxido nítrico (assim como o óxido nítrico sintetase endotelial/eNOS), que comprometem a ativação de fosfoinositol-3 quinase (PI3K), piruvato desidrogenase quinase, isoenzima 1 e RAC-alfa serina/treonina-proteína quinase (também conhecido como proto-oncogene c-Akt) (21).

Na última década, os ácidos biliares (AB) mostraram desempenhar um papel central na homeostase metabólica, também afetando a sensibilidade à insulina. Os efeitos de sensibilização à insulina dos ácidos biliares são mediados via interação com o receptor farnesóide X (FXR). Resistência à insulina, o principal fator de risco para DHGNA está associado a um deslocamento do perfil de ácidos biliares circulantes em direção a um perfil mais trihidroxílico, que tem efeitos agonistas de FXR mais fracos em comparação com os ácidos biliares mais hidrofóbicos (22).

Os ácidos biliares estão envolvidos na fisiopatologia da DHGNA por dois mecanismos: 1) ações regulatórias sobre o metabolismo de lipídios e carboidratos, exercidas pela ação do FXR e do receptor AB acoplado à proteína G 1 (TGR5) e, se desregulado, podem levar a alterações na glicose e homeostase lipídica e promover inflamação e fibrose e 2) relação recíproca com microbiota intestinal na qual os ABs moldam a microbiota intestinal através de efeitos antimicrobianos diretos e a produção induzida por FXR de peptídeos

antimicrobianos com mudança na composição do pool de AB através de atividades enzimáticas definidas (como desconjugação, desidroxilação, oxidação e epimerização). Portanto, por um lado, o metabolismo alterado da AB pode afetar a composição da microbiota; por outro lado, a disbiose pode afetar a composição do pool de ácidos biliares, o que potencialmente promove o desenvolvimento de DHGNA e EHNA. Além disso, o aumento da exposição aos ácidos biliares pode estar envolvido em lesão hepática e patogênese de EHNA. É importante notar que, como em outras doenças hepáticas crônicas, a colestase leve é comum em pacientes com DHGNA (23).

Estudo conduzido por Legry e cols, revelou correlação dos ácidos biliares com resistência insulínica e o ácido glicólico teve correlação com esteatose ($r = 0,29$, $P = 0,03$). A avaliação de 86 pacientes com obesidade (IMC médio de $31,9 \text{ kg/m}^2$), 24 controles, 25 com DHGNA e 37 com EHNA, encontrou sobrecarga intra-hepática de ácidos biliares, e a sinalização de expressão hepática de FXR, medida por concentrações de fator de crescimento de fibroblastos 19 (FGF 19) estava reduzida em indivíduos com EHNA com fibrose a partir do estágio 2 (24).

A via de sinalização da insulina, agredida pela resistência insulínica, exerce mecanismo primordial tanto em doenças metabólicas quanto cardiovasculares. No contexto destas doenças, a via de sinalização da insulina fostatidilinositol 3 (insulina, receptor de insulina, Pi3K, Akt) encontra-se em *down-regulation*, enquanto a via mitogênica, regulada pela MAP-K (proteína quinase associada a mitógenos) encontra-se com atividade aumentada. Esta inversão de ativação das vias, determina uma “resistência insulínica seletiva” e medeia a resposta pró-aterosclerótica pela ativação da sinalização de MAP-K. A ativação desta sinalização através da hiperinsulinemia e a “resistência insulínica seletiva” criada, induz a remodelação vascular que leva a vasoconstrição, proliferação e migração de células vasculares. O estresse metabólico induz acúmulo de lipídios e inflamação crônica estéril no músculo esquelético contribuindo com a resistência insulínica sistêmica (25).

A resistência à insulina no tecido adiposo contribui ainda mais para a sinalização de insulina sistêmica. A interação metabólica entre tecido adiposo e fígado se faz através de adiponectina (reduzida), interleucina 6 (IL-6) e outros peptídeos liberados pelo tecido adiposo com efeitos pró-inflamatórios no fígado.

A enzima dipeptidil peptidase 4 (DPP-4) é outro fator que pode promover resistência à insulina na interligação fígado e tecido adiposo. A DPP-4 circulante é secretada pelos hepatócitos e atua em conjunto com o fator Xa no plasma para estimular macrófagos inflamatórios no tecido adiposo visceral em camundongos. Sabe-se que esse efeito promove a resistência à insulina ressaltando a importante interação cruzada entre fígado e outros tecidos subjacentes à desregulação metabólica na DHGNA (26).

Por fim, resistência insulínica e alteração de microbiota geram inflamação por meio da formação dos inflamassomas. Estes são formados a partir da interação entre microrganismos patogênicos ou liberadas por células lesadas e proteínas e caspases. Eles atuam como sensores de moléculas de padrão molecular associadas a patógenos endógenos ou exógenos (PAMPs) ou padrões moleculares associados a danos (DAMPs). Como parte da atividade inata do sistema imunológico, os inflamassomas contribuem para a ativação imune em resposta a diferentes estímulos. Eles regulam citocinas pró-inflamatórias efetoras pela ativação de famílias de receptores de reconhecimento de padrões codificados por linha germinativa (PRRs) como receptores do tipo Toll (TLRs), receptores do tipo NOD (NLRs) e receptores da lectina do tipo C (CLRs). A ativação de inflamassomas em resposta a AGLs, estresse oxidativo e outros metabólitos pró-inflamatórios observados na DHGNA com consequente produção de interleucina 1 β (IL-1 β) pode ter um papel importante no desenvolvimento de EHNA, induzindo a supressão do receptor- α ativado por proliferador de peroxissomo (PPAR- α) e promover o efeito indireto da morte celular induzida por fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (27).

Para mensuração em estudos clínicos, a compreensão entre a interação das concentrações insulinêmicas e glicêmicas em jejum permitiu estudar formas de mensurar a resistência insulínica. Considerando a relação de feedback entre fígado e célula-beta pancreática, foi construído um modelo matemático para estimar o grau de funcionamento da célula beta-pancreática e a sensibilidade a insulina, os quais seriam proporcionais às concentrações insulinêmicas e glicêmicas no estado basal ou *steady state*. No ano de 1985, Mathews e cols publicaram um modelo matemático que prediz a resistência insulínica de acordo com a glicemia e insulinemia basais – Modelo de Avaliação da Homeostase

(HOMA-IR, isto é, *Homeostasis Model Assessment Insulin Resistance*). Dessa forma, este preditor tornou-se uma alternativa ao clampe euglicêmico-hiperinsulinêmico que, embora seja considerado a teste padrão-ouro para avaliar resistência insulínica, ou seja, de maior acurácia para avaliação da RI *in vivo*, trata-se de método dispendioso, demorado, invasivo e de alta complexidade, o que o torna inviável sua aplicação em estudos populacionais e na prática clínica (28).

Dessa forma, a avaliação laboratorial de resistência insulínica na prática clínica tem sido realizada pelo índice HOMA-IR, fornecendo uma medida indireta da RI ao avaliar, em condições de homeostase e jejum, a insulina endógena e a glicemia. A equação utilizada consiste em $HOMA-IR = \frac{Insulina \text{ em jejum em } \mu UI/mL \times Glicemia \text{ em jejum em } mmol/L}{22,5}$ ou $\frac{Insulina \text{ em jejum em } \mu UI/mL \times Glicemia \text{ em jejum em } mg/dL}{405}$. Os valores para o ponto de corte variam de acordo com a população estudada. A maioria dos estudos baseia-se em um ponto de corte superior a 2,7 para marcar a presença da RI (29).

As adipocinas também estão desreguladas na DHGNA contribuindo para o aumento da RI. No contexto de RI, há a redução da adiponectina, conhecida por sua propriedade sensibilizadora de insulina e ação anti-inflamatória, além de efeitos antiestetatóticos ao aumentar a oxidação de AGLs e reduzir a gliconeogênese, influxo de AGLs e lipogênese de novo no fígado. Já as adipocinas leptina e resistina estão aumentadas. Com relação à leptina, embora sua secreção seja proporcional à quantidade de tecido adiposo e esteja aumentada tanto na obesidade quanto na DHGNA, os estudos sugerem que há uma resistência à sua ação e seu papel na DHGNA parece estar relacionado à RI por desfosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS-1) e regulação negativa da gliconeogênese, induzindo esteatose hepática. A resistina parece ter ação também na RI além de ação proinflamatória, com estímulo de TNF-alfa e IL12 nos macrófagos e regulação de IL6 e IL1beta (29).

Além das adipocinas, os esfingolipídeos têm chamado a atenção por seu papel na resistência à insulina e na morte celular lipotóxica. O acúmulo aberrante de ceramidas se correlaciona com a resistência à insulina hepática e a esteatose. Camundongos transgênicos que expressam a ceramidase ácida para desencadear a desacilação das ceramidas foram testados para avaliação de

esteatose hepática. A superexpressão hepática da ceramidase ácida preveniu o surgimento de esteatose hepática e melhorou a sensibilidade hepática à ação da insulina no fígado e tecido adiposo. Essas observações sugerem a existência de uma "interferência" de ação rápida entre os esfingolípidos do fígado e do tecido adiposo, regulando criticamente o metabolismo da glicose e a captação de lipídios hepáticos (30,31). A figura 2 resume a interação dos múltiplos fatores fisiopatológicos.

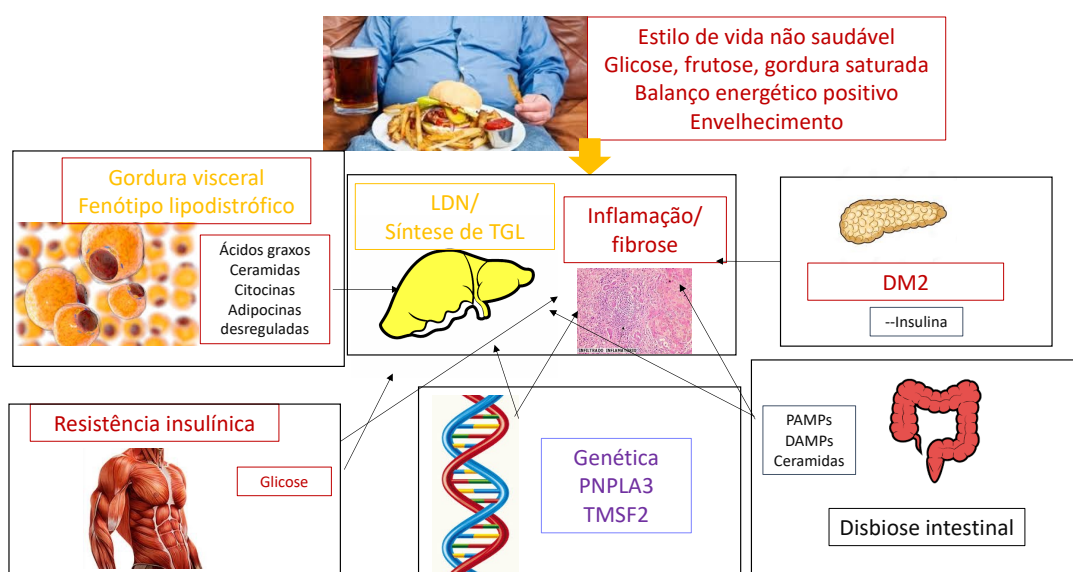


Figura 2. Fisiopatologia da Doença Hepática Gordurosa Não-alcóolica e Resistência a Insulina. LDN lipogênese de novo; TGL triglicerídeos; DM2 diabetes mellitus tipo 2; PAMPs padrões moleculares associados a patógenos; DAMPs padrões moleculares associados a danos; PNPLA3 proteína 3 domínios semelhante a patatina; TMSF2 fator de transcrição 2 superfamília transmembrana. Fonte: autora.

A resistência insulínica leva a liberação de ácidos graxos livres saturados, sendo o mais comum o ácido palmítico. Este consiste em uma cadeia de 16 carbonos, sem ligações duplas o que torna a membrana celular mais rígida e menos fluida. Os ácidos graxos livres saturados induzem a agregação de receptores de morte celular na membrana e ativam as caspases, uma família de cisteína-proteases que executam a fase final de apoptose. No entanto, os sinais para a morte celular nem sempre são letais e, essa sinalização "subletal", na qual o processo apoptótico é iniciado, mas não concluído, pode levar à ativação de vias que resultam em inflamação e fibrose. Esses sinais apoptóticos

incompletos iniciados nos hepatócitos afetam as células estreladas e macrófagos que recebem vesículas dos hepatócitos parcialmente lesados, levando à progressão da inflamação (32).

A relação de DHGNA e SM foi bem demonstrada em estudo de seguimento de 19 anos com dados do Terceiro Inquérito Nacional de Saúde e Nutrição (NHANES). A mortalidade foi obtida no arquivo Mortality-Linkage File, até 31 de dezembro de 2011. A coorte de DHGNA (n = 3613) tinha uma idade média de 43 anos, 73% de brancos e 50% de homens. O grupo DHGNA com pelo menos um critério de SM era significativamente mais velho, apresentava maior IMC, maior probabilidade de ter resistência à insulina e doença cardíaca em comparação com o grupo DHGNA sem SM. Ao longo de 19 anos de acompanhamento, 1039 pessoas morreram. Comparado aos pacientes com DHGNA sem SM, a presença de um componente da SM aumentou o risco de mortalidade em 8 anos (2,6% vs 4,7%) e 16 anos (6% vs 11,9%) (p <0,001). Após o ajuste para fatores sociodemográficos, DHGNA com todos os componentes da SM foi associado à mortalidade geral, cardíaca e hepática. O aumento do número de componentes da SM foi associado a menor sobrevivência (p <0,0001) (33).

2.4 GH, IGF-1 e DHGNA

O hormônio de crescimento (GH), produzido pela adeno-hipófise, é um regulador chave da lipólise em tecido adiposo, além de ter ações semelhantes a citocinas anti-inflamatórias sistêmica e macrófaga. A obesidade, principalmente visceral, é um estado conhecido de deficiência relativa de GH. O fator de crescimento insulina-símile (IGF-1), produzido pelo fígado em resposta ao estímulo do HGH, também tem sido associado a obesidade e alterações do metabolismo lipídico. Embora o fígado sintetize a maior parte do IGF-1 circulante, ele não possui seu receptor sob condições fisiológicas. No entanto, de acordo com estudos recentes, o fígado danificado expressa o receptor (34).

Um modelo murino de deficiência parcial de IGF-1 foi usado para investigar os efeitos do IGF-1 no fígado, comparando controles do tipo selvagem, camundongos IGF-1+ e heterozigotos tratados com IGF-1 por 10 dias. A

histologia, o microarranjo para expressão gênica de mRNA, RT-qPCR e peroxidação lipídica foram avaliados. Análises de microarray revelaram subexpressão significativa de IGF-1 em camundongos heterozigotos em comparação com camundongos controle, restaurando a expressão normal do fígado após o tratamento, que então normalizou suas concentrações circulantes. O RNAm do receptor IGF-1 foi superexpresso em fígados de camundongos Hz, enquanto os camundongos tratados apresentaram uma expressão similar à dos controles. Camundongos heterozigotos apresentaram superexpressão de vários genes que codificam proteínas relacionadas a proteínas inflamatórias e de fase aguda e superexpressão de genes que codificam componentes de matriz extracelular, citoesqueleto e junção celular. A histologia revelou uma arquitetura hepática alterada. Além disso, o dano oxidativo hepático estava aumentado no grupo heterozigoto. A mera deficiência parcial do IGF-1 esteve associada a alterações relevantes da arquitetura e expressão hepática dos genes envolvidos no citoesqueleto, polaridade dos hepatócitos, junções celulares e proteínas da matriz extracelular. Ademais, induziu a expressão hepática do receptor de IGF-1 e mediadores elevados de fase aguda e inflamação, que resultam em danos oxidativos no fígado (34).

A insulina é produzida pelas células beta-pancreáticas, enquanto o IGF-1 é produzido no fígado. O IGF-1 é produzido sob o estímulo do GH que age no receptor de GH (GHR). A insulina e o IGF-1 exercem seus efeitos intracelulares através da ativação de seus receptores cognatos, o receptor de insulina (IR) e o receptor de IGF1 (IGF1R) respectivamente. Tanto o IGF1R como o IR são proteínas heterotetraméricas (compostas de um dímero a – b ligado a um segundo dímero a – b por ligações dissulfeto) que possuem atividade intrínseca da tirosina quinase. O IGF1R é expresso em quase todos os tecidos do corpo e ativa as vias mitogênicas, resultando na proliferação celular. Na presença de insulina, a expressão de GHR hepática é aumentada, levando ao aumento da produção de IGF1. Portanto, a hiperinsulinemia crônica poderia estar associada a concentrações elevadas de IGF-1 circulante. A insulina também suprime as proteínas de ligação ao IGF tipo 1 e 2 (IGFBP1 e 2), que servem para limitar a biodisponibilidade do IGF1 nos tecidos periféricos. Assim, uma elevação crônica da insulina poderia levar ao aumento das concentrações de IGF-1 biodisponível.

Além disso, concentrações aumentadas de insulina levam a um aumento na formação de receptores híbridos e podem levar à ligação da insulina ao IGF1-R, aumentando assim o potencial mitogênico (35).

Em um fígado doente, no entanto, essa síntese de IGF-1 pode estar comprometida, mesmo na presença de resistência insulínica. Estudo retrospectivo feito por Dichtel e cols em pacientes submetidos a cirurgia bariátrica no Hospital Geral de Massachusetts através de biópsias hepáticas em 142 pacientes correlacionou histologia hepática e concentrações séricas de IGF-1. Foram avaliados pacientes com idade média de 52 (± 10 anos) com IMC médio de 43 (± 9 kg/m²). O IGF-1 sérico médio foi menor em indivíduos com inflamação lobular (112 ± 47 vs. 136 ± 57 ng/mL, $p 0,01$), balonização de hepatócitos (115 ± 48 vs. 135 ± 57 ng/mL, $p 0,05$), estágio de fibrose mais avançado (estágios 2-4 vs. 0-1; 96 ± 40 vs. 125 ± 51 ng/mL, $p 0,005$) e EHNA (109 ± 45 vs. 136 ± 57 ng/ml, $p 0,002$). Todos os resultados mantiveram-se significativos após o controle da idade, IMC e diagnóstico de diabetes, e todos, exceto a balonização de hepatócitos (tendência $p 0,06$), permaneceram significativos após a exclusão de indivíduos com cirrose. Esteatose não foi significativamente associada com as concentrações séricas médias de IGF-1. Neste estudo, as baixas concentrações séricas de IGF-1 estiveram associadas ao aumento da gravidade histológica da DHGNA quando rigorosamente controlados para idade, IMC, presença de diabetes e após a exclusão de indivíduos com cirrose (36).

Vários mecanismos subjacentes são responsáveis pelos efeitos do IGF-1 no fígado conforme ilustra a figura 3. É bem conhecido que a resistência à insulina, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e inflamação exercem papel fundamental no desenvolvimento da DHGNA e EHNA. A maioria das espécies reativas de oxigênio são produzidas pela mitocôndria e estão intimamente relacionadas a sua disfunção. Está bem demonstrado que o aumento do IGF-1 melhora a capacidade oxidativa do fígado, sugerindo que o mesmo regula a função mitocondrial e o estresse oxidativo. O GH reduz a gordura visceral o que desempenha um papel fundamental no desenvolvimento de produtos não alcoólicos. O GH também diminui diretamente a lipogênese nos hepatócitos. IGF-1 melhora a resistência à insulina, diminui as espécies reativas de oxigênio (ROS), melhora a função mitocondrial e diminui os triglicerídeos nos hepatócitos.

Além disso, o IGF-1 induz a senescência e inativa as células estreladas e consequentemente a progressão da fibrose (37).

Estudo brasileiro conduzido por Carvalho-Furtado e cols avaliou 22 pacientes com deficiência do hormônio de crescimento (DGH) iniciado na infância e na vida adulta com 5 anos sem reposição de GH. A DHGNA foi avaliada por elastografia transiente e coeficiente de atenuação programada (CAP) por ultrassonografia. Foram seguidos 16 pacientes com DGH de início na infância e 6 pacientes com DGH de início na vida adulta. Oito pacientes (36,3%) tiveram o diagnóstico de DHGNA, associada a maior IMC, circunferência abdominal, insulina e AST. A intervenção terapêutica de reposição de GH por 6 meses levou a melhora da composição corporal: redução da massa gorda (34,7% para 32% p 0,008), aumento da massa magra (60,4% para 64,7% p 0,004) e redução da gordura truncal (43,9% para 41,7% p 0,039), redução da circunferência abdominal em cm (89,4 para 86 p 0,034). No entanto, houve piora nos valores absolutos de glicose, insulina e HbA1c. Não houve diferença no CAP para os grupos com ou sem esteatose (38).

2.5 CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS PARA DHGNA

Para o diagnóstico de DHGNA, a exclusão do uso de álcool é fundamental e o consumo inferior a 30 gramas/dia em 10 anos para homens e inferior a 20 gramas/dia para mulheres é o critério mais adotado. O diagnóstico consiste em achado de esteatose em exames de imagem ou avaliação histopatológica, exclusão de etiologia viral ou outras doenças crônicas hepáticas. A dosagem de biomarcadores como citoqueratina 18 no momento da avaliação histopatológica tem associação significativa com doença em progressão (1,2).

A crescente prevalência da DHGNA e sua evolução para EHNA torna necessário o desenvolvimento de métodos eficazes para identificar esse espectro da doença. Embora reconhecida como padrão-ouro, a biópsia é limitada por seu viés de amostragem, baixa aceitabilidade e complicações graves, como mortalidade, sangramento e dor. Portanto, métodos não invasivos são urgentemente necessários para o diagnóstico mais preciso de DHGNA (1-5).

Estudo canadense conduzido para análise do custo-benefício para screening de DHGNA avaliou o screening com ultrassonografia associada a elastografia e dosagem de citoqueratina 18, comparados a confirmação por biópsia hepática. Neste estudo, a avaliação por histopatologia não se mostrou custo-benéfica (39).

2.5.1 Avaliação Por Imagem

Dessa forma, métodos não-invasivos tendem a ganhar mais força para o diagnóstico em razão de sua melhora da sensibilidade e especificidade.

Usualmente, o US é o primeiro método diagnóstico em pacientes com alteração em enzimas hepáticas (sensibilidade de 60% e especificidade de 80% para detecção de DHGNA. As limitações incluem falso-negativos em casos de esteatose leve, limitações na detecção de fibrose, ausência de determinação quantitativa, limitações impostas ao método em presença de obesidade e dependência da experiência do observador. Para detectar DHGNA na fase inicial, o índice hepático/renal e o índice de atenuação hepática são usados para avaliar a esteatose. Ambas as medidas exibem um desempenho ligeiramente melhor do que US convencional para avaliar esteatose hepática com uma sensibilidade de 95% e especificidade de 100%, mas com valor preditivo negativo ainda baixo 72% (para US H/R) e 67% (para US taxa de atenuação hepática) (40).

Por ultrassom, a esteatose pode ser classificada como grau I (ou leve) quando mostra aumento da ecogenicidade hepática com visualização normal dos vasos intra-hepáticos e do diafragma; grau II (ou moderada) quando apresenta borramento na visualização dos vasos intra-hepáticos e diafragma e grau III (acentuada) quando não se visualizam os vasos intra-hepáticos, diafragma e região posterior do fígado (41,42).

O índice de resistência da artéria hepática (IRAH) é uma forma de avaliar graus de gravidade da doença hepática. Em um estudo observacional nos EUA entre dezembro de 2013 e julho de 2014, envolvendo 49 pacientes e 13 controles avaliaram por US: ecogenicidade e tamanho do fígado e baço, velocidade máxima da veia porta, velocidade sistólica de pico (PSV) e velocidade diastólica final (EDV) da artéria esplênica, índice de resistência da artéria hepática (IRAH)

e escore de fibrose DHGNA para comparação entre os grupos. O IRAH foi significativamente maior nos pacientes com DHGNA do que os controles ($p < 0,0001$). Também foi encontrada diferença significativa entre os grupos de gravidade de DHGNA ($p < 0,0001$, diferença entre os pacientes com IRAH de DHGNA com diferentes escores de fibrose de DHGNA versus IRAH de controles ($p < 0,0001$) com uma correlação positiva entre o IRAH e o escore de fibrose de DHGNA. Este estudo sugere que um ponto de corte de IRAH maior que 0,675 detecta pacientes com risco de fibrose. A detecção de IRAH maior que 0,9 em pacientes com DHGNA, independentemente do grau de severidade da esteatose nos EUA, pode sugerir a realização de biópsia para prever o risco de progressão para esteatohepatite e acúmulo de tecido fibroso. Valores baixos de IRAH podem ser expressão de menor risco (43).

Existem propostas de avaliação quantitativa de gordura hepática por US conforme estudo Lin e cols. Foi realizada uma análise transversal prospectiva de uma coorte de adultos ($n = 204$) com DHGNA avaliados por ressonância magnética com densidade de prótons (RM-PDFF acima de $\geq 5\%$) e sem DHGNA (controles). Os indivíduos foram submetidos a análises de RM-PDFF e avaliação hepática por US na Universidade da Califórnia. A ultrassonografia avaliou parâmetros e retroespelhamento através de várias imagens em modo B do lobo direito do fígado, evitando grande vasculatura. Houve correlação entre a medida de gordura hepática por US (intervalo 0,00005-0,25 1 / cm-sr) com a RM-PDFF (Spearman's $\rho = 0,80$; $p < 0,0001$). Porém este método requer treinamento e maior validação (44).

A rigidez hepática medida por elastografia transitória é o melhor método validado para avaliar fibrose hepática. A elastografia transitória mede a velocidade de propagação da onda de cisalhamento elástica de baixa frequência (50 Hz). A elastografia transitória de controle de vibração ou Fibroscan consiste na utilização de uma sonda portátil para produzir uma onda de cisalhamento no fígado sendo esta propagação de ondas detectada e quantificada em decibéis por metro com a seguinte classificação (100-400 decibéis/metro): sem esteatose $S0 < 248$ db/m; $S1$ 248-267 db/m; $S2$ 268-279 db/m e $S3 > 280$ db/m. A velocidade é diretamente relacionada a rigidez do tecido hepático (*liver stiffness* LS ou RH), expressa em Kilopascals (kPa), a medida usual varia de 2,5-7,5 kPa

(média de 5,5 kPa). O estadiamento de fibrose por TE é feito da seguinte forma F0: abaixo de 7,5 kPa; F1 7,6-7,9 kPa; F2 8-8,8 kPa; F3 8,9-11,7 kPa e F4 maior ou igual a 11,8 kPa (45).

Ryu e cols compararam duas técnicas diferentes de TE usando sonda convexa convencional de modo B de 4mHz e LS com TE Fibroscan em um estudo retrospectivo. As medidas de LS foram obtidas utilizando dois sistemas 2D-SWE (LOGIQ E9 e LOGIQ S8), do mesmo fabricante, com elastografia transitória (TE) servindo como padrão de referência, realizadas no mesmo dia, LS dos dois sistemas 2D-SWE e TE foram significativamente diferentes pelo LOGIQ E9 nos 64 pacientes que tiveram medições confiáveis de LS dos dois sistemas 2D-SWE e TE, os valores médios de LS obtidos pelos dois (LOGIQ E9, $6,57 \pm 2,33$ kPa; LOGIQ S8, $6,90 \pm 6,64$ kPa; $p 0,018$). Embora os valores de LS para dois sistemas 2D-SWE demonstrarem uma correlação positiva muito forte ($r = 0,86$ $p < 0,001$), este estudo mostrou a significativa variabilidade intersistêmica observada nas medições de LS feitas usando os diferentes sistemas 2D-SWE (46).

A tomografia computadorizada (TC) não tem dependência do operador, é rápida, porém há maior exposição a radiação. A TC sem contraste tem sido utilizada para avaliar a gravidade da esteatose desde 1970, com base no fato de que a atenuação hepática está inversamente associada ao conteúdo de gordura hepática. O fígado normal tem um valor de atenuação de 50-65 unidades Hounsfield (UH), 8-10 UH maior que o do baço. No entanto, o valor de atenuação do fígado pode diminuir para menos de 40 UH quando ocorre infiltração gordurosa. A TC sem contraste supera a US na avaliação da gravidade da esteatose hepática, alcançando uma especificidade de 100% e sensibilidade de 82% para diagnosticar graus mais altos ($> 30\%$) de esteatose hepática (47).

A cintilografia hepática conta com poucas evidências para seu uso, e seu valor adicional seria a avaliação da função das células de Kupffer, as quais tem atividade reduzida em EHNA (48).

A elastografia descrita acima foi baseada no princípio da ultrassonografia para quantificar a rigidez hepática. Três tipos diferentes de dispositivos por ultrassonografia podem ser usados para DHGNA: elastografia transiente de

controle de vibração (VCTE ou FibroScan), impulso de força de radiação acústica (ARFI), elastografia 2D de onda de cisalhamento (2D SWE) (43-44).

O VCTE é o primeiro método elastográfico aprovado e o método mais utilizado até hoje. Em VCTE, uma sonda portátil é empregada para introduzir uma onda mecânica de cisalhamento ao fígado, e a propagação de ondas é detectada e quantificada. Existem dois tipos diferentes de sondas: a sonda XL é adequada para pacientes com obesidade e a sonda M é usada para pacientes com peso normal. VCTE mostra excelente precisão para a exclusão da fibrose avançada (alta especificidade), mas não é muito sensível para avaliar cirrose. O ARFI, também conhecido como pSWE (elastografia por onda de cisalhamento pontual), é considerado um método de diagnóstico elastográfico de segunda geração, que pode ser facilmente ativado pela modificação de máquinas comerciais de ultrassonografia. A ARFI é mais adequada para fibrose grave e cirrose do que para casos leves, mas o operador é um fator que influencia os resultados. O 2D-SWE, semelhante ao ARFI, também pode ser implementado em qualquer máquina de ultrassonografia disponível comercialmente e independente do operador, porém mais preciso do que o ARFI para o diagnóstico de fibrose leve ou F2 no estágio (43-44).

A elastografia também foi aplicada por ressonância magnética (ERM). A ERM, que combina ressonância magnética e elastografia, mostra grande precisão, mas é limitada por seu alto custo e baixa disponibilidade. A ERM é mais precisa do que a VCTE no diagnóstico da fibrose F2 e F4, e sua taxa de falha é muito menor do que a das outras ferramentas discutidas acima (43). A carga de ferro no fígado pode ser um fator negativo para o exame, assim como a obesidade severa (peso corporal > 160 kg). Devido ao alto custo da elastografia avançada, apenas os pacientes de alto risco são recomendados a se submeterem a exames de elastografia por ressonância (49).

Por ressonância magnética (RM), o conteúdo hepático de gordura medido por RNM foi primeiramente descrita por Dixon, pela técnica de desvio químico. A perda de intensidade de sinal do parênquima na imagem fora de fase, em comparação com a imagem em fase, indica uma mistura de água-gordura no tecido e, com isso, o diagnóstico de esteatose é definido. A sensibilidade e a

especificidade documentada para essa técnica são de cerca de 81 % e 100% (50).

Desde então, a RNM tem ganhado destaque, uma vez que permite a avaliação quantitativa da esteatose através da quantificação do sinal de fração lipídico (FSF) ou fração hepática de gordura (FHG), biomarcadores para a densidade de prótons provenientes da gordura também podem ser adicionados à avaliação. A espectroscopia, aliada a Rm, não produz imagens propriamente ditas, mas avalia a quantidade de elementos químicos presentes nos tecidos. Estudos estão sendo publicados como a utilização de RM com espectroscopia como método não-invasivo preciso para DHGNA (51). Os marcadores incorporados a RM melhoram a precisão na quantificação do grau de esteatose e fibrose. A RM com próton ^1H - e fosforo ^{31}P é outra forma para avaliar em tempo real a gordura hepática, a membrana celular e o metabolismo energético. A ressonância magnética (RM) se aproxima de 100% de sensibilidade na detecção de esteatose hepática, mesmo com níveis de esteatose tão baixos quanto 5,56% (52).

Embora a RM por espectroscopia seja considerada a técnica de imagem de referência (51-52), estudos recentes mostram que a RM com a técnica de desvio químico pode ser usada como objetivo de mensurar concentrações de ferro e gordura com as seguintes vantagens: flexibilidade para mapear regiões de interesse, aquisição de imagens como o *breath-hold* para melhor evitar a contaminação do sinal dos vasos maiores e artefato de movimento, tempo de aquisição de imagens menor (53). Ademais, a RM mantém a sensibilidade e especificidade mesmo em pacientes com obesidade grau III (54).

A fração de densidade de prótons determinada por RM mostrou correlação com o grau de esteatose determinado por histologia em adultos com DHGNA conforme o estudo de Permutt e cols que avaliou 51 pacientes com DHGNA por RM e histologia. Houve correlação do grau de esteatose determinado por histologia relacionado com aumento da fração hepática de gordura medida por RNM, quanto maior a FHG, maior foi o grau de esteatose à histologia: 8,9% no grau 1, 16,3% no grau 2 e 25,0% no grau 3 (correlação: $r^2 = 0,56$ $p < 0,0001$). No entanto, pacientes com fibrose no estágio 4, quando comparados com pacientes com fibrose no estágio 0-3, apresentaram esteatose

hepática significativamente menor na FHG medida por RM (7,6% vs. 17,8%, $p < 0,005$) e grau de esteatose determinado por histologia (1,4 vs 2,2, $P < 0,05$). Dessa forma, infere-se que a esteatose não está linearmente relacionada à progressão da fibrose, assim como uma baixa FHG à imagem não indica necessariamente doença leve (55).

A quantificação precisa do grau de esteatose hepática geralmente não é realizada, pois requer espectroscopia de ressonância magnética (ERM) ou biópsia hepática e, mais importante, sua importância clínica é incerta. Dada a alta prevalência de DHGNA na comunidade, um dos principais problemas para o clínico é estratificar quais pacientes com DHGNA correm maior risco dessas complicações e quais devem ser priorizados para um gerenciamento intensivo (56).

Ensaio clínico têm sido realizados utilizando a RM para avaliar a resposta aos tratamentos medicamentosos para DGHNA. Análise secundária do estudo MOZART avaliou 50 pacientes recebendo 10 mg de ezetimibe ou placebo por 24 semanas para avaliar se a redução da FHG corresponderia a melhora histológica. O desfecho primário considerada resposta foi a queda de dois pontos ou mais ao escore de fibrose NAS. Entre os 35 pacientes que terminaram o seguimento, 10 preencheram o critério de melhora. Comparando o grupo de respondedores histológicos aos não respondedores, houve maior redução da FHG (-4,1% vs -0,6% respectivamente $p < 0,04$) com uma variação percentual relativa média de -29,3% vs -2% ($p < 0,004$). Entre os fatores metabólicos avaliados houve diferença estatística apenas entre os respondedores em relação ao IMC ($30,6 \text{ Kg/m}^2$ vs 35 Kg/m^2 $p < 0,01$) e HOMA-IR (4,3 vs 6,8 $p < 0,02$) (57).

Outro recente estudo publicado por Brill e cols comparou a melhora histológica e o grau de mudança da FHG medida por RM. Foram avaliados 121 pacientes nos estados do Texas e Florida (EUA) em tratamento com pioglitazona e placebo, porém não houve correlação entre a redução da FHG por RM e melhora histológica tanto no grupo tratado quanto no grupo placebo. A redução de 2 pontos no escore histológico NAS ou piora da fibrose foi similar entre os grupos que reduziram mais de 30% ou menos de 30% da FHG por RM. Comparando também o grupo que obteve resolução da esteatose por RM (FHG $< 5,56\%$) e o grupo que não obteve, não houve diferença histológica. As

variações nas concentrações séricas de ALT estiveram mais associadas com mudança em balonização à histologia do que as mudanças na FHG por RNM. Em relação aos parâmetros metabólicos e mudanças na FHG, houve associação positiva apenas com aumento do HDL ($r=0,33$ p 0,04), no entanto sem correlação com alterações em HbA1c, insulina e triglicérides (58).

Outros dois estudos com medicamentos em fase II encontraram correlação com redução da FHG e melhora histológica. Jayakumar avaliou 65 pacientes tratados com Selonsertib por 24 semanas (inibidor da serina/tironina quinase ASK-1 inibidor da cinase 1 reguladora de apoptose) associado ou não a Simtuzumab (anticorpo monoclonal contra LOXL2 lisil-oxidase like 2). Houve resposta histológica em 18% com AUROC 0,70 para resposta histológica com sensibilidade de 50% e especificidade de 81% para redução da FHG maior ou igual a 25%. Houve também correlação entre os que tiveram redução da FHG maior ou igual a 25% com melhora na inflamação lobular em 50 vs 16% (59). Harrison avaliou o tratamento ativo com Resmetiron (agonista TRH beta) em 73 sujeitos avaliados em 12 e 36 semanas. A redução da FHG maior ou igual a 30% aconteceu em 37% nos respondedores histológicos vs 4% entre os não respondedores histológicos para resolução de EHNA e 65% vs 32% para redução de 2 pontos no escore NAS. Houve também entre aqueles com redução da FHG maior ou igual a 30% e maior probabilidade de melhora na inflamação e balonização (60).

Dessa forma, a predição de melhora por RM comparada à resposta histológica ainda é um ponto de discussão. Um maior teor de gordura hepática na linha de base em pacientes sem fibrose recentemente demonstrou estar associado a chances significativamente maiores de progressão da fibrose do que aqueles pacientes com menor conteúdo de gordura no fígado. Esses dados iniciais sugerem que o conteúdo de gordura no fígado pode ter significado prognóstico, especialmente no início da cascata de progressão da fibrose, mas precisa de mais confirmações. Os métodos de estimativa por RM estão implementados com sucesso no cenário clínico como uma ferramenta para quantificação de gordura. Eles são aprovados pela Food and Drug Administration e estão disponíveis comercialmente em vários fornecedores de ressonância magnética, incluindo GE Healthcare, Siemens e Philips, e agora estão mais

facilmente disponíveis em scanners mais novos (61).

2.5.2 Escores de Avaliação de Fibrose em DHGNA

A DHGNA é frequentemente assintomática por décadas antes de sua transição para EHNA, que pode se manifestar clinicamente com sintomas inespecíficos de dor vaga no quadrante superior direito, fadiga e mal-estar. Um exame físico não oferece achados patognomônicos claros, embora 5% a 18% dos pacientes com DHGNA tenham evidência de hepatomegalia à palpação abdominal. Embora a história natural da DHGNA envolva a progressão da esteatose para esteatohepatite, a progressão da doença provavelmente envolve um processo contínuo, com estágios intermediários, sem uma linha clara e distinta para a inflamação e a fibrose. Além disso, a progressão da doença pode não ser linear e apresentar uma história natural com estágios de progressão e regressão (62).

Existem dois alvos para a aplicação de biomarcadores não invasivos na DHGNA. O primeiro é a diferenciação entre esteatohepatite e esteatose simples; isso é importante, pois os prognósticos são diferentes. O segundo é a identificação da fibrose, por ser este o determinante mais importante da progressão/regressão, prognóstico e decisões de tratamento. Muitos marcadores de inflamação e apoptose dos hepatócitos, fibrose e estresse oxidativo têm sido investigados para o diagnóstico de inflamação e fibrose na DHGNA. É improvável que um único biomarcador discrimine entre esteatose simples e EHNA, pois a patogênese da EHNA é complexa e envolve múltiplas alterações biológicas. Assim, a maioria dos modelos atuais inclui várias variáveis para adicionar robustez aos modelos de previsão não invasivos. A ferritina, uma proteína intracelular presente em todas as células, aumenta em resposta a infecções e inflamações. Vários estudos têm mostrado a ferritina sérica como preditor independente de fibrose hepática avançada entre pacientes com DHGNA (62).

Os marcadores não invasivos da fibrose incluem combinação de exames laboratoriais comuns na prática clínica e índices que foram estudados em

grandes coortes de pacientes com doença hepática conforme discutiremos a seguir.

Para avaliar a DHGNA podemos utilizar escores que, embora não tenham sido desenhados para esta patologia, pois foram validados para hepatites virais, os estudos têm demonstrado boa correlação para EHNA. Estes escores podem avaliar 1) esteatose; 2) fibrose. Para avaliação de esteatose podemos utilizar as concentrações séricas de ALT (com pontos de corte utilizados para hepatite C 19 U/L para mulheres e 35 U/L para homens); BARD score (1 ponto: IMC acima de 27 kg/m², 2 pontos: AST/ALT acima de 0,8 1 ponto: diabetes); NashTest 2[®] (alfa2-macroglobulina, apolipoproteína A1, haptoglobina, bilirrubina total, GGT, AST, GGT, colesterol total e triglicérides); OW-Liver [®] (algoritmo de regressão logística baseado em um painel de IMC e 20 marcadores); HAIR score (HAS, ALT, IR index) (63).

Para avaliação de fibrose podem ser utilizados: concentrações séricas de AST; APRI (AST/plaquetas); Fibrotest (alfa2-macroglobulina, haptoglobina, apolipoproteína A1, GGT, bilirrubinas); FIB-4 (idade, AST, ALT, plaquetas); 5) NAFLD fibrosis (idade, IMC, DM, AST, ALT, plaquetas, albumina). Alguns destes algoritmos tem custo e, quanto mais critérios utilizados, maior o custo (63).

Dentre os vários escores citados acima, O FIB-4 trata-se de um escore simples e de baixo custo que incorpora a idade do paciente, concentrações séricas de AST, ALT e contagem de plaquetas para avaliar a fibrose na seguinte equação: Idade (anos) x AST (U/L)/Plaquetas em 10⁹(U/L)X $\sqrt{\text{ALT}}$. O FIB-4 demonstrou ser melhor na predição de fibrose avançada quando comparado a outros modelos de predição. FIB-4 também é útil na previsão de prognóstico em pacientes com DHGNA (63,64). A figura 3 sintetiza os 3 escores de avaliação de fibrose mais facilmente aplicados na prática clínica.

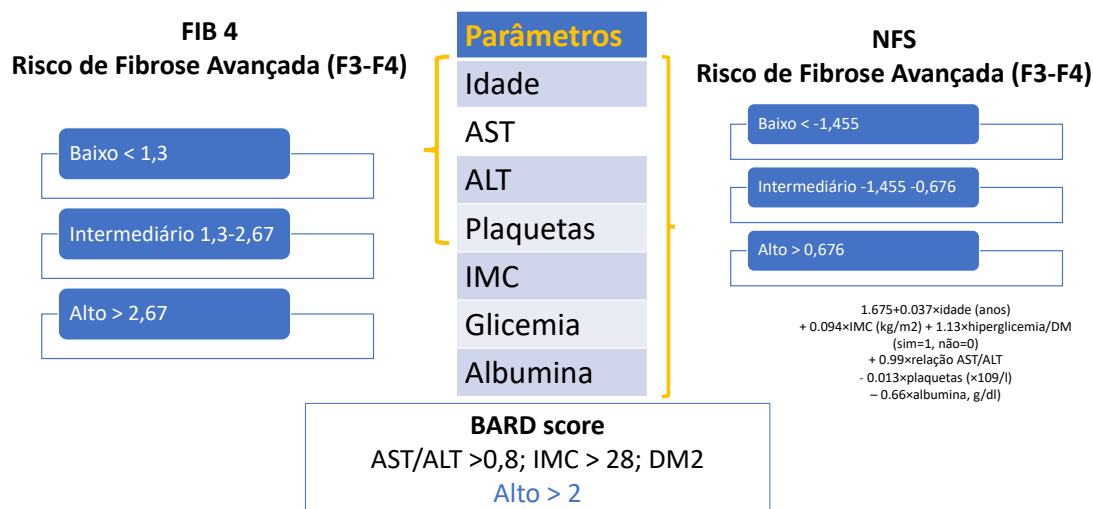


Figura 3 – Escores de Avaliação de Fibrose. *FIBROSIS 4* (FIB-4); AST – aspartato aminotransferase; ALT- alanina aminotransferases; IMC índice de massa corporal; DM2 diabetes mellitus tipo 2; NFS *NAFLD Fibrosis Score*. Fonte: autora.

Estudo realizado através de banco de dados de 541 adultos com DHGNA, para comparar o FIB-4 com outros seis escores de avaliação de fibrose, o FIB-4 foi superior quando avaliados as características do teste nas curvas características operacionais do receptor (AUROC) do FIB4 e demais escores. A sensibilidade e especificidade foram de 90%, 80% de valor preditivo positivo e 90% de valores preditivos negativos foram determinados juntamente com pontos de corte para fibrose avançada. O escore mediano de FIB4 foi de 1,11 (IQR = 0,74 a 1,67). O AUROC para FIB4 foi 0,802 (IC 95%: 0,758, 0,847), que foi superior ao do escore de fibrose DHGNA (0,768 IC: 0,720-0,816, $p = 0,09$), Goteburg University Cirrhosis Index (0,743, CI: 0,695– 0,791, $p < 0,01$), AST: ALT (0,742, IC: 0,690-0,794, $p < 0,015$), AST para índice de razão plaquetária (0,730, IC: 0,681-0,779, $p < 0,001$), AST para relação plaquetária (0,720, 0,669–0,770, $p < 0,001$), escore BARD (0,70, $p < 0,001$) e escore discriminante para cirrose (0,666, IC: 0,614–0,718, $p < 0,001$). Para uma especificidade fixa de 90% (FIB4 = 1,93), a sensibilidade de identificar fibrose avançada foi de apenas 50% (IC95%: 46-55). Um FIB4 $\geq 2,67$ teve um valor preditivo positivo de 80% e um índice FIB4 $\leq 1,30$ apresentou um valor preditivo negativo de 90% (64).

Estudo brasileiro realizado em Curitiba, avaliando 67 pacientes submetidos a biópsia hepática, associados a dados laboratoriais, avaliaram outros três modelos matemáticos APRI, FORNS e NAFLD Score. A melhor acurácia diagnóstica foi obtida com o modelo FIB 4 (AUROC = 0,83). A sensibilidade e a especificidade variaram entre 50,0% e 68,2% e 79,3% e 94,6%, respectivamente. A melhor especificidade foi alcançada com o modelo FIB 4 (65).

No entanto, pouco se conhece sobre a sensibilidade de escores em pacientes com DM2 uma vez que a resistência insulínica e outros mecanismos fisiopatológicos relacionados ao DM2 podem interferir na acurácia dos testes. Nesse sentido, Brill e cols avaliaram a performance de seis escores conhecidos em 213 pacientes com diabetes tipo 2. Nessa coorte, a prevalência de DHGNA foi de 76%. Este estudo comparou os testes para EHNA: 1) ALT; 2) citoqueratina 18 plasmática; 3) BARD score (IMC, AST/ALT, diabetes); 4) NashTest 2[®] (alfa2-macroglobulina, apolipoproteína A1, haptoglobina, bilirrubina total, GGT, AST, GGT, colesterol total e triglicérides); 5) OW-Liver[®] (algoritmo de regressão logística baseado em um painel de IMC e 20 marcadores); 6) HAIR score (HAS, ALT, IR index) e testes para avaliação de fibrose: 1) AST; 2) APRI (AST/plaquetas); 3) Fibrotest (alfa2-macroglobulina, haptoglobina, apolipoproteína A1, GGT, bilirrubinas); 4) FIB-4 (idade, AST, ALT, plaquetas); 5) NAFLD fibrosis (idade, IMC, DM, AST, ALT, plaquetas); 6) Propeptídeo colágeno tipo 3 (Pro-C3). Os pacientes foram submetidos a biópsia hepática e comparados os testes quanto a sensibilidade, especificidade, VPN, VPP e área sob a curva ROC. Para EHNA, nenhum alcançou AUROC acima de 0,80. Para fibrose, AST APRI e Pro-C3 obtiveram AUROC de 0,85, 0,86 e 0,90 respectivamente, e FIB-4 obteve a melhor combinação de sensibilidade (80%) e especificidade (94%). Para fibrose avançada (a partir de F2), AST < 26 UI/L excluiu 44% dos pacientes e Pro-C3 < 10 ng/ml excluiu 19%. Desses apenas 37% foram submetidos a biópsia e 44% apresentaram fibrose avançada. Os autores sugerem que a baixa performance dos testes deve ser interpretada com cautela, uma vez que esta coorte apresentou vários pacientes com fibrose em estágio inicial, diferente do encontrado em clínicas de hepatologia (66).

Outro estudo do mesmo grupo de autores avaliou os seguintes testes em pacientes com DM2 e DHGNA avaliados por RMS e biópsia hepática: 1) Steatotest; 2) Acti-test; 3) Nash-test e 4) Fibrotest. A avaliação de 220 pacientes com DM2 em uso de metformina, sulfonilureias e/ou insulina mostrou resultados semelhantes ao do estudo anterior. Nenhum dos testes conseguiu obter AUROC acima de 0,80. Para os pacientes com EHNA definida, o Nash-test classificou corretamente apenas 30% dos pacientes (AUROC 0,69). Não houve diferença para parâmetros como idade, sexo, etnia, obesidade e controle do diabetes (67).

No entanto, os testes citados acima têm custo elevado e por isso pouco utilizados na prática clínica. O escore BARD, considerado alterado se 2 ou mais, são escores mais práticos e de menor custo e têm obtido boa correlação em estudos comparando-o aos escores de fibrose. Estudo realizado em Dublin avaliando 126 pacientes através do BARD e NAFLD fibrosis score mostrou sensibilidade de 88,89% vs 96%, especificidade de 88,89% vs 83,87%, VPP 68,57% vs 70,59%, VPN 96,70 vs 98,11% e AUROC 0,865 vs 0,919, respectivamente (68).

Estudo brasileiro realizado em Curitiba por Nassif e cols avaliou retrospectivamente 597 pacientes submetidos a cirurgia bariátrica através de biópsia hepática correlacionando com escore BARD. Os pacientes com escore BARD igual ou superior a 2 eram comparados aos demais. Escore de 2 a 4 pontos esteve associada a fibrose severa com OR de 9,78 (IC 1,3-74,1) VPN 98,68%. Entre os 76 pacientes com escore BARD de 1 ponto apenas 1 apresentou fibrose moderada (69).

Há uma lacuna na literatura sobre os pontos de corte para os escores em EHNA, pois estes não foram elaborados para esta patologia. Assim a maioria das performances dos testes não foi avaliada em obesidade, embora a obesidade seja uma das principais comorbidades associadas. O estudo de Ooi e cols avaliou a performance dos vários escores citados acima em 101 pacientes avaliados por biópsia antes de serem submetidos a cirurgia bariátrica. Neste estudo, a melhor performance para avaliação de fibrose foi obtida com índice FORN (AUROC 0,724 p 0,0001). Quando o ponto de corte de FORN foi reduzido de 6,9 para 3,5 houve melhora da sensibilidade (78,2% para 82,6%) e do VPN

(85,3% para 93,1%). Quando modificados os pontos de corte todos os escores obtiveram VPN 85% (70).

Revisão sistemática conduzida por Xiao e cols revelou que para fibrose significativa (F2-F4), a análise de 30 estudos envolvendo 4619 pacientes, o APRI, FIB4, Fibroscan e RM com elastografia obtiveram a melhora AUROC 0,76, 0,73, 0,82 e 0,92 respectivamente. Para avaliação de fibrose avançada (F3-F4), 59 estudos com 12558 pacientes submetidos a biópsia hepática, os escores e exames de imagem obtiveram um sumário de especificidade acima de 85% e APRI (ponto de corte 1,5) e FIB4 (ponto de corte 2,67) obtiveram sensibilidade 95%. Para detecção de cirrose, o Fibroscan e a ERM tiveram a melhor AUROC 0,94 e 0,97 respectivamente (71).

Os escores discutidos acima são melhores para excluir pacientes com fibrose avançada devido ao seu alto valor preditivo negativo, mas apresentam baixos valores preditivos positivos, o que sugere que sejam importantes para evitar biópsias desnecessárias. Os valores de corte do FIB4 menor que 1,30 e maior que 2,67 ou 3,25 apresentam boa acurácia. No entanto, aproximadamente 30% dos pacientes vão apresentar valores indeterminados e fatores como diabetes mellitus, obesidade e prevalência de fibrose podem influenciar a performance diagnóstica dos testes (72,73).

O PRO-C3, marcador de formação de colágeno tipo III, foi incorporado em um algoritmo para a formação do escore ADAPT associado à idade, presença de diabetes e contagem de plaquetas com AUROC 0,86 (IC 0,79-0,81) em uma coorte de 281 sujeitos submetidos à biópsia hepática (74), configurando o escore de maior acurácia. Porém este marcador é de alto custo e pouco disponível. Um recente estudo, avaliou a performance de ADAPT e FIB4 em uma coorte de pacientes com diferentes graus de obesidade para avaliar a se a sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e AUROC dos diferentes escores (APRI, BARD, FIBC3, MACK3) modificariam com a presença de obesidade ajustando o NFS score por IMC (75).

Este estudo transversal comparou 378 sujeitos com IMC mediano de 40,3 kg/m² (36-44,7) com 859 sujeitos com IMC mediano de 28-29,8 kg/m² (amostra da Suécia mediana 28 kg/m² e italiana 29,8 kg/m²). Quando ajustado por o NFS o ponto de corte do NFS -1,455 reduziu a especificidade de 88% para 79%

comparando os grupos com IMC abaixo de 25 e IMC acima de 40 kg/m² e para o corte de 0,676 a especificidade reduziu de 98 para 68% (ambos $p < 0,001$). Os escores ADAPT e FIB4 não tiveram perda de especificidade ou outras métricas por não usarem IMC como variável (75).

Este estudo reiterou a importância do escore FIB4, baixo custo e facilmente aplicável em indivíduos com DM2 e obesidade para avaliação de fibrose levando a recente publicação para alerta para uso na prática clínica (76).

2.5.3 Citoqueratina 18

A dosagem sérica do fragmento sérico de citoqueratina 18, que reflete a apoptose de hepatócitos, é outro biomarcador de EHNA, com acurácia geral modesta. A citoqueratina 18 tem sido mais estudada por refletir a ativação das vias apoptóticas dos hepatócitos, um gatilho para início de EHNA e progressão para fibrose. É possível detectar no plasma os fragmentos de CK-18 clivados pela caspase. Sua clivagem pela caspase 3 pode ser detectada quando exposta a sítios específicos de ligação e esta dosagem pode ser feita pela ligação com o anticorpo M30 que sinaliza autofagia e necrose e também pela ligação com o anticorpo M65. Este último pode detectar o fragmento de CK-18 não-clivado, podendo identificar estágios mais iniciais de fibrose, com maior AUROC que do M30 (77).

Estudo conduzido por Sanyal e cols avaliou a mudança no baseline da dosagem sérica de CK-18, ALT, conteúdo hepático de gordura medido por RM e escore EHL – *Enhanced Liver Fibrosis* (T1MP – inibidor tecidual metaloproteinase matriz 1, ácido hialurônico e P3NP – peptídeo aminoterminal procolágeno 3) em pacientes com diabetes mellitus tipo 1 (182 pacientes) DM2 (339 pacientes) em uso de insulinas glargina e peglispro. Tanto a dosagem inicial de CK-18 quanto o conteúdo hepático de gordura foram menores na avaliação inicial dos pacientes com DM1 comparados aos pacientes com DM2. As correlações séricas foram positivas para DM1 apenas de ALT e EHL. Para os pacientes DM2 o conteúdo hepático de gordura e CK-18 correlacionaram positivamente com ALT e EHL. Não houve diferença entre os tipos de insulina utilizados (77).

A disponibilidade para a dosagem de CK-18 é baixa e o custo é alto. Conforme citado anteriormente, os fragmentos de colágeno (propeptídeos de colágeno tipo III, V e procolágeno VI) tem sido estudados para detecção de fibrose em pacientes com DM2 com bom desempenho diagnóstico (78).

2.6 AVALIAÇÃO LABORATORIAL DA FUNÇÃO HEPÁTICA

2.6.1 Enzimas Hepáticas

Os pontos de corte para a função hepática normal em DHGNA ainda não foram estabelecidos de forma definitiva. Estudos recentes mostram que, a evolução de DHGNA para fibrose significativa é cerca de 45%, 24% para fibrose avançada e 9,4% para cirrose, significativamente menor comparada às hepatites virais, hepatite B 56,6%, 33,5% e 18,4% e hepatite C 57%, 35% e 13% respectivamente (79).

AST e ALT são enzimas presentes nos hepatócitos e liberadas para a circulação sanguínea quando há lesão celular (hepatite) ou morte. ALT é considerada mais específica para doença hepática devido a suas baixas concentrações em tecidos não-hepáticos e elevações não relacionadas ao fígado são muito incomuns. AST, por sua vez, é encontrada também no esqueleto, músculo cardíaco e músculo liso e pode estar elevada em pacientes com infarto do miocárdio ou miosite. Embora a ALT seja um indicador mais específico de lesão hepática, AST é um indicador mais sensível em condições como doença hepática alcoólica e em alguns casos de hepatite autoimune (79).

Embora concentrações séricas anormais de AST ou ALT sejam preditores de função hepática alterada, o Estudo de Avaliação de Investigação de Função Hepática Alterada (ALFIE *Abnormal Liver Function Investigation Evaluation*) realizado em Tayside na Escócia revelou que o índice detecção foi marcadamente baixo, com apenas 3,9% dos indivíduos com alteração nas enzimas com posterior diagnóstico de doença hepática significativa dentro do período de cinco anos de investigação (80).

A elevação persistente das concentrações séricas de ALT pode sugerir a presença de esteatose hepática e/ou esteatohepatite, mas a doença avançada pode apresentar concentrações séricas normais de aminotransferase, refletindo

a baixa sensibilidade e especificidade do uso do biomarcador de ALT isolado no diagnóstico e estadiamento da doença. Estudos sugeriram que concentrações séricas normais de ALT são encontradas em 30% a 60% dos pacientes com esteatose hepática confirmada por biópsia. Além disso, lesões hepáticas de baixo grau podem ser perdidas devido a faixas de referência de laboratório inapropriadamente altas para ALT, e cortes menores para definir concentrações séricas normais de ALT poderiam melhorar a sensibilidade (80).

As aminotransferases plasmáticas elevadas devem levar em consideração a DHGNA. Embora não seja diagnóstico, a ALT geralmente é maior que a AST. Na maioria dos pacientes, um ALT ≥ 40 UI/L é geralmente um indicador de esteatohepatite ativa, enquanto o aumento do AST (≥ 26 UI / L e definitivamente se ≥ 40 UI / L) é mais um indicador de fibrose avançada, embora as aminotransferases plasmáticas tenham apenas uma correlação modesta com a gravidade da esteatohepatite ou fibrose. Ressalta-se que o valor considerado normal de ALT é ≤ 19 UI/L para mulheres e ≤ 30 UI/L em homens, embora muitos laboratórios comerciais ainda relatam “aminotransferases plasmáticas anormais” como > 40 UI/L. Esse ponto de corte carece de sensibilidade para descartar com segurança DHGNA/EHNA (81).

A relação AST:ALT superior a 1 indica fibrose avançada ou cirrose, e esta utilidade persiste mesmo quando, em adultos, ambos os valores estejam dentro da referência. O limite superior da normalidade de enzimas hepáticas (principalmente ALT) pode ser muito elevado, o que provavelmente pode levar a pacientes com DHGNA oculta sejam perdidos, por estar dentro da “faixa normal”. Isto é bem demonstrado em pacientes com hepatite B crônica quando os guidelines recomendam tratamento para valores superiores a 30 U/L em homens e 19 U/L em mulheres (79).

Esse valor de corte alto foi demonstrado em estudo de Portillo-Sanchez e cols avaliando 102 pacientes com obesidade, DM2 e DHGNA e 56% dos pacientes mesmo que a ALT fosse ≤ 40 UI/L. Como os pacientes com diabetes apresentam um risco alto de progressão da doença, sugeriu-se que a investigação de DHGNA deveria ser feita mesmo com aminotransferases plasmáticas normais (82).

Revisão sistemática e metanálise feita por Ma e cols incluindo 6 estudos de coorte retrospectivos, 3 estudos de coorte prospectivos e 2 análises transversais, em 6 estudos eram pacientes com EHNA incluindo 1023 indivíduos com DHGNA e ALT normal. A proporção resumida de pacientes com EHNA com ALT normal no total de pacientes com EHNA foi de 19% (IC95%: 13–27%). A proporção resumida de pacientes com EHNA com valor normal de ALT na América do Norte foi de 0,25 (IC 95%: 0,19–0,33), maior que na Ásia 0,04 (IC 95%: 0,01–0,24, I2 = 85,0%) e na Europa 0,19 (95 % IC: 0,11–0,30, I2 = 81,0%) (83).

A proporção resumida de pacientes com EHNA com valor normal de ALT no grupo de diagnóstico por RM foi de 0,30 (IC 95%: 0,2-0,37), maior que no grupo de diagnóstico histológico 0,17 (IC 95%: 0,12-0,25, I2 = 77,0 %). A proporção resumida de pacientes com EHNA com valor normal de ALT em mais de 300 grupos de tamanho foi de 0,20 (IC 95%: 0,12–0,32, I2 = 91,0%), igual à proporção em menos de 300 grupos de tamanho 0,20 (IC 95%: 0,15-0,26, I2 = 0%). Os resultados mostraram que os pacientes com DHGNA com valor normal de ALT possuem forte relação com DM2 (OR = 2,30, IC 95%: 1,38–3,82; P <0,01), hipertensão (OR = 2,03, IC 95%: 1,47–2,80; P <0,56) e síndrome metabólica (OR = 1,42, IC 95%: 1,00–2,00; P = 0,60) (83).

Além disso, a ALT normal foi associada ao sexo (masculino versus feminino; OR = 0,73, IC 95%: 0,40–1,32; P <0,01), o que sugeriu que pacientes com DHGNA do sexo feminino são mais propensas a ter o valor normal da ALT. Com relação à histologia hepática, os resultados indicaram que a ALT normal estava relacionada ao grau de esteatose (1 vs 2–3; OR = 4,30, IC 95%: 2,35–7,87; P = 0,10) e inflamação lobular (0 –1 vs 2–3; OR = 3,35, IC 95%: 1,52–7,34; P = 0,36) em pacientes com DHGNA (83).

A fosfatase alcalina (FA) é uma enzima principalmente produzida no epitélio biliar hepático, mas também encontrada em abundância no osso, e em menores quantidades nos intestinos, rins e células brancas sanguíneas. Seus valores se elevam patologicamente em doenças ou fraturas ósseas, doenças coleostáticas do fígado ou congestão hepática secundária a insuficiência cardíaca direita. A diferenciação da origem da elevação dos valores séricos de fosfatase alcalina pode ser feita pela dosagem da gamaglutamiltransferase (GGT). Esta

enzima é encontrada abundantemente no fígado, mas também em intestino, próstata e pâncreas, porém não nos ossos. Dessa forma, uma elevação isolada da fosfatase alcalina, sugere doença óssea (Paget ou metástase), deficiência de vitamina D ou criança em fase de estirão de crescimento, sem indicar lesão de hepatócitos (79).

A gamaglutamiltransferase (GGT), por sua vez, tem como causas mais comuns de elevação a obesidade, ingestão excessiva de álcool ou hepatite medicamentosa. Embora a elevação das concentrações séricas de GGT tenha pouca especificidade para doença hepática, em conjunto com AST e ALT, pode ser um melhor preditor de morte hepatocelular. A adição de dosagem de GGT ao painel de investigação hepático aumenta a chance de 15 a 30% de um adulto encontrar doença hepática e, notadamente, sua elevação tem sido associada a aumento da mortalidade por todas as causas, com maior risco quanto maior a elevação (79).

2.6.2 Avaliação da Função Hepática

Para a avaliação da função hepática, os marcadores estabelecidos incluem as concentrações séricas de bilirrubinas, albumina e tempo de protrombina (TP), este último envolve a síntese dos fatores de coagulação II, V, VII, IX e X. A função hepática de coagulação apenas será alterada quando mais de 70% do tecido hepático for comprometido, resultando em coagulopatia. Neste caso, o diagnóstico diferencial consiste na pesquisa de deficiência de vitamina K, que pode acontecer no contexto de má-absorção ou de colestase crônica. Quando se instala a fibrose no parênquima hepático, a trombocitopenia aparece com consequência de múltiplos fatores relacionados a doença hepática crônica avançada: redução da síntese de plaquetas, sequestro esplênico e aumento da destruição. Adicionalmente, há supressão da medula óssea marrom, redução da síntese de trombopoetina e destruição das plaquetas por fibrinólise, translocação bacteriana e tensão de cisalhamento (79).

Embora estudos clínicos prospectivos recentes sugiram que pacientes diagnosticados com DHGNA têm um risco aumentado de desenvolver trombocitopenia, uma correlação real parece ser reproduzível apenas nos estágios fibróticos avançados da doença, sendo um ponto ainda bastante controverso. Os pacientes diagnosticados com DHGNA/EHNA geralmente

apresentam aumento do volume médio de plaquetas, um indicador de ativação plaquetária, que demonstrou correlação direta com a gravidade da inflamação e o grau de fibrose, enquanto os pacientes com alcoolismo a doença hepática relacionada parece exibir ativação reduzida de plaquetas e capacidade de agregação. No entanto, em outro estudo, os pacientes com cirrose hepática relacionada ao álcool apresentaram uma diminuição na contagem de plaquetas, mas um volume médio plaquetário significativamente aumentado em comparação com pacientes controle ou pacientes com doença hepática gordurosa relacionada ao álcool (84).

O estudo BALLETS (*Birmingham and Lambeth Liver Evaluation Testing Strategies Study*), uma coorte prospectiva de 1290 pacientes no Reino Unido, seguidos por dois anos, com alteração de função hepática, avaliados adicionalmente por US de abdome revelou que menos de 5% da coorte apresentava doença hepática específica. Dessa forma, o estudo recomenda que a avaliação hepática inicial seja realizada a avaliação das concentrações séricas de ALT, AST, GGT, albumina, bilirrubinas em conjunto com a contagem de células de sanguíneas se não tiver sido realizada nos últimos 12 meses (85).

2.6.3 Ferritina

A ferritina é um invólucro intracelular de proteínas que contém cerca de 4000 átomos de ferro. Há cerca de 3 a 4 g de ferro em um adulto humano e a maioria é incorporada ao heme que forma a hemoglobina, que transporta oxigênio nos glóbulos vermelhos. Um intervalo de referência é definido como um conjunto de valores de intervalo nos quais 95% da população-alvo se enquadra. Convencionalmente, o intervalo de referência para ferritina sérica (FS) é considerado de 30 a 300 µg/L para homens e mulheres na pós-menopausa e 15 a 200 µg/L para mulheres na pré-menopausa (86).

A ferritina é uma proteína intracelular de distribuição ubíqua que se liga ao ferro e o libera de maneira controlada, e seus níveis séricos aumentam em resposta à inflamação. Os níveis de ferritina sérica demonstraram ser um preditor independente de fibrose hepática avançada entre indivíduos com DHGNA (86).

A hepcidina, um peptídeo cujo gene está localizado no cromossomo 19, é sintetizada e secretada por várias células, sendo os hepatócitos seu principal sítio de produção. A hepcidina exerce sua função através da sua ligação à ferroportina, uma proteína presente na membrana celular de macrófagos, enterócitos, hepatócitos e sinciciotrofoblastos placentários, impedindo a saída de ferro das células. Após a formação do complexo hepcidina-ferroportina, este é internalizado e posteriormente degradado nos lisossomas. Vale ressaltar que a ferroportina é o único poro por onde ocorre a saída de ferro das células. Embora a ferroportina seja um transportador de outros metais como manganês, zinco e cobalto, sua maior afinidade é com o ferro (87).

O excesso de ferro é uma causa potente de lesão celular causada pelo estresse oxidativo devido à geração de espécies reativas de oxigênio pela reação de Fenton. Em condições usuais, a proteção intracelular do estresse oxidativo induzido pelo ferro é facilitada pelo sequestro de ferro na ferritina. A homeostase total do ferro corporal é alcançada predominantemente pela regulação da liberação de ferro dos enterócitos e macrófagos duodenais pelo hormônio hepcidina (88). Embora a ferritina sérica acima de 1,5 vezes o limite superior da normalidade estar comprovadamente associada a maior probabilidade de diagnóstico de EHNA, maior grau de esteatose, inflamação lobular e balão hepatocelular, estudos adicionais de longo prazo são necessários para avaliar a relação entre os níveis séricos de ferritina e as complicações da doença hepática, como carcinoma hepatocelular e mortalidade relacionada ao fígado (89).

Em resposta a vários estímulos, como depósitos excessivos de ferro e sinais inflamatórios (IL-6), a hepcidina é superexpressa e determina uma redução na absorção intestinal de ferro e um aumento na retenção de ferro de macrófagos e hepatócitos. Além disso, a necrose dos hepatócitos, com subsequente eritrofagocitose por macrófagos, e o estado inflamatório sistêmico induzido pela obesidade e pela própria DHGNA, podem predispor os indivíduos a níveis aumentados de hepcidina (90). O progredir da lesão hepática crônica para fibrose e cirrose envolve além da ferritina, citocinas, adipocinas, fatores de crescimento e os efeitos inflamatórios e fibrogênicos de cada um diverge em diferentes tipos de células durante a fibrogênese hepática (91).

Estudo italiano avaliou 404 pacientes com DHGNA por histologia. Houve forte correlação positiva entre a ferritina e a esteatose hepática, medida por RM ou determinada histologicamente ($r\ 0,57\ p < 0,0001$ e $r\ 0,5\ p\ 0,0002$, respectivamente), com tendências semelhantes para hepcidina ($r\ 0,42, p\ 0,0024$; $r\ 0,4, p = 0,0034$) (92).

Coorte longitudinal de seguimento de 222 pacientes com EHNA definida por histologia na Suécia mostrou que os pacientes com ferritina alta (acima de 150 mcg/L para mulheres e 350 mcg/L para homens) eram mais velhos do que pacientes com níveis normais no momento da biópsia (mediana 56 vs. 47 anos, $p < 0,001$) e tinham maior prevalência de DM2, hipertensão, ALT, AST e concentrações séricas de glicose mais altas bem como pontuações mais altas nos parâmetros histológicos, com maior NAS composto e maior estágio de fibrose em comparação com pacientes com SF normal. No total, houve 51 óbitos durante o seguimento, 22 no grupo com ferritina alta e 29 no grupo com ferritina normal (25% vs. 22%, $p\ 0,60$). O risco foi semelhante entre os dois grupos durante os primeiros 15 anos após a biópsia hepática. Após 15 anos após a biópsia, o grupo com ferritina mais elevada mostrou um aumento significativo e gradualmente mais acentuado da mortalidade. Trinta anos após a biópsia, o risco foi superior a 0,10 óbitos por pessoa-ano no grupo com ferritina alta e $< 0,03$ óbitos por pessoa-ano no grupo com ferritina baixa. A taxa de risco aumentou 9% mais rapidamente a cada ano no grupo com ferritina alta (HR = 1,09, IC 95% 1,01-1,18, $p < 0,05$) (93).

Revisão sistemática realizada por Du, evidenciou que ferritina sérica elevada foi observada em pacientes com DHGNA em relação ao grupo controle (diferença média padronizada 1,01; IC95% 0,89-1,13), pacientes EHNA contra grupo controle (diferença média padronizada 1,21; IC95% 1,00-1,42), pacientes DHGNA contra grupo controle (diferença média padronizada 0,51; IC 95% 0,24-0,79) e pacientes EHNA contra pacientes DHGNA (diferença média padronizada 0,63; IC 95% 0,52, 0,75). Esses resultados permaneceram inalterados após a eliminação de estudos focados em populações pediátricas ou adolescentes (94).

Estudo coreano avaliou dados de 25.597 sujeitos recrutados pela Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição da Coreia 2007–2012. O escore de gordura hepática do NAFLD (NLFS) foi usado para definir o NAFLD: $-2,89 + 1:18$

(SM sim= 1 não=0) + 0,45 X DM2 (sim =2 não=0) + 0,15 x insulina sérica em jejum + 0,04 x AST – 0,94 x AST/ALT. A ALT foi definida como elevada para 40 UI / L para o sexo masculino e 31 UI/L para o sexo feminino. Entre os 25.597 avaliados, 9615 foram diagnosticados com DGHNA, idade média de 43,6 anos, 8,3% com DM2, 23,4% com SM. A ferritina sérica média para toda a amostra foi 116,2 ng/mL e estratificada em quartis Q1 < 62,38 ng/mL, Q2 62,38-96,97 ng/mL, Q3 96,98-147,13 ng/ml e Q4 147,12-066,14 ng/mL. Após o ajuste para várias covariáveis, os ORS (IC95%) dos níveis elevados de ALT foram 1,56 (IC95% 1,17-2,07) 1,84 (IC95% 1,39-2,45) e 4,08 (IC95%: 3,08- 5.40) para o segundo, terceiro e quarto quartis de ferritina sérica no sexo masculino (p para tendência < 0,01), 1,67 (IC 95% 1,24-2,23), 2,23 (IC 95% 1,68-2,96) e 5,72 (IC 95% 4,32– 7,60) para o segundo, terceiro e quarto quartis de ferritina sérica em mulheres (p para tendência < 0,01). As concentrações séricas de ferritina também foram significativamente associados à DHGNA e fibrose hepática, tanto em homens quanto em mulheres (95).

2.6.4 Outros Potenciais Biomarcadores: Vasopressina

Há vários outros potenciais marcadores bioquímicos para DHGNA, como a dosagem de coceptina. Esta é um marcador substituto estável da vasopressina (VP), que é liberada em resposta à osmolalidade plasmática elevada ou à pressão arterial baixa. Concentrações elevadas de coceptina plasmática estão associados a maior risco de distúrbios relacionados à resistência à insulina, como DM2, SM e doença cardiovascular, e a redução experimental de VP circulante diminuiu significativamente o conteúdo de gordura hepática em ratos com obesidade, independentemente da adiposidade corporal. Estudo realizado na Universidade Sapienza de Roma, Itália avaliou pacientes com obesidade candidatos à cirurgia bariátrica, com biópsias hepáticas intraoperatórias para o diagnóstico de DHGNA /EHNA. Para grupo controle, foram dosadas concentrações séricas de coceptina circulante em 60 indivíduos sem obesidade comparáveis a idade e sexo sem DHGNA ao US (96).

Na amostra estudada, 53% dos pacientes com obesidade apresentaram DHGNA confirmada por biópsia, e estes significativamente tinham concentrações mais elevadas de coceptina do que indivíduos com obesidade sem DHGNA e indivíduos sem obesidade (ob /DHGNA + 9,5 ± 4,9; ob / DHGNA

– $6,4 \pm 2,6$; e não ob / DHGNA– $7,4 \pm 5,1$ pmol/L; $p = 0,004$ e $p = 0,01$, respectivamente). A concentração de coceptina plasmática correlacionou-se positivamente com esteatose macro e microvesicular hepática ($r = 0,36$, $p = 0,026$; $r = 0,31$, $p = 0,05$), inflamação lobular ($r = 0,37$, $p = 0,024$). Maiores concentrações séricas de coceptina circulante obteve para predição de EHGNA, OR 1,73 (IC95% = 1,02–2,93) após ajuste multivariado para idade, sexo, função renal e presença de componentes do DM2 e da SM (96).

2.7 TRATAMENTO DA DHGNA: RECOMENDAÇÃO ATUAL

O tratamento padrão recomendado atualmente para pacientes com DHGNA é a mudança de estilo de vida com redução do peso corporal e atividade física uma vez que não há nenhuma medicação registrada para o tratamento de DHGNA/EHNA. Intervenções dietéticas e de exercícios permanecem como primeira linha de terapia, visando principalmente o controle do peso corporal e de fatores de risco cardiometabólico relacionados à SM. Nos estágios iniciais da DHGNA, uma dieta saudável e perda de peso de pelo menos 7% podem ser suficientes. Em estágios mais avançados ou variantes genéticas de alto risco ou presença de DM2, pode ser necessário, além de intervenção no estilo de vida, associar tratamento farmacológico, embora ainda não exista nenhum medicamento registrado para o tratamento da DHGNA (97).

A maioria dos ensaios clínicos que examinam o tratamento no estilo de vida na DHGNA são relativamente curtos (3 a 12 meses), aumentando a preocupação com a eficácia a longo prazo dessa abordagem, dada a recuperação do peso, que geralmente ocorre após a interrupção de uma intervenção. No entanto, efeitos persistentes foram observados em pacientes com DHGNA por até 5 anos após 6 a 12 meses de intervenção no estilo de vida, com menor ganho de peso e maior probabilidade de normalização da alanina aminotransferase e melhora sustentada do conteúdo de gordura hepática do que aqueles que não sofreram terapia de estilo de vida. É notável que dietas hipocalóricas de maior duração (3 a 6 meses), resultando em perda de peso, levam a reduções equivalentes no conteúdo de triglicérides hepáticos, independentemente de serem baixos carboidratos (10 a 30%) ou baixo teor de gordura (20%). Entre os consumidores habituais de bebidas que contêm açúcar, reduzir a ingestão de 10% para $\leq 1\%$ das calorias diárias pode ser um

componente importante do tratamento nutricional, pois reduz o conteúdo de triglicerídeos hepáticos independentemente da perda de peso (98).

A dieta e fatores ambientais são fatores fundamentais para manter uma homeostase energética normal. Como consequência ao excesso de calorias, uma expansão regular da massa gorda é crítica, mas nem sempre é prejudicial. Além do armazenamento de triglicerídeos no tecido adiposo visceral e subcutâneo, existe uma deposição semelhante de outros compostos lipofílicos, ou seja, composto desregulador endócrino (CDR), também chamados contaminantes ambientais, que desempenham um papel principal na etiologia da obesidade e em seus aspectos metabólicos relacionados. Essa bioacumulação pode ter impacto na função do tecido adiposo, mas neste caso o tecido adiposo funciona como um reservatório para os CDR, salvando outros órgãos dos danos causados por esses compostos. Alguns fatores ambientais podem contribuir para o desenvolvimento do armazenamento de gordura ectópica. As mudanças climáticas e a nutrição adaptativa são fatores centrais devido à capacidade substancial do tecido adiposo de impactar o gasto de energia e a termogênese e as diminuições relacionadas na exposição ao frio sazonal (99).

A diminuição da termogênese induzida pela dieta devido a uma dieta rica em gorduras e açúcar altamente palatável e atividade física modesta proporcionam a preponderância da obesidade e da SM. O fator mais importante que deve ser estudado em relação à causa da obesidade não é o gasto energético, mas a modificação gradual do balanço energético e o poder de regular os estoques de energia corporal. Agora, considerando que um rápido aumento da obesidade surgiu durante esse período de rápidas mudanças ambientais e culturais, é necessária uma profunda reflexão sobre os efeitos comportamentais e ambientais na regulação do balanço energético para tentar elucidar a patogênese da DHGNA (99).

A dieta Atkins é uma das dietas com baixo teor de CHO mais populares e não requer controle de calorias ou porções. Consiste em 4 fases: (i) “indução” em que a ingestão diária de CHO é limitada a 20 g ou 10% de calorias; (ii) “balanceamento” onde alguns carboidratos ricos em nutrientes, como nozes e sementes, são introduzidos sem alterar a porção de CHO; (iii) fase de “pré-

manutenção”, onde são introduzidas algumas frutas com baixo teor de açúcar, vegetais ricos em amido e grãos integrais; (iv) fase de “manutenção vitalícia”, em que a CHO varia de 40 a 120 g/dia. As proteínas animais contêm alto nível de metionina, homocisteína e cisteína, cujo metabolismo produz sulfato (transsulfuração), fração importante da carga ácida diária. O fígado é o local onde ocorre o metabolismo desses aminoácidos. A desregulação dessa via leva ao acúmulo desses aminoácidos especialmente a homocisteína, no fígado e no plasma, que provaram ser um fator de risco para DHGNA, doença cerebrovascular e fratura. A ingestão de dieta rica em proteínas derivada principalmente de produtos lácteos, com alta carga de ácido glutâmico e prolina, tem sido associada a alto risco de desenvolver diabetes. Também foi demonstrado que a alta ingestão de BCAAs em combinação com dieta hiperlipídica levou ao acúmulo de succinil e propionil-CoA, o que pode interferir na glicólise, ciclo do ácido tricarboxílico (ATC) e sensibilidade à insulina através do estresse mitocondrial. As pessoas que aderem a dietas ricas em proteínas tendem a recuperar o peso assim que o fornecimento dos alimentos é interrompido, embora tenham melhorado a saúde geral e diminuído as circunferências da cintura. Evidências recentes demonstraram que a sobrecarga de aminoácidos pode levar à inibição da sinalização da insulina e/ou resistência à insulina através da ativação do mTOR. Os efeitos da dieta rica em proteínas em pacientes com DHGNA continuam controversos. Há necessidade de ensaios clínicos randomizados mais focados, nos quais o impacto da contribuição de um único conjunto de aminoácidos na saúde deve ser investigado (100).

Estudos avaliando a dieta mediterrânea, comparada a dieta com baixo teor de gordura ou baixo teor de carboidratos ainda não demonstraram qual estratégia nutricional seria a mais adequada para reverter a resistência à insulina e reduzir a esteatose hepática. Os mecanismos moleculares envolvidos no processo da doença e a interação com a dieta também não estão esclarecidos. A dieta mediterrânea é caracterizada por uma ingestão reduzida de carboidratos, especialmente açúcares e carboidratos refinados (40% das calorias vs. 50-60% em uma dieta típica de baixa gordura) e aumento da ingestão de ácidos graxos monoinsaturados e ômega-3 (40% das calorias como gordura vs. até 30% em uma dieta típica com pouca gordura) e atualmente é a estratégia nutricional mais

recomendada (101). O Consenso Espanhol para DHGNA recomenda a dieta mediterrânea com baixas calorias e 200 minutos/ semana de exercícios aeróbicos para o tratamento (102).

Diferentes formas de exercício (exercício aeróbico, exercícios resistidos ou intermitentes de alta intensidade) parecem ter efeitos semelhantes na gordura hepática. Exercícios aeróbicos mais vigorosos não trazem benefícios adicionais para a gordura hepática em comparação com exercícios aeróbicos de moderada intensidade. Embora o exercício tenha um efeito significativo e clinicamente significativo no lipídio hepático (redução relativa de 20 a 30%), seus efeitos são modestos em comparação à redução de peso, que pode produzir 80% de redução na gordura hepática. Isso é importante, pois clinicamente, apoiar as pessoas a controlar seu peso através de abordagens dietéticas produzirá maiores alterações na gordura hepática do que apenas o exercício (103).

Nesse sentido, a mudança de estilo de vida foi avaliada pelo estudo *Look AHEAD* (Ação para a Saúde no Diabetes) multicêntrico, randomizado e controlado, desenhado para determinar se a perda de peso intencional reduz a morbidade e a mortalidade cardiovascular em indivíduos com sobrepeso e DM2. Um total de 5.145 participantes, com uma média de idade de 60 anos e IMC médio de 36 kg/m², foram aleatoriamente designados para uma intervenção no estilo de vida intensiva ou para melhorar a condição de cuidados habituais (apenas educação em diabetes). Os dois principais objetivos de intervenção foram induzir uma perda média $\geq 7\%$ do peso inicial e aumentar a atividade física (moderadamente intensa) dos participantes para ≥ 175 minutos por semana (104).

Um braço do estudo *Look Ahead* estudou a esteatose em 96 participantes com RM para quantificar a esteatose hepática em um seguimento de 12 meses. Esteatose com fração hepática de gordura acima de 5,5% foi definida como DHGNA. Os participantes eram 49% mulheres e 68% brancos. A idade média foi de 61 anos, IMC médio de 35 kg/m², FHG média de 8%, AST e ALT foram 20,5 e 24,2 U/L, respectivamente. Após 12 meses, os participantes designados para o grupo de intervenção intensiva (n = 46) perderam mais peso (-8,5 vs -0,05%; p < 0,01), tiveram um maior declínio na esteatose (-50,8 vs. 22,8%; p < 0,04) e em HbA1c (-0,7 vs. -0,2%; p < 0,04). Não houve mudanças significativas de 12

meses nos níveis de AST ou ALT. Aos 12 meses, 26% dos participantes com apenas educação em diabetes e 3% (1 de 31) dos participantes de em intervenção intensiva sem DHGNA no início do estudo desenvolveram DHGNA ($p < 0,05$) (105).

A maioria dos tratamentos medicamentosos utilizados baseiam-se em reduzir a resistência insulínica. Em pacientes com DM2 prévio, a DHGNA está associada a hiperinsulinemia mais acentuada e maior resistência insulínica no tecido adiposo e hepático independente do IMC, sexo e gordura corporal total. A intensidade da resistência insulínica está associada a maior progressão para EHNA, fibrose e mortalidade por todas as causas. O aumento do influxo de ácidos graxos livres em DHGNA desenvolve preferência pelo fígado ao tecido adiposo e está associado à maior expressão de proteínas hepáticas envolvidas na captação de 67polipoproteína67, como proteínas de translocação de ácidos graxos e translocase AG/CD36 (106).

A pioglitazona era o único o medicamento recomendado pela AASLD para pacientes com diabetes e a vitamina E pode ser considerada para aqueles sem diabetes, com comprovação histológica de EHNA (8). A justificativa para esta recomendação encontra-se no estudo PIVENS, conduzido em 247 indivíduos sem DM2, com esteatohepatite não-alcoólica divididos em três grupos (pioglitazona, vitamina E ou placebo). Houve redução da concentração sérica de alanina e aspartato aminotransferase com vitamina E e pioglitazona, melhora histológica, em comparação com placebo, porém no grupo em uso de pioglitazona houve ganho de peso (107). O guideline atualizado pela *American Association of Clinical Endocrinology Clinical Practice* em maio de 2022 em consenso com a AASLD, recomenda além da pioglitazona os análogos de GLP1 (especificamente Liraglutida dose 3 mg/semana e Semaglutida 2,4 mg/semana) para pessoas com DM2 e EHNA comprovada por biópsia. Recomendam ainda considerar o tratamento de DM2 com pioglitazona e/ou AGLP-1 quando houver uma probabilidade elevada de ter EHNA de acordo com transaminases e testes não invasivos. Com relação à benefício cardiometabólico, os inibidores de SGLT2 podem também ser considerados, embora ainda não haja evidência para o tratamento da EHNA com inibidores de SGLT2 (108).

Existem estudos com vários agentes farmacológicos com ações em diferentes vias como: 1) redução do acúmulo hepático de gordura (pioglitazona, elafibranor, saroglitazar); 2) ativação do receptor biliar farnesóide X (ácido obeticólico); 3) inibidor da lipogênese de novo (aramchol); 4) incretinas (liraglutida); 5) anti-obesidade (orlistate) e inibição da sinalização pelo TNF-alfa (pentoxifilina). Entretanto, seus efeitos são limitados e não há recomendação para uso apenas para DHGNA/EHNA (5-8).

A relação entre resistência insulínica e ácidos biliares descrita anteriormente e a diferença da composição dos ácidos biliares entre as diversas doenças que acometem o fígado e as vias biliares vem sendo demonstrado em estudos que avaliam o metabolismo dos ácidos biliares. Nesse sentido, o receptor farnesóide X (FXR), um regulador chave nuclear que controla vários processos do metabolismo hepático, tem sido alvo importante para terapia. A DHGNA tem provado estar associada a uma atividade anormal de FXR (109).

O ácido obeticólico (OCA) é um agonista seletivo de FXR de primeira classe com propriedades anticoléstáticas e hepatoprotetoras (110). O estudo FLINT (*Farnesoid X nuclear receptor ligand obethicolic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis*) avaliou em ensaio clínico randomizado, controlado por placebo, pacientes sem DM2 por 72 semanas. O desfecho primário (melhora de 2 pontos no NAS sem piora da fibrose) foi visto em 50/110 (45%) do grupo tratado vs. 23/109 (21%) do grupo placebo ($p < 0,0002$). O OCA melhorou também a esteatose hepática, inflamação, balonização de hepatócitos e fibrose (111). O prurido é frequentemente observado durante o tratamento e, em geral o motivo principal para descontinuação do tratamento. Entretanto, o OCA ainda está registrado apenas para o tratamento da colangite biliar primária (112).

Elafibranor é um agonista do PPAR- α e PPAR- δ com efeitos em redução da sensibilidade à insulina, a homeostase da glicose e metabolismo lipídico, redução a inflamação e a eficácia demonstrada em modelos de doença de DHGNA/EHNA e fibrose hepática (113). Um ensaio clínico conduzido por Ratzliff e cols avaliou pacientes com DHGNA/EHNA sem cirrose recebendo Elafibranor 80 mg (n = 93), Elafibranor 120 mg (n = 91) ou placebo (n = 92) por 52 semanas.

Na análise do tratamento, não houve diferença significativa entre os grupos Elafibranor e placebo no desfecho primário definido pelo protocolo (reversão da EHNA sem agravamento da fibrose). No entanto, a EHNA foi resolvida sem piora da fibrose em uma proporção maior de pacientes no grupo de 120 mg de Elafibranor versus o grupo de placebo (19 vs 12%; OR 2,31; IC 95% 1,02-5,24; p 0,04), com base em análise pós-ROC. Elafibranor produziu um aumento leve e reversível da creatinina sérica (114).

A pentoxifilina (PTX) é um derivado da metilxantina que tem um efeito inibitório na fosfodiesterase e no TNF α e, portanto, pode modular as funções de outras citocinas inflamatórias. Embora tenha sido usado anteriormente em um subconjunto de pacientes com hepatite alcoólica, seu uso nesses pacientes está atualmente em avaliação (115).

Embora existam um grande número de medicamentos contra a EHNA sendo testados para eficácia e segurança, nenhuma intervenção farmacológica está aprovada para o tratamento da EHNA. Informações recuperadas de fontes de dados de domínio público e clínica ClinicalTrials.gov (atualizada em dezembro de 2018), um recurso fornecido pela Biblioteca Nacional de Medicina dos EUA, indicam que aproximadamente 47 diferentes medicamentos que têm como alvo a DHGNA, EHNA associada a fibrose estão sendo testadas em diferentes estágios farmacológicos, incluindo 188 medicamentos na fase 1 e 162 em estudos de fase 2. Uma solução potencial para esse atraso esperado seria o reaproveitamento ou reposicionamento de drogas, que se baseia na identificação e desenvolvimento de novos usos para os medicamentos existentes (116).

A seguir discutiremos os principais mecanismos de ação dos tratamentos medicamentosos recomendados até o momento.

2.7.1 Pioglitazona

O mecanismo de ação da pioglitazona consiste em redução da resistência periférica a insulina nos tecidos, ativando o receptor ativador proliferador de peroxissomo gama (PPAR-gama), controle principal da homeostase energética. Sua ativação leva a transcrição de genes que sensibilizam a ação da insulina em

tecidos periféricos, principalmente em músculo esquelético e tecido adiposo, e em menor grau no fígado, por meio da expressão do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4), adiponectina, resistina, fator de necrose tumoral, entre outros. O receptor PPAR quando inativado, tanto in vitro como in vivo, resulta em resistência à insulina. Alguns efeitos protetores vasculares também podem ser alcançados, uma vez que as glitazonas ativam a cascata AMPK/eNOS, reduzindo assim o estresse oxidativo (117).

Os mecanismos moleculares sobre a esteatose hepática (EH) ainda estão sendo elucidados, um recente estudo comparou 13 camundongos com esteatose induzida por dieta hiperlipídica (8 recebendo pioglitazona e 5 sem pioglitazona) e 5 camundongos com dieta rica em carboidratos. Os resultados mostraram que a EH induzida por dieta hiperlipídica foi significativamente reduzida com pioglitazona pelos seguintes desfechos: redução do acúmulo de gordura hepática (517,3 vs 235,6 mg/g p 0,005), redução da ALT (18,12 UI/L vs 9,78 UI/L p 0,06) e redução da insulina (2,67 vs 0,66 p 0,024). Houve também aumento da expressão hepática de proteínas relacionadas à lipólise citosólica, beta-oxidação e autofagia (118).

Entretanto, alguns efeitos colaterais dependentes da ativação do receptor, ou talvez intrínsecos a medicação, como retenção de fluidos, ganho de peso, insuficiência cardíaca congestiva, hepatotoxicidade e fratura óssea, são observados. Com relação às fraturas, pode ser explicado por expressão da PPAR no estroma da célula óssea, que altera o turnover e diferenciação de osteoclastos, com menor diferenciação em osteoblastos, implicando em alteração mesenquimal e diminuição da formação óssea. Além do efeito adverso ósseo, a pioglitazona tem sido suspeita de estar associada ao câncer de bexiga, embora esses efeitos não tenham sido comprovados em estudos de seguimento (119,120,121).

A pioglitazona melhora a aterogênese e os eventos cardiovasculares em pacientes com DM2 e grandes estudos divergem quanto a mortalidade em comparação com outros medicamentos para diabetes. Não houve redução na mortalidade cardiovascular com pioglitazona em comparação com sulfonilureias em pacientes com DM2 em um grande ensaio clínico realizado na Itália. O ganho

de peso (menos de 2 kg em média), insuficiência cardíaca, câncer de bexiga e fraturas também não foram significativamente diferentes entre os grupos de tratamento. Para uma população com alto risco cardiovascular, os benefícios metabólicos da pioglitazona são frequentemente negligenciados devido ao receio de ganho de peso a longo prazo (3 a 5% dos pacientes), edema nas extremidades inferiores (cerca de 5% dos pacientes) e o citado potencial perda óssea (122).

O anteriormente citado ensaio clínico randomizado PIVENS com três braços de tratamento (pioglitazona 30 mg, vitamina E 800 UI e placebo) foi estudo responsável pela indicação do uso de pioglitazona em EHNA em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 devido aos resultados de melhora de transaminases e histológica, com resolução da EHNA em 36% (107).

Um recente ensaio clínico randomizado foi conduzido por Bril e cols, multicêntrico, controlado por placebo reavaliou esses efeitos em uma população de veteranos nos EUA, com diagnóstico prévio de DM2. Os grupos foram divididos: vitamina E (400 UI duas vezes ao dia), pioglitazona + vitamina E (30 ou 45 mg) e placebo. Entre o grupo de 105 pacientes (apenas 12 mulheres) houve melhora histológica significativa apenas com pioglitazona (54% vs 19% p 0,003), não-significativa com vitamina E (31% vs 19% placebo p 0,26). Com relação aos parâmetros metabólicos, houve ganho de peso no grupo pioglitazona e vitamina E, média de ganho de 5,7 kg em 18 meses (p <0,001), significativa após o quarto mês de tratamento, atingindo um platô aos 14 meses de seguimento. A resolução da EHNA foi alcançada em 42%, similar aos 36% do estudo PIVENS. Neste estudo não foi avaliado se a combinação oferece maior benefício ao uso isolado de pioglitazona (123).

São aguardados novos estudos comparando pioglitazona com outros medicamentos novos como o estudo de Ozaki e cols no Japão que irá comparar pacientes com DGHNA definida por RNM para receber 20 mg de tofogliflozina ou pioglitazona 15-30 mg por dia por 24 semanas (124).

Os diferentes isotipos de PPAR são também alvo importante de estudos. Os genes alvo mais importantes do PPAR- α estão relacionados ao catabolismo β -oxidativo peroxissômico e mitocondrial de ácidos graxos, cetogênese e fatores de transcrição nuclear ligados à inflamação e lipogênese. O PPAR- α ativa a

carnitina palmitil-CoA transferase 1 A (CPT1A), um importador de ácidos graxos para as mitocôndrias que estimula mais enzimas a jusante na via da oxidação mitocondrial, como a cadeia média da acil-CoA desidrogenase (ACADM) e a cadeia muito longa da acil-CoA desidrogenase (ACADVL). Consequentemente, o PPAR- α cumpre um papel fundamental durante o jejum devido à sua capacidade de aumentar a produção de energia celular através da produção de ATP e cetogênese. Os efeitos anti-inflamatórios da estimulação com PPAR- α são atribuídos à sua ligação com NF- κ B e AP-1. Em camundongos knockout para a proteína de ligação ao elemento responsivo a carboidratos (ChREBP) - / - e PPAR- α , foi demonstrado que o PPAR- α conversa com o ChREBP, um fator de transcrição lipogênica sensível à glicose, para regular a expressão do FGF 21. Este é uma hepatocina que melhora a sensibilidade à insulina e o metabolismo lipídico e controla a preferência pela sacarose. A proteína de ligação ao elemento regulador de esterol (SREBP) 1, que é a variante sensível à insulina do ChREBP, está separada do receptor X do fígado, que também é regulado pelo PPAR- α . A ativação crônica de PPAR- α em camundongos resulta na regulação positiva dos genes a jusante SREBP1, enquanto isso não pôde ser observado em camundongos SREBP1-/- . Consequentemente, o PPAR- α funciona como um sensor crítico para manter a homeostase da energia celular por meio de vias catabólicas e anabólicas. Dessa forma, parece haver forte correlação entre a prevalência da síndrome metabólica e a DHGNA (125).

2.7.2 Vitamina E

O mecanismo farmacológico para a utilização da vitamina E em EHNA é o seu efeito intrínseco antioxidante, considerando que o estresse oxidativo é um mecanismo chave no dano hepatocelular. Atualmente, pode ser avaliada para o tratamento da DHGNA, de acordo com a AASLD e ACCE, em pacientes com biópsia comprovada e sem diabetes mellitus (8,104). O uso de vitamina E está associado à diminuição de aminotransferases em indivíduos com EHNA. O estudo PIVENS, citado anteriormente, a forma pura de α -tocoferol foi administrada por via oral na dose de 800 UI/dia por 96 semanas alcançou o desfecho primário foi alcançado em um número significativamente maior de participantes que receberam vitamina E em comparação com placebo (42% vs.

19%; $p < 0,001$) (107).

Em crianças, foi conduzido o ensaio clínico *Treatment of NAFLD in Children* (TONIC), que testou vitamina E (800 UI / dia) ou metformina (500 mg duas vezes ao dia) contra placebo em 173 crianças entre 8 e 17 anos, com DHGNA confirmada por biópsia, a resolução de EHNA foi significativamente maior em crianças tratadas com vitamina E do que em crianças tratadas com placebo (58% vs. 28%; $p 0,006$) (126).

No ensaio clínico randomizado já citado conduzido por Bril e cols, o grupo de DM2 que recebeu vitamina E isolada não apresentou melhora histológica não-significativa com vitamina E (31% vs 19% placebo $p 0,26$), mas significativa com a associação com pioglitazona (54% vs 19% $p 0,003$). Para vitamina E houve melhora no escore histológico apenas para esteatose, mas não para fibrose. Com relação aos parâmetros metabólicos, não houve ganho de peso no grupo que recebeu a vitamina E, ao contrário do grupo com pioglitazona conforme já visto em outros estudos (123).

No entanto, persistem incertezas sobre a segurança a longo prazo da vitamina E com relação ao aumento da mortalidade por todas as causas e modesto aumento no risco de câncer de próstata. A recomendação da AASLD orienta a discussão com os pacientes a respeito de risco-benefício (8).

2.7.3 Cirurgia Bariátrica

A cirurgia bariátrica pode ser considerada uma opção para tratar DHGNA devido aos benefícios cardiometabólicos e de mortalidade por todas as causas em DHGNA em sujeitos com um IMC igual ou superior 35 kg/m² (32,5 ou kg/m² em populações asiáticas), particularmente se o DM2 estiver presente (104).

A cirurgia bariátrica tem o potencial de induzir grande perda de peso com consequente melhora da fisiopatologia da síndrome metabólica e DM2. Dados recentes demonstraram efeitos significativos da cirurgia bariátrica sobre o GLP-1 e outros hormônios intestinais e importantes anormalidades metabólicas e inflamatórias lipídicas na fisiopatologia da DHGNA. Três mecanismos primários estão envolvidos no controle glicêmico melhorado associado aos procedimentos de derivação gástrica com reconstrução intestinal em Y de Roux (DGYR) e

gastrectomia vertical (ou sleeve): (1) melhora precoce da sensibilidade à insulina hepática devido à restrição calórica pós-operatória; (2) sensibilidade periférica à insulina melhorada tardiamente devido à perda de peso; e (3) melhora da secreção de insulina pós-prandial devido a um aumento na secreção do peptídeo 1 semelhante ao glucagon (GLP-1). Vários estudos investigaram as alterações metabólicas pós-cirúrgicas e, se a mudança na liberação de hormônios intestinais ou a restrição de ingestão induzida pela cirurgia, seriam os efeitos essenciais sobre o controle glicêmico ainda não está totalmente esclarecido (127).

Outro estudo avaliou se havia correlação entre as citocinas inflamatórias e DHGNA em pacientes que se submetem à cirurgia bariátrica. Foram avaliados 91 pacientes, sem diabetes mellitus. As endotoxinas bacterianas (LPS) não foram associados à gravidade da doença, enquanto TNF-alfa, IL-8 e CCL3 (ligante quimiocina 3) apresentou clara correlação com as concentrações séricas de transaminases e gravidade histológica (128).

Uma recente revisão sugere que a identificação precoce e o tratamento direcionado de pacientes com EHNA é necessária para melhorar os resultados dos pacientes, incluindo direcionar os pacientes para modificações intensivas no estilo de vida para promover perda de peso e encaminhamento para cirurgia bariátrica, conforme indicado para tratamento da obesidade e doença metabólica (129).

2.7.4 Justificativa para o Uso de Antidiabéticos orais na DHGNA

Embora a DHGNA ainda seja considerada uma entidade clínica recentemente descrita, está intimamente associada a duas doenças que constituem verdadeiras epidemias, diabetes mellitus tipo 2 e obesidade. Estas duas últimas compõem o quadro de doenças da SM definida pelo Painel Nacional de Tratamento de Adultos do Programa de Colesterol III (NCEP-ATPIII) por três ou mais dos seguintes cinco critérios: circunferência da cintura acima de 102 cm (homens) ou 88 cm (mulheres), pressão arterial acima de 130/85 mmHg, triglicérides em jejum (TG) acima de 150 mg/dL, nível de lipoproteína de alta densidade (HDL) em jejum menor que 40 mg/dL (homens) ou 50 mg/dL (mulheres) e glicemia em jejum sérica acima de 99 mg/dL (130).

Sua íntima associação com a SM tem sido comprovada em recentes estudos, como o de Paudel e cols, realizado em Butwal, Nepal, envolvendo 385 participantes com DHGNA diagnosticados por US. A presença de síndrome metabólica pelos critérios do NCEP-ATPIII foi encontrada em 57,6% dos participantes, mas pelo menos um componente da síndrome metabólica foi encontrado em 91,4% dos participantes com características radiológicas de EH. Maior proporção de pacientes com DHGNA eram do sexo masculino. O aumento da circunferência da cintura seguido pelo baixo HDL foram os componentes mais comuns da síndrome metabólica em participantes com DHGNA (131).

A associação de DHGNA com doença coronariana também tem sido demonstrada em outros estudos como o de Kim e cols em Seul, Coreia. O seguimento de quatro anos de 1575 pacientes por meio de proteína C reativa de alta sensibilidade (PCR-as) (mediana de 0,06 mg/L) e escore de cálcio coronariano (CAC) revelou que 148 indivíduos (9,4%) desenvolveram calcificação coronariana. A proporção de indivíduos que desenvolveram calcificação coronariana foi significativamente maior em indivíduos com DHGNA, diagnosticada por US, no início do estudo em comparação com aqueles sem DHGNA no início (6,8 vs. 12,4%, $p < 0,01$), e também foi maior em indivíduos com PCR-as maior ou igual a 0,06 mg/L em comparação com aqueles com PCR-as $< 0,06$ mg/L (7,2 versus 11,5%, $p < 0,01$). O OR para o desenvolvimento de calcificação coronariana foi maior em indivíduos com DHGNA e PCR-as maior ou igual a 0,06 mg/L (1,67, IC 95% 1,01-2,77), embora tenha sido atenuado após ajuste para o índice de massa corporal (132).

Nesse contexto, outras medicações antidiabéticas têm sido testadas para DHGNA e discutiremos a seguir as mais estudadas.

2.7.4.1. Metformina

A metformina é o medicamento de primeira escolha para o tratamento de DM2 de acordo de acordo com as sociedades brasileira, americana e europeia. A metformina ativa a proteína-quinase adenosina monofosfato (AMP-K) no fígado, causando redução da glicogenólise hepática e inibindo a gliconeogênese através de mecanismos enzimáticos complexos. Além disso, melhora a

sensibilidade e a ação da insulina através da ativação da expressão dos receptores de insulina e, com o aumento da sua atividade tirosina, aumenta a captação periférica de glicose, reduzindo a absorção intestinal da mesma e aumentando a oxidação de ácidos graxos (133).

Vários estudos comprovaram a segurança cardiovascular da metformina e seus efeitos benéficos na redução do risco cardiovascular. Ao ativar a AMP-K, presente no endotélio vascular, há aumento da atividade da eNOS (óxido nítrico sintetase) no endotélio. Essa ativação do eixo AMP-K-eNOS-NO estabelece uma cascata protetora ativada pela metformina o que explicaria suas propriedades protetoras miocárdicas, sem considerar a queda da HbA1c, ou seja, seu efeito intrínseco protetor cardiovascular. Outros efeitos como atenuação da constrição transversa da aorta, hipertrofia de ventrículo esquerdo e diminuição das pressões de enchimento, também foram evidenciados (134).

Além do efeito cardiovascular, a metformina parece ter efeitos na microbiota intestinal, um dos pontos em estudo como parte da fisiopatologia da DHGNA. Esta microbiota apresenta distribuição heterogênea, sendo o cólon o local com maior densidade, devido às condições favoráveis à proliferação de microrganismos, caracterizado por lenta periodização, ausência de secreção intestinal e presença de um bom suprimento nutricional. Disbiose gera supercrescimento bacteriano, produção de toxinas e aumento da permeabilidade intestinal, resultando em alterações nos efeitos imunológicos e hormonais. A microbiota e seus metabólitos derivados também podem contribuir para o desenvolvimento da DHGNA. O aumento da permeabilidade intestinal estimula a absorção de monossacarídeos do lúmen intestinal, levando à translocação bacteriana. As endotoxinas produzidas por essas bactérias penetram na veia porta e diminuem a secreção de fator adipocitário induzido pelo jejum (FIAF) aumentando a atividade da lipoproteína lipase (LPL), promovendo a síntese de novos ácidos graxos e a produção de triglicerídeos e ativando receptores Toll-like inflamatórios nos hepatócitos (135).

Estudo experimental conduzido por Brandt e cols avaliou camundongos alimentados com dieta controle líquida ou dieta rica em gordura, frutose e colesterol (FFC) por quatro dias ou seis semanas, tratados com \pm 300 mg/kg/dia de metformina (Met). Marcadores bioquímicos hepáticos, função de barreira

intestinal e composição da microbiota foram avaliados. O tratamento com metformina atenuou acentuadamente a DHGNA induzida por FFC em ambos os experimentos com marcadores de inflamação e lipoperoxidação em fígados de camundongos alimentados com FFC + Met que estavam quase no nível dos controles. O tratamento com metformina atenuou a perda de proteínas de junção estreita no intestino delgado e aumentou endotoxina bacteriana no plasma portal. As alterações da microbiota intestinal encontradas em camundongos alimentados com FFC foram também significativamente diminuídas em camundongos alimentados com FFC + Met (136).

No entanto, apesar de vários ensaios clínicos randomizados terem avaliado efeitos da metformina sobre a DHGNA, alguns avaliados por biópsia hepática, não houve melhora da histologia, em termos de fibrose, embora tenham sido encontradas melhoras no peso, circunferência abdominal, HOMA-IR, transaminases e hemoglobina glicada (137).

Até o momento, é bem conhecida associação entre DGHNA e RI com o risco de câncer. A metformina tem demonstrado exercer proteção contra câncer hepático e não-hepático (mama, cólon, ovário, pâncreas, próstata e pulmão). A via molecular não é claramente conhecida, porém postula-se que, pela inibição da síntese de espécies reativas de oxigênio, como consequência dos efeitos na função mitocondrial e na via da AMP-K, seja alcançado o efeito antitumoral (137).

2.7.4.2 Análogos de GLP-1

Os análogos de GLP-1 (glucagon like peptide type 1) são medicamentos de aplicação subcutânea com efeitos anti-hiperglicêmicos com ação tanto em célula beta-pancreática estimulando a síntese de insulina, quanto em célula alfa-pancreática reduzido a síntese do glucagon, liberados tanto para o tratamento de DM2 (exenatida, liraglutida, dulaglutida, semaglutida disponíveis no Brasil), sendo a liraglutida a única substância com liberação também para o tratamento da obesidade mesmo na ausência do diagnóstico de diabetes mellitus (137).

Com relação a segurança cardiovascular, o LEADER *trial* (*Liraglutide Effect and Action in Diabetes: Evaluation of Cardiovascular Outcome Results*), um estudo multicêntrico, com seguimento de 9340 pacientes com DM2 e alto risco cardiovascular, seguimento de 3,8 anos, placebo-controlado, mostrou redução

dos desfechos primários (morte por causas cardiovasculares, infarto miocárdico e AVC não fatais), no grupo Liraglutida (13%) comparado ao grupo placebo (14,9%) (HR 0,87; IC 95% 0,78-0,97; $p < 0,001$ para não-inferioridade; $p 0,01$ para superioridade). A taxa de morte por qualquer causa foi menor no grupo Liraglutida (8,2%) do que no grupo placebo (9,6%) (HR 0,85; IC 95% 0,74-0,97; $p 0,02$) (138).

Para DHGNA, o efeito da Liraglutida na histologia hepática foi avaliado no estudo *Liraglutide safety and efficacy in patients with non-alcoholic steatohepatitis* (LEAN), um ensaio clínico randomizado multicêntrico de fase II que comparou 48 semanas de liraglutida subcutâneo (1,8 mg/dia) versus placebo em 52 pacientes com DHGNA comprovada por biópsia. O desfecho primário foi a resolução da DHGNA (definida como desaparecimento do balonização de hepatócitos) e foi obtido em 39% dos pacientes tratados com Liraglutida versus 9% dos pacientes no grupo placebo ($p 0,019$). Não foram observadas diferenças significativas na progressão da fibrose entre dois grupos, embora apenas 2 pacientes tratados com Liraglutida (versus 8 pacientes no grupo placebo) apresentaram agravamento da fibrose hepática. A Liraglutida melhorou significativamente a esteatose e a balonização dos hepatócitos, mas não foram observadas diferenças significativas na inflamação lobular. Independentemente da gravidade da EHNA, a Liraglutida apresentou um bom perfil de segurança, também em pacientes com cirrose (139).

Para Semaglutida, um estudo randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, foi realizado em 16 países, para doses de semaglutida subcutânea uma vez ao dia na dose de 0,1, 0,2 ou 0,4 mg ou placebo. Foram submetidos à biópsia na triagem e nova biópsia foi realizada na semana 72. O desfecho primário foi a resolução da EHNA (definido pela *NASH Clinical Research Network* como inflamação no máximo leve - pontuação 0 ou 1; nenhuma balonização de hepatócitos - pontuação 0 e sem piora da fibrose hepática, com piora definida como aumento de um estágio ou mais na classificação de fibrose de Kleiner após 72 semanas. Melhora secundária foi considerada se melhora de pelo menos um estágio de fibrose e sem piora da EHNA (com piora definida por aumento de ≥ 1 ponto na inflamação lobular ou balonização de hepatócitos (140).

O estudo foi finalizado com 302 pacientes (94% do total iniciado), semaglutida na dose de 0,1 mg (80 pacientes), 0,2 mg (78 pacientes) ou 0,4 mg (82 pacientes) e placebo (80 pacientes). Entre os pacientes com fibrose em estágio F2 ou F3, o desfecho primário (resolução da EHNA sem agravamento da fibrose após 72 semanas) foi significativamente maior em todos os grupos de doses de semaglutida comparados ao placebo, com a maior porcentagem observado no grupo de 0,4 mg (59% em o grupo de 0,4 mg versus 17% no grupo placebo; OR 6,87; IC 2,60-17,63; $p < 0,001$), para a dose de 0,1 mg foi obtida melhora em 40% (OR 3,36 IC 1,29-8,86), para a dose de 0,2 mg 36% (OR 2,71 IC 1,6-7,56). Para o desfecho secundário (melhora da fibrose sem piora da EHNA), não houve diferença estatística comparado ao placebo em nenhum grupo de doses dose de 0,1 mg melhora em 49% (OR 1,96 IC 0,864,51), para a dose de 0,2 mg 32% (OR 1 IC 0,43-2,32) e dose de 0,4 mg 43% (OR 1,42 IC 0,62-3,28) p 0,48. Com relação a efeitos adversos, 7% dos pacientes descontinuaram no grupo semaglutida (para todas as doses) e 5% no grupo placebo. A incidência de náusea, constipação e vômito foi maior no grupo de 0,4 mg do que no grupo placebo. Cálculo em vesícula biliar foi mais incidente no grupo semaglutida (6% para a dose de 0,1 mg, 5% para a dose de 0,2 mg e 7% para a dose de 0,4 mg) comparada a 2% no grupo placebo. Neoplasia malignas foram relatadas em 3 pacientes (1%) receberam semaglutida (1 com câncer de mama no grupo de 0,1 mg; 1 cada com adenocarcinoma endometrial e linfoma periférico de células T no grupo 0,2 mg) (140).

Os efeitos dos análogos de GLP-1 sobre a esteatose mostram redução da mesma proporcional à magnitude do peso perdido e essa redução é proporcional à obtida em estudos com placebo para EHNA quando a perda de peso leva à redução de 10-20% da esteatose (141).

2.7.4.3 Gliptinas ou Inibidores da Dipeptidilpeptidase tipo-4 (DPP-4)

As gliptinas (ou inibidores da DPP-4) são medicamentos orais que tem efeito na redução da glicemia, com efeito neutro sobre o peso. Os representantes são: sitagliptina, vildagliptina, saxagliptina, linagliptina e alogliptina (142). Um importante benefício dos inibidores da DPP-4, a melhora da função das células beta entre os pacientes com DM2, foi demonstrado em modelos animais diabéticos com melhora da sobrevivência das células beta, da neogênese das

ilhas, biossíntese da insulina e preservação da massa e função das células beta. Em humanos com DM2, os inibidores da DPP-4 demonstraram melhora da função das células beta tanto em jejum quanto na fase pós-prandial, e esses efeitos benéficos foram sustentados em estudos com duração de até 2 anos. Uma metanálise recém-publicada envolvendo 52 estudos randomizados e controlados mostrou que há melhora da função da célula beta medida pelo índice HOMA-beta, embora não interfira na resistência insulínica (HOMA-IR) (142).

Alguns estudos foram conduzidos para avaliar os efeitos de IDDP-4 para DHGNA, sem resultados efetivos como o estudo realizado por Cui et al, randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, que incluiu 50 pacientes com DHGNA com pré-diabetes ou diabetes recém-diagnosticado, randomizados para sitagliptina por via oral 100 mg/ dia ou placebo por 24 semanas. O desfecho primário foi a alteração da gordura hepática medida por RM. A sitagliptina não foi significativamente melhor do que o placebo na redução da gordura hepática medida por RM (diferença média entre os braços com sitagliptina e placebo: -1,3%, $p = 0,4$). Em comparação com a linha de base, não houve diferenças significativas no final do tratamento RNM-DP para sitagliptina (18,1% para 16,9%, $p = 0,27$) ou placebo (16,6% para 14,0%, $p = 0,07$). Os grupos não apresentaram diferenças significativas quanto a alterações na ALT, LDL e resistência à insulina na avaliação do HOMA (143).

Por fim, as sulfonilureias e as glinidas, medicamentos orais muito utilizados no tratamento do diabetes mellitus tipo 2, não foram testados para o tratamento de DHGNA. Isso se deve ao fato de atuarem como secretagogos de insulina, ou seja, agem em diferentes receptores na célula beta-pancreática estimulando a secreção de insulina. Especialmente a glibenclamida, dentre as sulfonilureias, está associada a um risco maior de hipoglicemia grave, principalmente se em combinação com metformina e com os demais medicamentos citados anteriormente, especialmente em pacientes com doença renal ou hepática. Devido ao metabolismo hepático e excreção renal, as sulfonilureias são classicamente contraindicadas em pacientes com doença hepática ou renal crônica, apesar de os dados farmacocinéticos serem muito limitados em pacientes cirróticos. Dessa forma, não teria ação na fisiopatologia comum de DHGNA e DM2, a resistência insulínica. As glinidas são caracterizadas pela

meia-vida mais curta em comparação às sulfonilureias e não têm excreção renal significativa. Apesar do fato de que elas são metabolizadas no fígado, não há grandes estudos que avaliaram a eficácia e segurança de repaglinida em pacientes com DM2 com doença hepática crônica. A tabela 1 resume os principais efeitos dos anti-hiperglicemiantes orais estudados na DHGNA (137).

Tabela 1. Antidiabéticos orais e seus efeitos sobre a doença hepática gordurosa não alcoólica.

Classe	Efeitos								
	Peso	GJ	AST/ ALT	HOMA- IR	Fibrose histológica	ILH	BH	EH	CT TG
Metformina	X	X	X	X					X
IDPP4	X	X	X						X
Tiazolinedionas		X	X		X	X	X	X	
ISGLT2	X		X						
AGLP1	X	X	X				X	X	X

IDPP4 – inibidores da peptidilpeptidase tipo 4; ISGLT2 – inibidores do cotransportador de sódio e glicose; AGLP1- análogos de glucagon like peptide tipo 1; HOMA-IR – Homeostatic model Insulin Resistance; GJ: glicemia em jejum; AST: aspartato aminotransferase; ALT alanina aminotransferase; ILH: inflamação lobular histológica, BH, balonização histológica, EH, esteatose histológica; CT – colesterol total; TG -triglicerides.

Fonte: Adaptado de Taceli M et al (137).

2.8 ISGLT2 PARA DHGNA

Os inibidores do cotransportador de sódio-glicose tipo 2 (ISGLT2) são representados na Europa e América do Sul e do Norte por dapagliflozina, canagliflozina, ertugliflozina (EUA) e empagliflozina. No Japão encontram-se em comercialização tofogliflozina, luseogliflozina, ipragliflozina. Os mecanismos de ação de ISGLT2 são: diminuição do limiar de reabsorção renal de glicose, diminuição do limiar para glicosúria ou aumento da excreção urinária de glicose. Mesmo em pacientes com glicemia sérica de 150 mg/dL (HbA1c 6,5%) há resposta, com diminuição da taxa máxima de reabsorção de glicose, exemplo de que sua ação não está concentrada apenas na glicosúria com hiperglicemia, uma vez que há aumento da glicosúria em valores abaixo do limiar de excreção

renal de glicose (sérica de 180 mg/dL). A dapagliflozina e empagliflozina têm ação em todos os três mecanismos supracitados (144).

Entre os medicamentos que representam a classe, dapagliflozina, canagliflozina, empagliflozina apresentaram seus estudos mais robustos. Destes três, a empagliflozina apresenta a maior seletividade relativa, sendo mais de 2500 vezes mais seletiva para SGLT2 do que para SGLT1, seguida pela dapagliflozina em mais de 1100 vezes e pela canagliflozina em mais de 250 vezes (145).

Em pacientes sem DM2, a dapagliflozina em glicemias séricas entre 80-90 mg/dL mostrou marcante glicosúria, com redução de cerca de 40 mg/dL da taxa máxima de absorção renal de glicose, porém não deve ser este o único mecanismo para redução da glicemia em normoglicêmicos. Como ainda não se demonstrou presença de SGLT2 em músculo ou célula beta, a melhora da secreção e na sensibilidade da insulina deve-se, até o momento, a reversão da glicotoxicidade. A dapagliflozina reduz a oxidação da glicose mesmo em condição basal e, estimulada por insulina, aumenta a oxidação de gordura e, modestamente, mas significativamente, aumenta as concentrações de cetonas plasmáticas. Diante da glicosúria, as células recorrem a oxidação de lipídeos para gerar energia sob a forma de ATP para o ciclo de Krebs, que ao final gera acetil-coA que será oxidada e convertida a corpos cetônicos. A resistência insulínica acarreta aumento da lipólise em adipócitos, com consequente aumento dos ácidos graxos livres, no fígado estes sofrerão beta-oxidação com entrada no ciclo de Krebs-acetil-coA e cetonas. Como consequência ao aumento da oxidação de lipídeos, acredita-se que, a redução das concentrações de metabólitos tóxicos de lipídeos intracelulares (acetil-coA, diacilglicerol e ceramidas) leva à redução da lipotoxicidade, como evidenciado pela melhora da sensibilidade muscular a insulina e a célula beta (144).

Os inibidores de SGLT2 ao promoverem glicosúria, melhoram a resistência à insulina e glicemia. O controle glicêmico regula a proteína de ligação ao elemento responsivo a carboidratos (ChERB-BP), um fator de transcrição responsável por ativar a síntese de ácidos graxos. Mas há efeitos independentes de peso e glicose, como melhora da esteatose, independente das mudanças no peso corporal, tecido adiposo visceral ou hemoglobina glicada.

Dessa forma, os inibidores de SGLT2 parecem ter um efeito benéfico na DHGNA/EHNA por mecanismos independentes, como redução de marcadores inflamatórios, diminuição do estresse oxidativo, diminuição da lipogênese e aumento da oxidação de ácidos graxos livres (146).

A cetogênese pode eliminar até dois terços da gordura que entra no fígado. Assim, a desregulação do metabolismo do corpo cetônico poderia contribuir potencialmente para a patogênese da DHGNA. A cetogênese hepática é ativada em estados de alto teor de ácidos graxos e diminuição da disponibilidade de carboidratos e/ou quando as concentrações circulantes de insulina são muito baixas. Dentro das mitocôndrias hepáticas, as reações cetogênicas condensam a acetil-CoA derivada da β -oxidação nos corpos cetônicos acetoacetato (AcAc) e β -hidroxibutirato (β OHB). Ao fazê-lo, a cetogênese descarta o acetil-CoA gerado em excesso das necessidades de energia do próprio fígado e simultaneamente recicla 2 moles de coenzima livre A (CoASH) por mole de cetona produzida. A cetogênese é praticamente limitada aos hepatócitos, devido à expressão relativamente restrita da enzima cetogênica 3-hidroxiacetilglutaril-CoA sintase mitocondrial (HMGCS2) sob condições normais. Em contraste, a depuração oxidativa dos corpos cetônicos é quase onipresente, já que todas as células, exceto os hepatócitos, expressam a enzima que direciona a oxidação do corpo cetônico, a succinil-CoA:3-oxoacid CoA transferase (SCOT). Dentro das mitocôndrias de tecidos extra-hepáticos, o β OHB é oxidado em AcAc, que é então direcionado para o ciclo do ácido tricarboxílico (ATC) para a oxidação terminal através de uma reação catalisada exclusivamente pela SCOT. Apesar de sua alta capacidade como via de eliminação de ácidos graxos hepáticos, o metabolismo do corpo cetônico tem sido negligenciado como um potencial alvo terapêutico na DHGNA (147).

Além de seu papel direto como substrato energético como combustíveis energéticos para tecidos extra-hepáticos (cérebro, coração e músculo esquelético), os corpos cetônicos sinalizam para os tecidos periféricos e o sistema nervoso central para regular o metabolismo. As cetonas podem atravessar a barreira hematoencefálica e são detectadas no hipotálamo para estimular a ingestão de alimentos aumentando a expressão dos peptídeos orexígenos (NPY e AgRP) e através da potencialização da leptina hipotalâmica

e da sinalização da insulina. Essa sinalização está associada à redução da adiposidade e melhora da sensibilidade sistêmica à insulina (148).

Os corpos cetônicos também desempenham papel central como moduladores da inflamação e estresse oxidativo. Estes corpos cetônicos sintetizados de novo pelo fígado podem seguir três caminhos: 1) catabolizados pelas mitocôndrias extra-hepáticas (disponível para o ciclo do ácido tricarboxílico), 2) desviado para lipogênese ou vias de síntese de esterois ou 3) excretados pela urina. O papel do metabolismo mitocondrial na patogênese da DHGNA ainda não é completamente compreendido, mas acredita-se que, antes do desenvolvimento da EHNA, a oxidação hepática mitocondrial e, em particular, a oxidação de gordura, aumentam na obesidade, RI e DHGNA. Assim, à medida que a DGHNA progride, a função oxidativa fica prejudicada. Por meio de mecanismos ainda não completamente definidos, a hiperinsulinemia suprime a cetogênese, possivelmente contribuindo para a hipocetonemia em comparação com controles magros (149).

O β -hidroxibutirato também está implicado na regulação de longo prazo do metabolismo pela modificação de histonas através de dois processos epigenéticos distintos. Em primeiro lugar, o β -hidroxibutirato inibe a histona desacetilase de classe I (HDAC), que está associada à redução do estresse oxidativo, um mediador bem documentado da resistência à insulina. Em segundo lugar, o β -hidroxibutirato modula diretamente os resíduos de lisina nas histonas por meio de um processo conhecido como β -hidroxibutirilação da lisina, levando à ativação de vias metabólicas reguladas pela privação, incluindo catabolismo de aminoácidos, sinalização PPAR e fosforilação oxidativa. Embora correlativa, a inibição de HDAC é relatada com o consumo de dietas cetogênicas, com subsequente ativação de PPAR α e aumento de expressão de genes do metabolismo lipídico, maior oxidação de ácidos graxos hepáticos e liberação de triglicerídeos plasmáticos e produção de FGF21. Assim, o β -hidroxibutirato relaciona mudanças nas modificações das histonas dirigidas pelo metabólito a alterações no metabolismo celular (149).

Embora o β -hidroxibutirato seja comumente usado em estudos metabólicos para representar “cetonas”, o acetoacetato constitui 25 a 50% do total de corpos cetônicos hepáticos e é, portanto, uma fonte significativa de

acetil-CoA e potencial molécula sinalizadora. O acetoacetato pode inibir a captação de glicose no músculo esquelético e no coração, embora outros não tenham efeito. Trabalhos recentes mostraram que o acetoacetato secretado pelos hepatócitos, mas não o β -hidroxibutirato, melhora a fibrose hepática induzida pela dieta, mas esses estudos não avaliam o metabolismo, e uma melhor compreensão dos papéis do acetoacetato no metabolismo é necessária. Da mesma forma, uma outra cetona, a acetona, pode ser absorvida pelos tecidos, mas seus efeitos sobre o controle glicêmico e a sensibilidade à insulina são desconhecidos (150).

A cetogênese prejudicada gera excesso de corpos cetônicos que podem mitigar a lesão hepática induzida por estresse oxidativo em resposta a ácidos graxos poli-insaturados. Devido a falta de expressão da enzima SCOT nos hepatócitos, os corpos cetônicos não são depurados, mas podem contribuir para a lipogênese e servir a uma variedade de papéis independentes da sua oxidação. No contexto da insuficiência cetogênica, a lipogênese e a produção de glicose aumentam. A perda do conduto cetogênico estimula o aumento do descarte de acetil-coA através do ciclo do ácido tricarbóxico, aumentando a eliminação inadequada de EROs. O comprometimento cetogênico também aumenta a exportação de acetil-coA para o citoplasma para a via de síntese de lipídeos. Essas alterações refletem, em parte, o que acontece na DHGNA, onde o fígado apresenta aumento da esterificação e lipólise de gotículas lipídicas, aumento da beta-oxidação de ácidos graxos, aumento da oxidação e aumento da gliconeogênese, mas diminuição da cetogênese em relação a disponibilidade de gordura (140).

Para avaliar a progressão da resistência à insulina hepática e o aparecimento de EHNA prejudicariam o fluxo oxidativo através do ciclo hepático do ATC, os camundongos (C57/BL6) foram alimentados com uma dieta rica em gorduras e com alto teor de frutose (TFD) por 8 semanas, para induzir esteatose simples e EHNA em 24 semanas. Os fluxos mitocondriais hepáticos em jejum in vivo foram determinados por análise de isotopômeros à base de ressonância magnética nuclear de ^{13}C (RMN). Os intermediários metabólicos hepáticos foram quantificados usando metabolômica direcionada baseada em espectrometria de massa. O acúmulo de triglicerídeos hepáticos e a resistência

à insulina precederam alterações no metabolismo mitocondrial, uma vez que os fluxos do ciclo ATC permaneceram normais durante a esteatose simples. No entanto, camundongos com EHNA tiveram uma dupla indução ($p < 0,05$) de fluxos mitocondriais ($\mu\text{mol} / \text{min}$) através do ciclo ATC ($2,6 \pm 0,5$ vs. $5,4 \pm 0,6$), anaplerose ($9,1 \pm 1,2$ vs. $16,9 \pm 2,2$) e ciclagem de piruvato ($4,9 \pm 1,0$ vs. $11,1 \pm 1,9$) em comparação com seus controles pareados por idade. A indução da atividade do ciclo ACT em EHNA foi concomitante com cetogênese embotada e acúmulo de diacilgliceróis hepáticos (DAGs), ceramidas (Cer) e acilcarnitinas de cadeia longa, sugerindo oxidação ineficiente e eliminação de excesso de ácidos graxos livres (AGL). A indução sustentada do ciclo mitocondrial do ATC falhou em impedir o acúmulo de metabólitos “lipotóxicos” no fígado e pode acelerar a inflamação e a transição metabólica para o NASH (150).

Em estudo conduzido por d’Avignon et al, camundongos alimentados com carboidratos e dieta rica em gordura, avaliados antes do início da lesão e inflamação hepáticas por RNM com espectroscopia e metabolômica e lipidômica para a cetogênese, mostrou que houve aumento dos três contribuintes para a produção hepática de glicose (glicogenólise, glicerol e fosfoenolpiruvato) nos animais com dieta rica em gordura. A cetogênese foi aumentada de modo similar e o fluxo do ácido tricarboxílico foi modestamente aumentado. Os fígados de camundongos com dieta rica em gordura apresentavam estado de alta energia devido ao aumento da gliconeogênese (consumo de energia) e cetogênese (produção de energia), apesar de aumentos modestos no fluxo de ATC. Esses dados levam a duas formas de argumentos para o aumento da cetogênese: 1) seu aumento poderia exacerbar o excesso de energia do fígado gorduroso e, adicionalmente, aumentar a produção de glicose de forma deletéria assim como o estresse oxidativo ou 2) a cetogênese para equivalentes menos redutores do que o ciclo ATC pode ser um mecanismo eficaz para tecidos extra-hepáticos utilizarem energia de uma forma que pode ser prontamente oxidada. Com estes achados, o uso de ISGLT2, aumentando tanto a cetogênese quando a gliconeogênese, pode ser vantajoso para a DHGNA (151).

É importante ressaltar ainda que, não apenas a insulina, mas também o glucagon está envolvido na produção hepática de gordura. Estudos mostram que o glucagon pode reduzir a produção hepática de triglicerídeos assim como pode

acelerar o clearance plasmático de triglicerídeos. Sob efeitos agudos e crônicos, também afeta o metabolismo hepático de aminoácidos, resultando em redução de suas concentrações séricas. Acredita-se que, em um subgrupo de pacientes com DM2 e DHGNA, a resistência hepática ao glucagon pode causar redução da ureagênese e hiperaminoacidemia. O fígado gorduroso parece ser parcialmente resistente aos efeitos hiperglicêmicos do glucagon. Dessa forma, o DM2 em pacientes com DHGNA pode depender primariamente de prejuízo da sensibilidade hepática induzida por gordura, não apenas pela insulina, mas também pelo glucagon. Isso resulta em ambos, hiperinsulinemia e hiperglucagonemia, o último claramente responsável pelo menos pela elevação da glicemia em jejum e HbA1c (152).

Dessa forma, os mecanismos subjacentes à melhora da DHGNA com os inibidores de ISGLT2 permanecem desconhecidos e atualmente permanecem como especulações. Os efeitos na glicemia não explicam suficientemente uma vez que não há a mesma melhora com outras medicações com metformina ou outros antidiabéticos orais. Uma recente revisão sistemática avaliou estudos em animais e humanos com melhora das transaminases e redução do conteúdo hepático de gordura, sugerindo menor dano celular e melhora da função mitocondrial ou menor estresse do retículo endoplasmático associados ao uso de ISGLT2 na DHGNA (153).

2.9 COMPRIMENTO DE TELÔMEROS E DHGNA

Os telômeros são complexos DNA-proteína encontrados nas extremidades dos cromossomos lineares que os protegem da degradação, recombinação e da fusão robertsoniana, estabilizando-os. Devido a observação de que seu tamanho regride a cada duplicação celular até um tamanho mínimo que interrompe a proliferação celular, os telômeros são considerados um relógio celular, responsáveis pela sua senescência (149). Com a descoberta da enzima telomerase, uma enzima cuja atividade está presente em 85% das células germinativas e tumorais, observou-se que pode ser possível manter o tamanho dos telômeros (154,155).

A telomerase, uma ribonucleoproteína com atividade de transcriptase reversa, é responsável pela regulação do comprimento dos telômeros. A telomerase como uma enzima DNA polimerase específica, é um complexo ribonucleoproteico que consiste em duas partes, TERT (transcriptase reversa da telomerase) como parte central e TERC (componente RNA da telomerase) como parte acessória. O componente RNA (TERC) e seu componente proteico (TERT) se juntam para formar o complexo enzimático ribonucleoproteico (155).

Dessa forma, o telômero é uma estrutura que desempenha papéis críticos na regulação da integridade genômica, estabilidade cromossômica e outros aspectos da fisiologia celular. Sua composição consiste em sequências repetitivas de TTAGGG, que está ligada ao complexo Shelterin, como complexo essencial para a integridade dos telômeros e a regulação do comprimento dos mesmos. O complexo Shelterin consiste de seis subunidades proteicas incluindo TRF1 (fator de ligação telomérica de repetição 1), TRF2 (fator de ligação telomérica de repetição 2), POT1 (proteína de proteção dos telômeros 1), TIN2 (proteína interativa-2), RAP1 (proteína repressora/ ativadora 1) e TPP1 (proteína que interage com TIN2 e POT1) figura 4 (156).

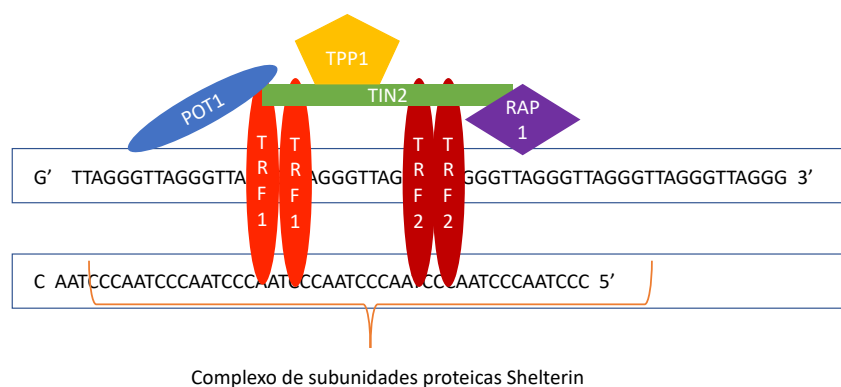


Figura 4. Estrutura do telômero e suas 6 subunidades proteicas. TRF1 e 2 (fator de ligação telomérica de repetição 1 e 2), POT1 (proteína de proteção dos telômeros 1), TIN2 (proteína

interativa-TRF1-2), RAP1 (proteína repressora / ativadora 1) e TPP1 (proteína que interage com TIN2 e POT1). Fonte: autora

As repetições de seis nucleotídeos – TTAGGG – que compreendem centenas de quilobases, contém ainda um pequeno trecho de fitas simples com poucas centenas de nucleotídeos. O telômero precisa estar associado as proteínas acima ou a um arranjo específico para que possa ser diferenciado das quebras cromossômicas. Quando a maquinaria celular encontra extremidades cromossômicas quebradas – produzidas por radiação, dano ao DNA, alguma forma intermediária de meiose, recombinação VDJ ou algum outro fator – esse DNA deve ser reparado de alguma forma antes da replicação. Se isso não acontecer, a célula pode perder quantidade significativa de material genético e morrer. Com suas proteínas específicas associadas, o telômero se protege e delimita as extremidades cromossômicas. Dessa forma, o comprimento de telômeros (CT) relaciona-se com a senescência celular (155,156).

O método padrão-ouro para análise de comprimento de telômeros foi descrito por Edwin Southern em 1975, conhecido como análise de fragmentos de restrição terminal (TRF, *telomere restriction fragment*) por *Southern blot*. Este método consiste em medida do comprimento absoluto de telômeros permitindo detectar fragmentos específicos de DNA em amostras de composição complexa, como DNA genômico. Desse modo é possível obter a estimativa do número médio de repetições por amostras, pois os TRFs incluem não apenas as repetições teloméricas, mas também as quantidades variáveis de sequências subteloiméricas (157). O desenvolvimento desta técnica foi fundamental para elucidar as associações entre os comprimentos de telômeros e o envelhecimento e as doenças humanas relacionadas ao mesmo (158).

No entanto, existem limitações importantes para a TRF por *Southern blot*, uma vez que se trata de uma técnica dispendiosa, com tempo longo (3 a 5 dias), exigência de grande quantidade de DNA (0,5 -5 mcg/indivíduo) e poder chegar a variações de até 5% a depender das enzimas de restrição usadas, sugerindo a existência de polimorfismos de comprimentos subteloiméricos. Conseqüentemente, não é um método que se aplique para estudo com grande número de amostras (158). Outros métodos foram desenvolvidos para estudar o comprimento dos telômeros: 1) análise única de comprimento de telômeros

(STELA – single telomere length analysis) 2) hibridização fluorescente in situ (FISH) e suas variantes 3) ensaio dot-blot 4) análise de hibridização de proteção (HPA, hybridization protection assay) e quantificação da saliência 3'OH de fita simples) e 5) método de PCR quantitativo em tempo real (159).

A análise única de comprimento de telômeros também é trabalhosa e inadequada para validar grande número de amostras. O método FISH é usado para avaliar comprimento de telômeros de leucócitos em subconjunto de células separadas de amostras de sangue fresco, requer equipamento caro e que não pode ser usado para avaliar comprimento de telômeros em tecidos e amostras armazenadas (159). Dessa forma, o método de PCR quantitativo em tempo real, descrita por Cawton em 2002 (160) consiste na técnica mais utilizada em estudos epidemiológicos, por ser possível de ser realizada em curto espaço de tempo e exigir pequena quantidade de DNA, 20 ng por reação (159).

O método de PCR quantitativo em tempo real, descrito por Cawton consiste em medir em cada amostra de DNA o fator pelo qual a amostra diferiu de uma amostra de DNA de referência em sua relação com o número de cópias repetidas de telômero para o número de cópias do gene de cópia única. A quantidade de repetição de telômeros em cada amostra experimental é medida como o nível de diluição de uma amostra de DNA de referência, escolhida arbitrariamente, que tornará as amostras experimentais e de referência equivalentes em relação ao número de ciclos de PCR necessários para gerar uma determinada quantidade de produtos de telômeros de PCR durante a fase exponencial de amplificação da PCR (160).

O encurtamento de telômeros deve-se à incapacidade do mecanismo de replicação do DNA para copiar os últimos nucleotídeos da fita atrasada (problema do final da replicação), e também é substancialmente afetado pela ressecção da extremidade 5'e danos ao telômeros. A atividade da telomerase neutraliza a erosão e mantém o comprimento de telômeros na linhagem germinativa. No entanto, em células somáticas, com atividade da telomerase reduzida ou ausente, os únicos mecanismos que neutralizam a perda dos telômeros são os que auxiliam na replicação e reparam os danos. Os telômeros são replicados por garfos terminais (ou seja, garfos de replicação que se deslocam em direção a uma extremidade do DNA) e, se colapsarem, a

replicação não poderá ser resgatada por garfos que chegam de origens próximas, como acontece nas regiões internas. Portanto, o colapso nas regiões teloméricas pode resultar em truncamento ou perda total dos telômeros. Esse cenário é agravado pela característica dos telômeros de difícil replicação por se fixarem locais frágeis onde ocorrem dificuldades na replicação (161).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) podem danificar os ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos se não forem removidas pelo arsenal de enzimas antioxidantes da célula que inclui as peroxidases e peroxirinas. Acredita-se que os telômeros sejam particularmente vulneráveis a danos oxidativo, por algumas razões: 1) a resposta a danos no DNA é reprimida em telômeros intactos, assim como os danos aos mesmos não podem ser ativar os receptores de morte celular (DDR) que diminuem o ciclo celular e induzem a expressão de proteínas de reparo ao DNA; 2) experimentos *in vitro* sugerem que o DNA telomérico é particularmente reativo à EROs. O DNA telomérico foi mais suscetível à clivagem por EROs comparados às sequências não-teloméricas com um corte preferencial a 5' do 5'GGG3' da sequência telomérica (162).

Os danos aos telômeros pelo estresse oxidativo foi demonstrado em cultura de fibroblastos humanos nas quais o encurtamento do telômeros e o início da senescência celular correlacionaram-se com a concentração final de oxigênio à qual as células foram expostas nas câmaras de tecidos. Uma vez que fibroblastos humanos não-transformados não expressam telomerase os resultados sugerem que o dano oxidativo exagera o problema final da replicação, interferindo na manutenção das extremidades distais dos telômeros. Além disso, o DNA danificado pelas EROs interfere na atividade da telomerase. A telomerase utiliza oxoGTP como substrato para alongamento do telômero, mas o terminal inserido 8oxoG funciona como um terminador de cadeia. A inibição da atividade da telomerase por um substrato de DNA oxidado por um nucleotídeo que termina em oxoG (5'TTA-8oxoG3') não pode ser estendido pela telomerase (162).

Apesar de estar bem documentado que o comprimento de telômeros está inversamente correlacionado com a idade cronológica, novos estudos mostram que não apenas o envelhecimento cronológico, mas também diversos fatores genéticos e ambientais podem modular o comprimento dos telômeros. Estudos gêmeos identificaram alta herdabilidade do comprimento de telômeros e muitos

locais específicos associados ao telômero. Com relação ao sexo, as mulheres adultas apresentam maior comprimento de telômeros. Acredita-se que isso possa estar associado a maior quantidade de estrogênios que conferem propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes e pelo seu conhecido efeito por promover a expressão da telomerase. Com relação a etnia, embora o comprimento de telômeros seja mais longo em brancos comparados a negros e hispânicos, essa diferença geralmente não é estatisticamente significativa se não for ajustado para outros fatores como idade, sexo, histórico socioeconômico e fatores de estilo de vida (163,164).

O estresse psicossocial e o sedentarismo estão relacionados a telômeros mais curtos. A obesidade devido ao seu caráter de inflamação crônica e aumento da produção de EROs no tecido adiposo também está associada a encurtamento dos telômeros. Já a adesão à dieta mediterrânea tem sido associada a telômeros mais longos. Álcool e tabaco também estão associados a comprimento dos telômeros e estão diretamente correlacionados a quantidade de consumo por dia (163,164).

3 OBJETIVOS GERAIS

1. Determinar quantitativamente a gordura hepática por ressonância magnética
2. Avaliar fatores clínicos e metabólicos associados a gordura hepática medida por ressonância magnética
3. Avaliar a associação de DHGNA com concentrações séricas de IGF-1
4. Conduzir um ensaio clínico para avaliar a eficácia de dapagliflozina em sujeitos com DHGNA determinada por ressonância magnética com e sem o diagnóstico de diabetes mellitus e avaliação de comprimento de telômeros de leucócitos
5. Avaliar a correlação de DHGNA com comprimento de telômeros de leucócitos

4 METODOLOGIA GERAL

Os pacientes foram selecionados em clínicas de Radiologia nas cidades de João Pinheiro – MG e Paracatu – MG a partir de ultrassonografia abdominal com evidências de esteatose hepática entre novembro de 2018 a janeiro 2019 após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade Patos de Minas aprovação 2.984.312 (anexo 1). Os pacientes selecionados eram convidados a se consultarem com a pesquisadora para convite para participação para a pesquisa após explicitar os objetivos e riscos. Os pacientes que aceitaram a participação assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e foram submetidos inicialmente a ressonância magnética para quantificação da gordura hepática. Na abordagem de captação inicial, selecionamos 55 pacientes, 47 pacientes tiveram a confirmação da DHGNA por ressonância magnética e foram incluídos no estudo transversal inicial. Destes pacientes 32 tiveram a análise do comprimento de telômeros de leucócitos. A partir dessa mesma amostra selecionamos inicialmente 23 pacientes para o ensaio clínico piloto com dapagliflozina que foram seguidos de julho de 2019 a julho de 2020. Cinco pacientes desistiram de participar do estudo por motivos pessoais e seus dados foram excluídos. Ao final de 48 semanas (12 meses), acompanhamos 12 pacientes no grupo tratamento (dapagliflozina) e 6 pacientes no grupo placebo. Esses pacientes recebiam a medicação mensalmente com as secretárias da clínica em cada cidade e assinavam um questionário sobre possíveis efeitos adversos. Avaliamos também o comprimento de telômeros de leucócitos em 7 pacientes do grupo tratamento e 2 pacientes do grupo placebo na avaliação inicial (antes do início do tratamento) e avaliação final (após o início do tratamento). A figura 4 resume o tempo de seguimento da coorte.

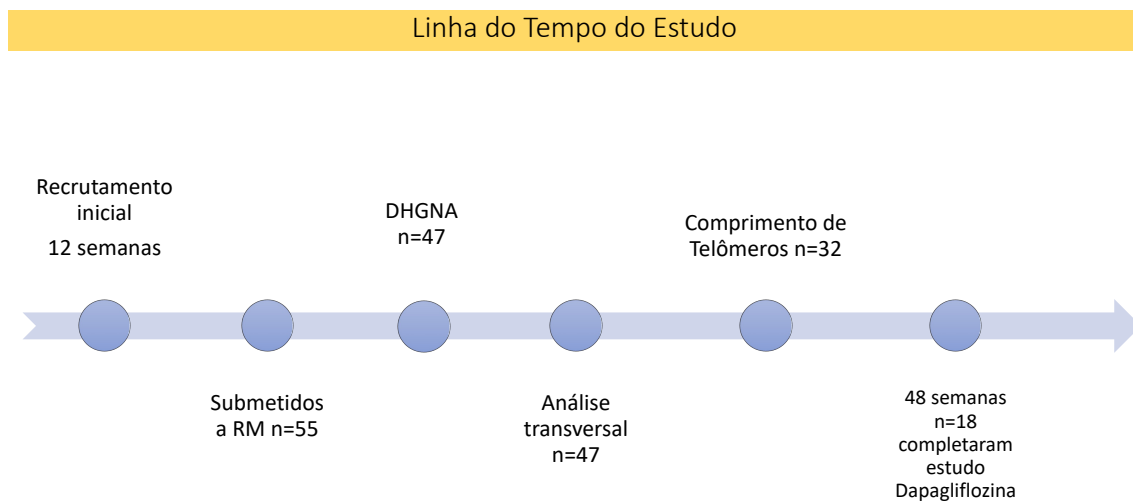


Figura 4. Linha do tempo do estudo

5.CAPÍTULO 1

FATORES ASSOCIADOS À FRAÇÃO HEPÁTICA DE GORDURA
AVALIADA POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NA DOENÇA HEPÁTICA
GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA

5.1 INTRODUÇÃO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) afeta aproximadamente 1 bilhão de pessoas em todo o mundo, com uma estimativa de prevalência global de 25% e um impacto crescente na saúde humana (17, 166). A DHGNA é caracterizada pela deposição de triglicerídeos nos hepatócitos na ausência de causas secundárias e compreende um espectro histológico que varia de esteatose hepática simples a esteatohepatite não alcoólica (EHNA) e fibrose (161). A distinção da esteatose simples para esteatohepatite e fibrose tem sido avaliados em vários escores não invasivos (61), pois a doença apresenta morbidade e mortalidade geral e relacionada ao fígado significativas (2, 167).

A patogênese da DHGNA é multifatorial e não totalmente compreendida. Não obstante, há evidências que apoiam o papel principal da resistência à insulina no desenvolvimento de esteatose hepática e possivelmente esteatohepatite, mesmo entre indivíduos com peso normal e tolerância à glicose. De fato, a DHGNA está associada a outras condições relacionadas à resistência à insulina, como obesidade, síndrome metabólica (168) e doença coronariana (132,169). Além disso, os resultados de estudos clínicos indicam que os agentes de sensibilização à insulina, como as glitazonas (107,170) e o ácido biliar lipofílico, o ácido obeticólico (111), melhoram os resultados relacionados à DHGNA, como concentrações séricas de aspartato aminotransferase sérica (AST) e alanina aminotransferase (ALT) e características histológicas de esteatose e inflamação.

Fisiopatologicamente, a resistência à insulina aumenta a lipólise periférica, a captação hepática de ácidos graxos e a síntese de triglicerídeos, levando ao acúmulo de triglicerídeos hepatocelulares (171). O acúmulo de lipídios, por sua vez, pode ser seguido por lipotoxicidade e ativação imunológica, que, juntamente com modificadores como fatores genéticos e disbiose, podem conduzir ao desenvolvimento de esteatohepatite (26). Nesse cenário, é plausível que as variáveis relacionadas resistência à insulina podem influenciar o grau de acúmulo de gordura hepática. O conteúdo de gordura hepática pode ser quantificado de forma não invasiva por técnicas de RM com alta precisão e reprodutibilidade (54).

Neste capítulo, apresentamos os resultados da avaliação da relação entre a esteatose hepática e a resistência à insulina, investigando a associação entre o conteúdo de gordura hepática determinado por ressonância magnética e as medidas antropométricas e as anormalidades bioquímicas relacionadas à resistência à insulina em pessoas com sobrepeso / obesidade.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Desenho do Estudo

Realizamos um estudo transversal realizado na Unidade de Endocrinologia de João Pinheiro, Minas Gerais, Brasil, e no Centro Universitário Atenas, em Paracatu, Minas Gerais, Brasil. O estudo foi realizado de acordo com Declaração de Helsinque e aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Patos de Minas, Minas Gerais, Brasil (Anexo 1). Todos os sujeitos deram consentimento informado por escrito.

Os critérios de inclusão adotados foram: adultos com idade superior a 20 anos com índice de massa corporal (IMC) superior a 25 kg/m² e evidência ultrassonográfica de esteatose hepática. Os critérios de exclusão foram: consumo médio de álcool de mais de 30 gramas / dia para homens e 20 gramas / dia para mulheres nos últimos dez anos, níveis séricos de ferritina acima de 1000 mg / dL, diagnóstico prévio de distúrbios metabólicos genéticos, hepatite B ou C, ou outras doenças hepáticas e o uso de medicamentos que afetam a beta-oxidação hepática (metotrexato, amiodarona, tetraciclina, tamoxifeno, quimioterapia).

5.2.2 Procedimentos

Os sujeitos do estudo foram entrevistados e submetidos a avaliação clínica para obtenção de dados demográficos, história clínica e medidas antropométricas. A avaliação bioquímica incluiu concentrações séricas de glicose, hemoglobina glicada (HbA1c), lipoproteínas, AST, ALT, gama-glutamil transferase (GGT), ferritina, saturação de transferrina, tireotropina (TSH). Testes sorológicos para

exclusão de infecção pelos vírus da hepatite B e C também foram realizados. As concentrações séricas de insulina no plasma em jejum foram obtidos de participantes com tolerância normal à glicose.

O Modelo Homeostático de Avaliação da Resistência à Insulina (HOMA-IR) foi calculado por meio da seguinte fórmula: [glicose de jejum (mg / dL) x insulina de jejum (mUI / L)] / 405 (28). As concentrações séricas de HbA1c foram quantificados por meio de cromatografia líquida de alta performance.

O escore BARD foi calculado da seguinte forma: relação AST / ALT > 0,8: 2 pontos / IMC > 28 kg / m²: 1 ponto; a presença de diabetes: 1 ponto (68). O índice FIB-4 foi calculado da seguinte forma: (Idade [anos] × AST [U / L]) / (plaquetas [10⁹] × √ALT [U / L]) (64).

5.2.3 Avaliação Quantitativa da Fração Hepática de Gordura por Ressonância Magnética Técnica de Desvio Químico

Todos os participantes foram submetidos à ressonância magnética usando um scanner de corpo inteiro de 1,5 T (Philips Multiva). As imagens foram adquiridas por sequências multiplanares ponderadas em GE-T1, T2-TSE, SIT, In e Out-Phase em duas 2 medidas, uma em cada lobo e expressas como valor médio. Os parâmetros de imagem foram TR = 214 ms, TE 4,6 ms para *in phase* e 2,3 ms para *out phase*, intervalo de corte de 1 mm, tamanho da matriz 216 x 162 e um tempo total de varredura de 18 s (uma única apneia) (172). O grau de conteúdo lipídico hepático foi estimado pelo cálculo da fração hepática de hepática (FHG) usando a seguinte fórmula: $FHG = [(SIT1IP - SIT1OP) / (2 \times SIT1IP)] \times 100$, em que SIT1IP é a razão da intensidade do sinal hepático para intensidade do sinal esplênico em imagens ponderadas em T1 em fase (*in phase*) e SIT1OP é a razão entre a intensidade do sinal hepático e a intensidade do sinal esplênico em imagens ponderadas em T1 fora de fase (*out phase*) (50).

5.2.4 Análise Estatística

As variáveis contínuas (idade, IMC, circunferência da cintura, concentrações séricas de glicose no em jejum, concentrações séricas de insulina em jejum, HOMA-IR, concentrações séricas de colesterol e triglicerídeos, concentrações

sélicas de enzimas hepáticas, concentrações sélicas de ferritina, FHG, pontuação de FIB4 e pontuação de BARD) foram apresentadas como mediana e intervalo interquartil, de acordo com sua distribuição assimétrica avaliada pelo teste de D'Agostino-Pearson. O teste de Mann-Whitney foi usado para comparar variáveis contínuas entre homens e mulheres. Variáveis categóricas (sexo, DM2, tratamento para diabetes, valores de HOMA-IR acima da referência, enzimas hepáticas e ferritina sélicas acima da faixa de referência foram apresentadas como frequências, e o teste exato de Fisher foi usado para compará-las entre os homens e mulheres.

Nós agrupamos os sujeitos do estudo em 2 grupos, de acordo com os resultados da FHG abaixo e acima da média, e comparamos as variáveis categóricas e contínuas entre os dois grupos usando o teste exato de Fisher e o teste de Mann-Whitney, respectivamente. A correlação entre FHG e variáveis clínicas e bioquímicas contínuas entre homens e mulheres foi avaliada por meio da correlação de Spearman. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. A análise dos dados foi realizada com o GraphPad Prism versão 9.0.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Características da População do Estudo

Foram incluídos 47 indivíduos com DHGNA, e suas características são apresentadas na Tabela 1. A mediana de idade foi de 39 anos, a maioria era do sexo masculino (29; 61,7%). Treze (27,7%) participantes tinham o diagnóstico de DM2 e faziam tratamento com metformina, em monoterapia ou em combinação com um segundo anti-hiperglicemiante. Doze (25,5%) apresentavam hipertensão arterial sistêmica e 4 (8,5%) tratavam hipotireoidismo. A maioria (37; 78,7%) era sedentária. Sete indivíduos estavam com sobrepeso (4 homens e 3 mulheres) e 40 com obesidade (25 homens e 15 mulheres). A resistência à insulina, definida pelo $\text{HOMA-IR} > 2,8$, foi observada em 18 indivíduos, compreendendo 52,9% dos participantes com tolerância normal à glicose. A mediana de FHG foi de 15,9%, e um total de 42,5% e 80,8% dos indivíduos incluídos exibiram concentrações sélicas de AST e ALT acima do

limite superior da normalidade, respectivamente, embora os valores medianos estivessem apenas ligeiramente elevados (abaixo de três vezes o limite superior da faixa normal). Os valores do índice FIB4 e do escore BARD foram consistentes com baixo risco de fibrose hepática. Os homens apresentaram concentrações séricas de ferritina significativamente mais elevadas do que as mulheres e as mulheres hemoglobina glicada mais elevada, mas outras características clínicas foram semelhantes em homens e mulheres (Tabela 1).

Tabela 1. Características dos participantes do estudo transversal.

Características	Todos	Homens	Mulheres	p¹
Número (%)	47	29 (61,7)	18 (38,3)	-
Idade – anos	39 (36-54)	39 (32,5-49)	50 (36,7-60,7)	0,05
DM2 – n (%)	13 (27,7)	7 (53,8)	6 (46,2)	
Metformina – n(%)	13 (100)	7 (100)	6(100)	
Sulfonilureia – n(%)	4 (30,7)	1 (7,7)	3 (23)	
Dapagliflozina – (%)	4 (30,7)	2 (38,6)	2 (3,3)	
Liraglutida – n(%)	2 (15,4)	1 (7,7)	1 (16,6)	
Empaglifozina – n(%)	1 (8,33)	1 (16,6)	0	
Características	Todos	Homens	Mulheres	p¹
CA (cm)	105 (96-118)	105 (98,5-115,5)	100,5 (93.2-118.5)	0,61

Características	Todos	Homens	Mulheres	p¹
IJ – mUI/L ²	12,5 (8,7-21)	11,9 (8,8-18,6)	12,4 (7,1-23,1)	0,85
HOMA-IR ²	2,98 (1,8-4,5)	2,96 (1,8-4,1)	3,25 (1,5-5,1)	0,87
HOMA-IR > 2,8 no. (%) ²	18 (52,9%)	12 (54,5)	6 (50,0)	>0,99
HbA1c	5,6 (5,3-6,22)	5,4 (5,22-5,92)	5,8 (5,6-6,85)	0,04
CT – mg/dL	189 (172,3-216)	189 (173-209,5)	189 (162-229)	0,73
HDL-C – mg/dL	42 (37-52,2)	41 (35-48)	47 (39,5-58,6)	0,09
TG – mg/dL	156 (118,3-222)	158 (125,5-245)	149 (112-200)	0,66
AST – U/L	33 (28-44)	33 (28,5-46)	35 (27,5-46,2)	0,86
Características	Todos	Homens	Mulheres	p¹
ALT – U/L	47 (40-67)	48 (41,5-68)	47 (31,2-65,7)	0,34
ALT > ULNR – n. (%)	38 (80,8)	26 (89,6)	12 (66,6)	0,05

Características	Todos	Homens	Mulheres	p¹
GGT > ULNR – n. (%)	34 (72)	26 (89,6%)	11 (61,1%)	0,17
Ferritina (ng/mL)	366,4 (165,5-540,5)	472,2 (305,8- 625,3)	142 (60,4-292,1)	<0,0001
Ferritina > ULNR – no. (%)	24 (51)	20 (68,9)	4 (22,2)	0,0001
FHG por RM – n. (%)	19 (13,8-30)	23 (15,5-33,5)	16,1 (13,5-25,8)	0,26
FIB4 score	0,96 (0,66-1,1)	0,81 (0,63-1,17)	1,15 (0,73-1,24)	0,23
BARD score	1 (1-2)	1 (1-2)	1 (1-3)	0,14

Valores apresentados como mediana (intervalo interquartil).

¹ valor de p pelo teste de Mann-Whitney para variáveis contínuas e teste exato de Fisher para variáveis categóricas.

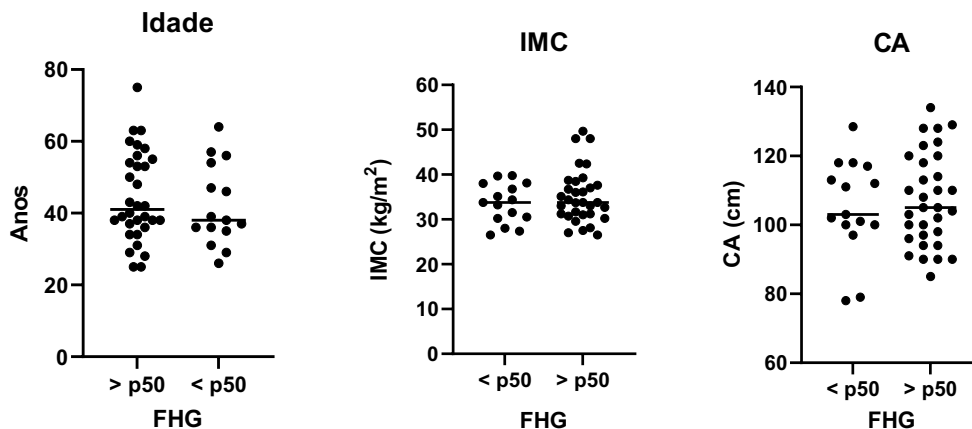
² Avaliado apenas em participantes com tolerância normal à glicose.

ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; IMC: índice de massa corporal; GJ: glicose plasmática de jejum; IJ: insulina plasmática em jejum; FIB4: fibrose-4; HbA1c: hemoglobina glicada; HDL-C: colesterol de lipoproteína de alta densidade; FHG: fração de gordura hepática; HOMA-IR: Modelo Homeostático de Avaliação da Resistência à Insulina; LDL: lipoproteína de baixa densidade; CT: colesterol total; TG: triglicérideo; ULNR: limite superior da faixa normal; CC: circunferência da cintura.

5.3.2 Variáveis Clínicas e Bioquímicas de acordo com o Grau de Fração Hepática de Gordura

Examinamos a associação entre as variáveis clínicas e bioquímicas e a FHG determinada por ressonância magnética agrupando os sujeitos do estudo em dois grupos, de acordo com se o FHG estava abaixo ou acima do valor mediano do FHG (15,9%). As concentrações séricas de triglicerídeos séricos foram significativamente maiores entre os indivíduos com FHG acima da mediana (Figura 1C). Não houve diferença com relação à idade, variáveis antropométricas, concentrações séricas de enzimas hepáticas ou outras variáveis bioquímicas relacionadas ao metabolismo da glicose e resistência à insulina e concentrações séricas de IGF-1 (Figura 1), de acordo com o grau de FHG. Também não encontramos diferença de gênero, frequência de DM2 e escores de FIB4 e BARD de acordo com a FHG.

A



B

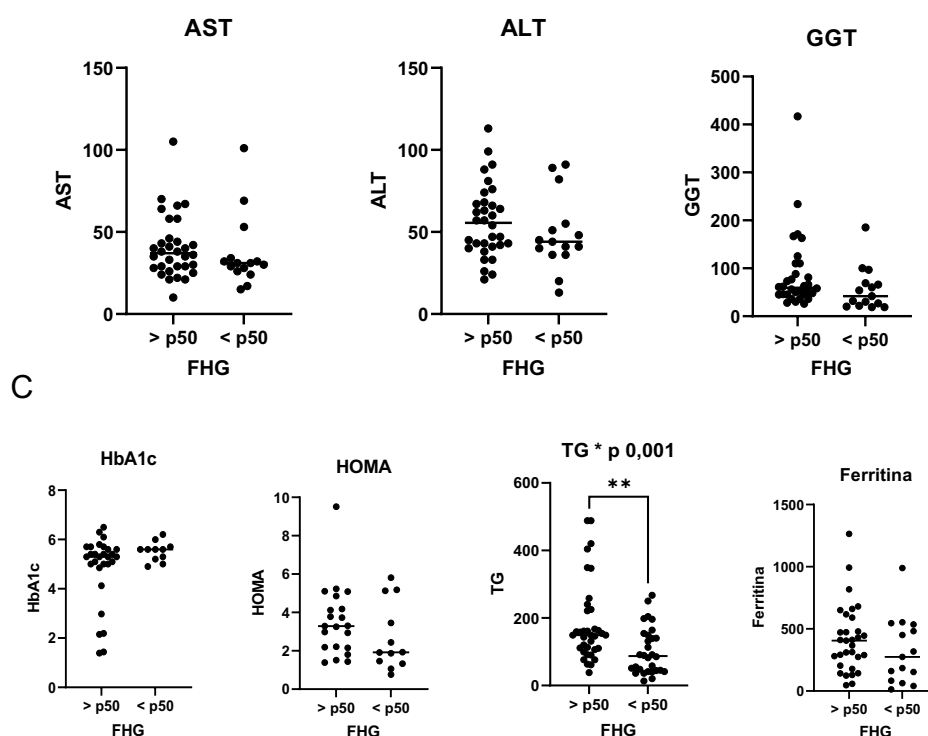


Figura 1 - Associação entre as variáveis clínicas e bioquímicas e a FHG de acordo com a mediana da FHG avaliadas pelos testes de Fisher e Mann-Whitney.

A – Idade > p 50: 41 anos < p 50: 38 anos (p 0,49); IMC > p 50: 33,8 kg/m² < p50: 33,8 kg/m² (p 0,60); CA > p 50: 105 cm < p 50: 103 cm (p 0,86);

B – AST > p 50: 37 U/L < p 50: 31 U/L (p 0,28); ALT > p 50: 56,4 U/L < p 50: 48,8 U/L (p 0,28); GGT > p 50: 86,1 U/L < p 50: 56,1 anos (p 0,17);

C – HbA1c > p 50: 5,3 % < p 50: 5,6% anos (p 0,20); HOMA-IR > p 50: 3,52 < p 50 2,69 (p 0,21); TG > p 50: 182,9 mg/dL < p 50: 102,4 mg/dL (p 0,001); Ferritina > p 50: 417,9 ng/dL < p 50: 322,9 ng/dL (p 0,97).

5.3.3 Correlação entre Variáveis Clínicas e Bioquímicas e Fração Hepática de Gordura

Também examinamos a correlação linear entre FHG e variáveis clínicas e bioquímicas. Quando homens e mulheres foram considerados juntos e independentemente do status de tolerância à glicose, nenhuma das variáveis avaliadas se correlacionou com FHG. No entanto, a análise de subgrupo com base no sexo indicou que as concentrações séricas de insulina no plasma em jejum e HOMA-IR foram positiva e moderadamente correlacionados com a FHG em homens, mas não em mulheres, entre os participantes com tolerância normal

à glicose (Tabela 2). As concentrações séricas de glicose em jejum foram moderadas e significativamente correlacionadas com a FHG em mulheres, mas não em homens (Tabela 2).

Tabela 2. Correlação entre a fração de hepática de gordura e variáveis clínicas e metabólicas.

Características	Todos ¹	p	Homens ¹	p	Mulheres ¹	p value
Número	47		29		18	-
Idade – anos	0,06	0,99	0,88	0,96	0,33	0,17
IMC (kg/m ²)	0,03	0,81	0,09	0,60	-0,03	0,88
CC (cm)	-0,04	0,74	0,11	0,59	-0,18	0,58
GJ – mg/dL	0,20	0,17	0,03	0,87	0,65	0,003
IJ – mUI/L	0,30	0,08	0,53	0,01	-0,10	0,73
HOMA-IR	0,29	0,10	0,46	0,03	0,02	0,94
HbA1c – %	0,10	0,48	0,01	0,87	0,40	0,11
CT – mg/dL	-0,01	0,92	0,12	0,50	-0,22	0,38
HDL-C – mg/dL	-0,12	0,40	-0,04	0,83	-0,22	0,37
TG – mg/dL	0,05	0,72	0,22	0,24	0,10	0,69
AST – U/L	0,26	0,06	0,27	0,15	0,35	0,24
ALT – U/L	0,24	0,10	0,08	0,65	0,36	0,13
GGT – U/L	0,02	0,87	0,05	0,79	0,17	0,49

Características	Todos ¹	p	Homens ¹	p	Mulheres ¹	p value
Ferritina (ng/mL)	0,16	0,26	0,08	0,65	0,23	0,36
FIB4	0,13	0,37	0,09	0,61	0,32	0,18
BARD	0,05	0,72	0,06	0,75	0,45	0,05

¹ Valores apresentados como r^2 Spearman.

ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; IMC: índice de massa corporal; GJ: glicose plasmática de jejum; IJ: insulina plasmática em jejum; FIB4: fibrose-4; HbA1c: hemoglobina glicada; HDL-C: colesterol de lipoproteína de alta densidade; HFF: fração de gordura hepática; HOMA-IR: Modelo Homeostático de Avaliação da Resistência à Insulina; LDL: lipoproteína de baixa densidade; CT: colesterol total; TG: triglicerídeo; CC: circunferência da cintura.

5.4 DISCUSSÃO

Neste estudo investigamos se as características clínicas e bioquímicas de resistência à insulina e síndrome metabólica estavam associadas ao conteúdo de gordura hepática avaliado por ressonância magnética entre indivíduos com DHGNA e sobrepeso / obesidade. Selecionamos sujeitos com características homogêneas quanto ao estado nutricional, mas que variaram em relação a outras características, como idade, sexo e alterações bioquímicas relacionadas à resistência à insulina. Esses dados permitiriam a identificação de fatores que interagem com o sobrepeso / obesidade para levar ao acúmulo de lipídios hepáticos. As concentrações séricas de triglicerídeos foram significativamente maiores entre os indivíduos com FHG acima da mediana, e a análise de subgrupo indicou que as concentrações séricas de insulina no plasma em jejum e HOMA-IR foram significativamente correlacionadas com o conteúdo de

gordura hepática em homens com tolerância normal à glicose, e as concentrações séricas de glicose em jejum foram significativamente correlacionados com a hepática teor de gordura em mulheres, independentemente do estado de tolerância à glicose.

Estudos de base populacional indicam que a prevalência de DHGNA é maior entre os homens do que entre as mulheres (173,174), embora os indivíduos com DHGNA e peso corporal normal, descritos como “DHGNA magros”, sejam mais frequentemente mulheres. As razões para as diferenças de gênero na prevalência de DHGNA não são completamente compreendidas, e o papel de fatores como resistência à insulina, metabolismo hepático do álcool e hormônios sexuais não está claramente definido (175). Por outro lado, se há diferenças de gênero na associação de variáveis antropométricas e metabólicas com o conteúdo de gordura hepática entre indivíduos com DHGNA estabelecida, permanece amplamente inexplorado. Neste estudo, avaliamos homens e mulheres de peso semelhante apresentando evidências ultrassonográficas de esteatose hepática, que foi posteriormente confirmada pela observação de fração hepática de gordura superior a 5% determinada por RM.

Nós investigamos a associação entre o conteúdo de gordura hepática e variáveis clínicas e bioquímicas usando duas abordagens. Primeiro, agrupamos os sujeitos do estudo de acordo com o DHGNA abaixo ou acima da mediana da FHG. Descobrimos que as concentrações séricas de triglicerídeos séricos foram significativamente maiores entre os indivíduos com FHG acima da mediana quando comparados com aqueles com FHG abaixo da mediana. Nenhuma das outras variáveis clínicas, antropométricas e metabólicas examinadas foi associada ao quartil de gordura hepática. Em seguida, avaliamos se a FHG considerada como variável contínua estava correlacionada com a idade, IMC, circunferência da cintura, medidas séricas de glicose e homeostase lipídica, concentrações séricas de enzimas hepáticas e concentrações séricas de ferritina. Na amostra geral, nenhuma dessas variáveis foi correlacionada com o conteúdo de gordura hepática, mas a análise de subgrupo indicou que as concentrações séricas de insulina no plasma em jejum e HOMA-IR foram moderadas e positivamente correlacionados com a fração de gordura hepática entre homens, mas não mulheres, entre participantes com tolerância normal à glicose. Nossos achados gerais são consistentes com aqueles de estudos

anteriores que abordaram o desempenho de anormalidades metabólicas para prever o conteúdo de gordura do fígado quantificado por RM.

Lallukka et al (2017) avaliaram 97 indivíduos com sobrepeso e descobriram que as medidas de composição corporal e de anormalidades de glicose e metabolismo de lipídios falharam em prever o conteúdo de gordura hepática no início e após um acompanhamento médio de 11 anos (176). Da mesma forma, Costanzo et al (2019) mostraram que medidas de composição corporal e relacionadas à resistência à insulina explicaram apenas 8,7% da variação de FHG entre crianças obesas (177). Os achados de nosso estudo e de estudos anteriores sugerem que pode ser difícil prever o grau de acúmulo de gordura hepática em indivíduos com obesidade apenas com base em medidas clínicas e bioquímicas obtidas rotineiramente na prática clínica.

O desempenho das anormalidades metabólicas para prever o grau de conteúdo de gordura hepática deve ser interpretado à luz da significância da quantificação de gordura hepática determinada por ressonância magnética. A ressonância magnética com desvio químico é atualmente reconhecida como um método preciso e altamente sensível para a avaliação do conteúdo de gordura hepática em adultos (53, 178) e crianças (179) com DHGNA, com vantagens sobre a avaliação histológica por ser não invasivo e reprodutível (180). Apesar de seu valor diagnóstico para quantificação do acúmulo de gordura hepática (181), a ressonância magnética pode ser uma ferramenta limitada para discriminar entre DHGNA leve e EHNA ou fibrose hepática. Isso é digno de nota, visto que a identificação de esteatohepatite e fibrose no curso da DHGNA é um aspecto crítico de seu manejo.

Permutt et al. (2013) relataram uma estreita correlação entre o conteúdo de gordura hepática determinado por ressonância magnética e o grau de esteatose na avaliação histológica em 51 indivíduos com DHGNA. A fração de gordura hepática média foi de 8,9%, 16,3% e 25% nos graus 1, 2 e 3 de esteatose, respectivamente. No entanto, os indivíduos com fibrose em estágio 4 exibiram um menor grau de esteatose na avaliação histológica e por ressonância magnética quando comparados àqueles com fibrose em estágio 0 a 3 (55). Esses achados sugerem que a esteatose não está linearmente relacionada à gravidade da DHGNA e poderia explicar a falta de correlação entre a gravidade da doença com os marcadores, como concentrações séricas de enzimas

hepáticas e ferritina e o conteúdo de gordura hepática aqui observado. No entanto, é mais provável que tenhamos incluído indivíduos com DHGNA não grave neste estudo. Embora não tenhamos realizado avaliação histológica para detectar esteatohepatite ou fibrose, usamos duas ferramentas não invasivas para prever o risco de fibrose hepática. Tanto o índice FIB-4 quanto o escore BARD são relatados como tendo bom desempenho diagnóstico, especialmente para excluir fibrose avançada (182,64,68), prevendo um baixo risco geral de fibrose hepática nos indivíduos incluídos, sugerindo que o conteúdo de gordura hepática pode variar significativamente entre os pacientes com DHGNA não grave.

A quantificação da gordura hepática também foi abordada como uma ferramenta para monitorar a resposta ao tratamento com DHGNA, mas não está claro se as mudanças na gordura hepática predizem mudanças nos resultados histológicos além da esteatose (183). Em uma análise secundária do ensaio MOZART, que randomizou indivíduos com EHNA para receber ezetimiba 10 mg / d ou placebo por 24 semanas, Patel et al. (2016) relataram que o grau de declínio da gordura hepática determinado por ressonância magnética foi associado à resposta histológica (57). Por outro lado, em um ensaio de controle randomizado mais recente que investigou o efeito do tratamento com pioglitazona na EHNA, a redução do conteúdo de gordura hepática avaliada por ressonância magnética foi correlacionada com uma redução na esteatose, mas não com melhora de outros resultados histológicos, como anormalidades inflamatórias ou fibrose (58). Portanto, as evidências atuais de estudos clínicos que abordam o desempenho da quantificação da gordura hepática por ressonância magnética para prever a gravidade da DHGNA ou para monitorar sua resposta ao tratamento suportam que a gordura hepática determinada pela ressonância magnética é uma ferramenta limitada para avaliar as características críticas da DHGNA, como inflamação e fibrose. No entanto, se a combinação da avaliação da gordura hepática e outros marcadores poderiam auxiliar na avaliação da gravidade da DHGNA, ainda não foi estabelecido.

É importante ressaltar que estudos anteriores abordaram o desempenho de marcadores clínicos e bioquímicos de resistência à insulina e síndrome metabólica para predizer a gravidade do acúmulo de gordura no fígado, avaliada por ultrassonografia, em indivíduos de diferentes populações e com diferentes

status de tolerância à glicose. Estudo chinês avaliando 7.759 crianças e adolescentes encontrou uma prevalência de DHGNA por US de 4,36%, maior em meninos comparado às meninas (5,61% vs. 1,9%, $P < 0,001$), e esta prevalência foi positivamente correlacionada com a razão não-HDLc/ HDLc ($p < 0,001$) (178). Estudo longitudinal com acompanhamento de 5 anos de 20.628 homens coreanos sem resistência insulínica (HOMA-IR $< 2,7$) no baseline da avaliação mostrou que a taxa de incidência de RI aumentou de acordo com o grau de DHGNA avaliada por US (normal: 11,6%, leve: 28,8%, moderada a grave: 40,5%, $P < 0,001$). O modelo de riscos proporcionais de Cox mostrou que o HR para RI aumentou proporcionalmente ao grau de DHGNA leve 1,19 (1,02-1,39), moderado a grave 1,32 (1,08-1,5) (184). O fato de os marcadores específicos de resistência à insulina associados à gravidade dos achados ultrassonográficos na DHGNA variarem em cada estudo sugere que a referida associação pode ser modificada por outros fatores, como características genéticas e estado de tolerância à glicose. Estudo avaliando conteúdo hepático de gordura por RM em 113 adultos sem obesidade e sem diabetes, encontrou HOMA-IR significativamente correlacionado com o conteúdo de triglicerídeos hepáticos ($r: 0,76$; $p < 0,0001$) e mesmo no grupo magro com DGHNA, HOMA-IR estava significativamente maior ($p < 0,001$) do que o grupo com sobrepeso sem DHGNA. A resistência à insulina foi independentemente associada com DHGNA, mas não com a circunferência da cintura ou IMC (185).

Dessa forma, embora em alguns estudos a determinação ultrassonográfica de gordura hepática aumentou com o aumento de triglicerídeos (186, 187), glicose (188) e concentrações séricas de enzimas hepáticas (186,187) e com níveis decrescentes de colesterol HDL (186,188), o fato de que os marcadores específicos de resistência à insulina associados à gravidade de achados ultrassonográficos na DHGNA variaram em cada estudo sugere que a associação acima mencionada pode ser modificada por outros fatores, como genéticos e características do status de tolerância à glicose. Os resultados de estudos envolvendo avaliação ultrassonográfica da gordura hepática em DHGNA (189) contrasta com aqueles relatados em estudos que avaliam o conteúdo de gordura hepática por ressonância magnética (57,58), incluindo o presente estudo. Não é possível comparar precisamente o desempenho de

ultrassonografia e ressonância magnética na determinação do acúmulo de gordura no fígado, uma vez que o primeiro ferramenta qualitativa e depende mais significativamente do operador.

Não encontramos associação significativa entre as concentrações séricas de ferritina sérica e a fração hepática de gordura. Vários estudos avaliaram se concentrações séricas de ferritina sérica estaria associada a gravidade da DHGNA conforme citaremos a seguir. Mousavi avaliou 30 pacientes com DHGNA definida por histologia, com idade média de 37,9 anos e IMC médio de 26,5. Onze (36,7%) pacientes apresentaram níveis de ferritina acima de 200 ng/L. Os homens apresentaram ferritina significativamente mais altos que as mulheres ($280,08 \pm 222,92$ vs. $97,27 \pm 102,77$, $p = 0,011$). Também nesse estudo não houve correlação entre concentrações séricas de ferritina e idade, índice de massa corporal (IMC), concentração de enzimas hepáticas, glicemia em jejum ou lipídios séricos (190).

Amin avaliou 40 pacientes diabéticos tipo 2 diagnosticados com DHGNA por índice de fígado gorduroso ao US (grupo I), 40 pacientes diabéticos sem DHGNA (grupo II) e 15 pessoas aparentemente saudáveis, com idade e sexo pareados como grupo controle (grupo III). A ferritina sérica estava significativamente aumentada no grupo I DM com DHGNA em comparação com outros dois grupos. Houve correlação positiva significativa entre ferritina sérica e idade, duração do diabetes, peso, IMC, relação cintura quadril, pressão arterial sistólica e demais variáveis metabólicas no grupo DHGNA. Houve uma correlação significativa entre a ferritina sérica e a duração do diabetes, pressão arterial sistólica e diastólica, glicemia em jejum comparado ao grupo sem DHGNA (191).

Estudo transversal chinês envolvendo 2029 adultos, entre 35 e 70 anos com peso normal comparou concentrações séricas de ALT e ferritina sérica (FS). Comparados aos controles, indivíduos com DHGNA apresentaram maiores concentrações de ferritina sérica Q1 ferritina < 21 mcg/dL vs Q4 $> 88,5$ mcg/dL, (OR = 4,64, IC 95%: 3,21-6,71 $p < 0,001$) e ferritina alta estava associada a um risco aumentado de DHGNA para o quartil mais alto versus o mais baixo no modelo não ajustado. Após o ajuste para idade, sexo e IMC (modelo 1), os resultados (OR = 3,51, IC 95%: 2,31-5,34) permaneceram semelhantes aos ORs

brutos. A análise da curva ROC revelou uma capacidade preditiva de ferritina sérica elevada para DHGNA com uma área da curva de 0,660 (IC 95%, 0,63-0,69). Além disso, ferritina alta foi significativamente associado ao aumento do risco de elevação da ALT (OR = 1,84, IC 95%: 1,32-2,55). Nas análises estratificadas por sexo e idade, as associações positivas de FS com o risco de DHGNA e ALT elevado foram observadas apenas nas mulheres e no grupo de 35 a 49 anos (192).

Estudo transversal coreano avaliou ferritina e DHGNA definida por US. A concentração sérica média de ferritina (FS) foi de $149,5 \pm 60,4$ ng/mL nos homens e $42,1 \pm 35,1$ ng/mL nas mulheres. A concentração de FS aumentou significativamente em homens com obesidade ($163,9 \pm 58,6$ ng/dL vs. $143,5 \pm 60,2$ ng/dL p 0,008), SM ($171,4 \pm 64,2$ ng/dL vs. $145,1 \pm 58,7$ ng/dL p 0,010), DHGNA à US ($157,5 \pm 63,1$ ng/dL vs. $142,9 \pm 57,4$ ng/dL p 0,042) e índice de fígado gorduroso ≥ 60 ($165,1 \pm 64,3$ ng/dL vs. $145,2 \pm 58,7$ ng/dL p 0,029). Entre mulheres, apenas a incidência de DHGNA à US aumentou significativamente com o aumento do quartil de concentração sérica de ferritina (1,9%, 3,8%, 3,4%, 6,1% p 0,012). A concentração sérica de ferritina aumentou significativamente à medida que a gravidade do DHGNA aumentou de normal para grave (normal: $142,9 \pm 57,4$; leve: $142,2 \pm 57,9$; moderada: $166,2 \pm 68,4$; moderada: $166,3 \pm 68,4$; grave: $200,4 \pm 49,0$ ng / mL p <0,001) (193).

Estudo indiano avaliou dados de DHGNA definida por histologia em um período de três anos. Cinquenta e cinco dos 250 pacientes com DHGNA com esteatose ao US e transaminases aumentadas (> 40 UI/L) foram submetidos a biópsia hepática. A estratificação foi realizada de acordo com a histologia: 1) com ou sem inflamação, mas sem fibrose e EHNA com fibrose / cirrose. Entre os 55 pacientes, esteatose (com ou sem inflamação, mas sem fibrose/balão) foi observada em 35 pacientes, fibrose/balonização em 14 pacientes e cirrose em 6 pacientes. Embora FS tenha sido baixa em indivíduos indianos, mesmo valores dentro da faixa aparentemente normal indicavam fibrose e cirrose: média nos grupos com DHGNA e EHNA com cirrose $39,4$ e $72,7$ ng/mL, respectivamente (p <0,001). Entre os controles foram de $51,2$ e $35,2$ ng/mL, respectivamente (p <0,05). A área sob a curva ROC da ferritina sérica com o valor de $48,0$ ng/mL foi de 0,779. Houve correlação entre Fibroscan e transaminases: Fibroscan e

ferritina sérica foi de 0,9864 enquanto o de AST e ALT foi de 0,69. A ferritina sérica no ponto de corte de 48 ng/mL diferenciou significativamente os pacientes com fibrose e maior média de kPa ao Fibroscan (10,9 vs 18,3 $p < 0,05$) assim como plaquetas (264 vs 160 per mL $p < 0,05$) (194).

Também mostramos que as concentrações séricas de ferritina foram significativamente mais baixos nas mulheres do que nos homens. Isso não foi observado em estudo anterior realizado por Buzzetti para investigar a associação entre a ferritina sérica e a gravidade da DHGNA. Os autores relataram que não houve diferença de gênero nas concentrações séricas ferritina sérica, além de descreverem que não estava associada a esteatohepatite, mas aumentava na presença de F3 e diminuía na presença de fibrose F4 em comparação com F0-F1 (195). No entanto, os dados do último estudo não são facilmente comparáveis com os dados aqui apresentados porque Buzzetti et al. (2019) avaliaram indivíduos mais velhos em geral (idade média de 47 anos) do que os incluídos neste estudo (idade mediana de 38 anos), e examinaram resultados diferentes, de modo que não é possível descartar que as mulheres incluídas em nosso estudo tiveram DHGNA mais leve e, portanto, concentrações mais baixas de ferritina sérica.

Acreditamos que mais estudos devem avaliar se concentrações séricas de ferritina sérica podem ajudar a identificar pacientes com DHGNA e teor de gordura hepática determinado por ferramentas não invasivas, como a ressonância magnética.

Curiosamente, quando examinamos a correlação entre o conteúdo de gordura hepática e as anormalidades bioquímicas relacionadas à resistência à insulina, observamos que as concentrações séricas de insulina no plasma em jejum e HOMA-IR estavam correlacionados com a gordura do fígado apenas em homens, e os níveis de glicose no plasma em jejum estavam correlacionados com a FHG apenas entre as mulheres. Estudos futuros devem avaliar se há dimorfismo sexual na relação entre resistência clínica e bioquímica e resistência à insulina e níveis de glicose em jejum.

Em nosso estudo incluímos 13 pacientes com DM2. Portadores de DHGNA têm risco 2 a 6 vezes maior de diabetes tipo 2 e/ ou doença cardiovascular. Esse risco é particularmente alto se houver obesidade abdominal

e principalmente se houver resistência à insulina (196). A DHGNA é altamente prevalente em pacientes com síndrome metabólica e todos os seus componentes se correlacionam com o grau de conteúdo de gordura hepática. Pacientes com DM2 mesmo com concentrações séricas normais de ALT apresentam alta prevalência de esteatose quando avaliados por RM (197).

A resistência à insulina gera sobrecarga sobre as células beta pancreáticas para produzir mais insulina. Em alguns indivíduos, isso resulta no comprometimento progressivo da função das células beta pancreáticas e, por sua vez, em aumento do risco para DM2. Mas essa progressão não é linear, pois depende de predisposições ou proteções genéticas e os indivíduos podem ou não ter deterioração dos mecanismos compensatórios de reparo hepático, levando-os de DHGNA para EHNA (198). A DHGNA "metabólica" e "genética" identificam dois fenótipos diferentes: o primeiro está associado à RI e à redução da flexibilidade metabólica e muitas evidências indicam que a RI pode preceder DHGNA "metabólica". A DHGNA 'genética' não está necessariamente associada a RI ou lipotoxicidade, mas ao excesso de ingestão calórica e ao aumento da gordura total que aumentam sinergicamente o risco de progressão da doença hepática no DHGNA 'genético' (199).

O potente efeito inibitório da insulina na lipase sensível ao hormônio (HSL), que é o principal regulador da liberação de AGLs pela lipólise do tecido adiposo, é prejudicado devido à resistência à insulina, resultando em um aumento na liberação de AGL do tecido adiposo e influxo de AGLs para o fígado. Além da HSL, a lipase triglicéridica adiposa (ATGL) também está envolvida na lipólise (200).

A relação entre causa ou consequência de DHGNA e DM2 ainda permanece aberta. Estudo coreano avaliou 70.303 indivíduos com IMC normal e sem diabetes por 7,8 anos e mostrou que mesmo indivíduos sem obesidade central, mas apresentando esteatose ao US, o risco para diabetes incidente no seguimento foi de 2,17 (1,56-3,03) para homens e 2,86 (1,50-5,46) para mulheres (201).

A relação entre hiperglicemia/DM2 e DHGNA está bem estabelecida em várias populações como estudo indiano avaliou 464 pacientes com DHGNA e 181 pacientes controle. Os pacientes com DHGNA apresentaram glicemia em

jejum (101,88 vs 90,87 mg/dl) e triglicerídeos (196,16 vs 133,20 mg/dl) significativamente mais elevados (202). Lomonaco e cols avaliou 154 pacientes com obesidade divididos em quatro grupos: 1) controle (sem DM2 ou DHGNA), 2) DM2 sem DHGNA, 3) DM2 com esteatose isolada e 4) DM2 com EHNA. Os parâmetros metabólicos pioraram progressivamente com a presença de DM2 e o desenvolvimento de esteatose hepática, com pior hiperinsulinemia, resistência à insulina e dislipidemia (hipertrigliceridemia e baixo HDL-c) naqueles com EHNA ($p < 0,001$) (203).

Estudo realizado na Malásia avaliando 557 pacientes por elastografia transitória (idade média de $61,4 \pm 10,8$ anos, sexo masculino 40,6%). A prevalência de DHGNA e fibrose avançada baseada em elastografia transitória foi de 72,4% e 21,0%, respectivamente. Na análise multivariada, os fatores independentes associados à DHGNA foram obesidade central (OR 4,856, IC 95% 2,749-8,577, $p = 0,006$), triglicerídeos (OR 1,585 IC 95% 1,056-2,381, $p = 0,026$) e concentrações séricas de ALT (OR 1,047 IC 95% 1,025-1,070, $p < 0,001$) enquanto fibrose avançada foi associada ao HDLc (OR 0,355, IC 95% 0,126-0,997, $p 0,049$), ALT (OR 1,023, IC 95% 1,009 -1,037, $p 0,001$), GGT (OR 1,005, IC 95% 1,001,008, $p 0,017$) e plaquetas (OR 0,995, IC 95% 0,992–0,999, $p 0,010$). Curiosamente não teve relação com duração do diabetes (sem DHGNA maior tempo de doença 17,9 anos x 15,8 8 anos $p 0,04$) e mesmo controle glicêmico por HbA1c 7,7% em ambos os grupos (204).

Metanálise de um total de 19 estudos observacionais com 296.439 indivíduos (30,1% com DHGNA) identificou quase 16.000 casos de diabetes incidente ao longo de uma mediana de 5 anos. Pacientes com DHGNA tiveram um risco maior de diabetes incidente do que aqueles sem DHGNA (taxa de risco de efeitos aleatórios com RR 2,22, IC 95% 1,84-2,60). Ressalta-se que, embora a DHGNA esteja significativamente associada a um risco duas vezes maior de diabetes incidente, o desenho observacional dos estudos elegíveis não permite provar a causalidade (205). Revisão sistemática de Lalluka avaliou que, em 12 dos 14 estudos, GGT ou ALT ou AST ou uma combinação dessas enzimas foi um preditor significativo de DM2, independentemente da idade, IMC e consumo de álcool. A GGT foi um preditor significativo em 10 de 11, ALT em 10 de 13 e AST em três dos sete estudos. GGT e ALT previram DM2 mesmo na faixa

normal. ALT menor ou maior que 40 UI/L obteve um RR 3,1 em um estudo australiano e estudo coreano RR 2,20 em homens e 1,97 para mulheres em seguimento de 2 anos. Para a GGT o RR variou de 2,61 a 4,7 em estudos japoneses, britânicos, mexicanos, ingleses, alemães, italianos e coreanos comparando os quartis 1 e 4 (206).

Dessa forma, o diagnóstico de DM2 aumenta a probabilidade de um indivíduo ter DHGNA e suas as complicações. No entanto, estudos que examinam o efeito do tratamento de medicamentos antidiabéticos são extremamente heterogêneos com as evidências atuais, sugerindo apenas efeitos limitados de modificação da doença em diferentes classes de agentes. Existem muitos desafios no diagnóstico e tratamento da DHGNA em pacientes com diabetes. A adaptação de uma estratégia de tratamento individual para otimizar o controle metabólico com o potencial de melhorar o fenótipo hepático é o atual padrão-ouro (207).

Nosso estudo é limitado pelo pequeno tamanho da amostra e seus dados transversais. Este último impede a afirmação de que as variáveis clínicas e metabólicas podem prever alterações de longo prazo no conteúdo de gordura hepática em indivíduos com obesidade com tolerância normal à glicose. Nosso objetivo foi investigar a interação de variáveis metabólicas com sobrepeso / obesidade para prever o grau de acúmulo de gordura hepática; no entanto, reconhecemos que a avaliação histológica de esteatohepatite teria permitido insights valiosos sobre o significado clínico do conteúdo de gordura do fígado.

5.5 CONCLUSÃO

Avaliamos a concentração hepática de gordura por RM, o método de imagem de maior precisão diagnóstica, porém reconhecemos sua limitação para detecção de risco para fibrose.

Nossos achados sugerem que concentrações séricas de triglicerídeos séricos predizem o conteúdo de gordura hepática medido por ressonância magnética em adultos com sobrepeso / obesidade com DHGNA, embora outras anormalidades metabólicas clínicas e bioquímicas relacionadas à resistência à insulina não tenham sido capazes de predizê-lo.

Encontramos ainda, em nossos dados, indicadores de que pode haver dimorfismo sexual na associação entre as alterações metabólicas e o grau de acúmulo de gordura hepática. Isso é consistente com a fisiopatologia complexa da DHGNA, apesar do papel crucial da resistência à insulina.

6. CAPÍTULO 2

ENSAIO CLÍNICO PILOTO COM DAPAGLIFLOZINA E AVALIAÇÃO DE
COMPRIMENTO DE TELÔMEROS EM DOENÇA HEPÁTICA GORDURA
NÃO ALCOÓLICA

6.1. INTRODUÇÃO

Embora a DHGNA esteja intimamente interligada com síndrome metabólica e diabetes mellitus, a esteatose hepática possui mecanismos fisiopatológicos peculiares na sua evolução histológica que ainda carecem de explicitações e os marcadores não-invasivos ainda precisam de melhores resultados. Recentes estudos mostraram diminuição no eixo do GH-IGF-1 está intimamente associada com a progressão da DHGNA geral, sugerindo um papel fisiológico desses hormônios para a manutenção da função normal do fígado. Porém ainda não está claro o papel de cada um desses hormônios na inflamação hepática. Acredita-se que o metabolismo prejudicado nos estados de resistência à GH resulta de ações diretas do GH na captação lipídica e na lipogênese de novo, enquanto suas ações nos tecidos extra-hepáticos são mediadas pelo IGF-1 (208).

O GH reduz a gordura visceral, que desempenha um papel importante no desenvolvimento da DHGNA. Além disso, o GH reduz diretamente a lipogênese nos hepatócitos. O IGF-I induz a senescência celular e inativa as células estreladas hepáticas, amenizando o risco para fibrose (37). No entanto, até o momento, para nosso conhecimento, carecem estudos correlacionando as concentrações séricas de IGF-1 e a alterações de transaminases e concentração hepática de gordura.

O tratamento padrão recomendado atualmente para pacientes com DHGNA é a mudança de estilo de vida com redução do peso corporal e atividade física. Intervenções dietéticas e de exercícios permanecem como primeira linha de terapia, visando principalmente o controle do peso corporal e de fatores de risco cardiometabólico relacionados à síndrome metabólica (8, 104).

Dentre os antidiabéticos orais, os inibidores de cotransportador de sódio-glicose tipo 2 (ISGLT2), estão sendo estudados para DHGNA (209). Ipragliflozina um ISGLT2 tem sido muito estudada no Japão em pacientes com DM2 e DHGNA (210-213). A dapagliflozina demonstrou melhora da composição corporal e adiposidade em pacientes com DM2 e DHGNA (214), e os estudos demonstrando proteção cardiovascular expressiva com canagliflozina (215), empagliflozina (216) e dapagliflozina (217) em portadores de diabetes e em insuficiência cardíaca sem diabetes mellitus com dapagliflozina (218) garantem

segurança para avaliação dos seus efeitos em DHGNA, porém ainda faltam estudos na população sem diabetes.

O encurtamento de telômeros deve-se à incapacidade do mecanismo de replicação do DNA para copiar os últimos nucleotídeos da fita atrasada, o que é especialmente problemático em células somáticas, devido a atividade da telomerase reduzida ou ausente. Dessa forma, os únicos mecanismos que neutralizam a perda dos telômeros são os que auxiliam na replicação e reparam os danos (162). As espécies reativas de oxigênio (EROs) podem danificar os ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos se não forem removidas pelo arsenal de enzimas antioxidantes da célula que inclui as peroxidases e peroxirinas (163).

Obesidade, uma doença inflamatória crônica de baixo grau está associada a telômeros mais curtos que se deve em grande parte ao aumento da produção de EROs no tecido adiposo (13,164). O desenvolvimento da DHGNA e sua progressão para EHNA são comumente acompanhados por vários eventos fisiopatológicos, incluindo desregulação metabólica e fenômenos inflamatórios que ocorrem no fígado, que podem contribuir ou derivar da senescência celular (219). Os estudos clínicos apoiam que a senescência celular está ligada a DHGNA. Verificou-se também que o telômeros eram mais curtos e área nuclear era menor nas biópsias hepáticas de pacientes com DHGNA comparados aos controles. O dano ao DNA, indicado pela expressão de gamaH2AX (uma variante da histona H2A gerada após fosforilação em serina), é maior em pacientes com DHGNA acompanhados pela maior expressão de p21, indicando uma parada do ciclo celular na fase G1/S. Tanto a área da p21 quanto a área nuclear foram correlacionadas com o estágio de fibrose (220).

Os objetivos do presente estudo consistem em avaliar correlação entre concentrações séricas de IGF-1 e o comprimento dos telômeros com DHGNA avaliada por fração hepática de gordura (FHG) medida por ressonância magnética (RM). Também conduzimos um ensaio clínico piloto para avaliar a efetividade de dapagliflozina em redução da concentração hepática de gordura e concentrações séricas de transaminases hepáticas e marcadores de resistência insulínica (HOMA-IR) e comprimento de telômeros.

6.2. MATERIAS E MÉTODOS

O estudo segue as normas internacionais conforme estipuladas pela Declaração de Helsinki e foi aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa da Faculdade Patos de Minas. Todos os pacientes receberam um termo de consentimento livre e esclarecido e, somente aqueles que aceitaram a participação iniciaram o estudo e foram incluídos. Tratou-se de clínico intervencionista aberto, simples cego, controlado com placebo, randomizado, com inclusão de pacientes acima de 20 anos, com e sem diabetes mellitus tipo 2, selecionados em clínica de Radiologia, a partir de resultados de ultrassonografia evidenciando aumento da ecogenicidade hepática sugestivo de esteatose hepática. Foram incluídos pacientes acima de 20 anos que apresentaram alterações em transaminases com o ponto de corte superior a 35 U/L e fração hepática de gordura acima de 5,5% por RM. O diagnóstico de DM2 foi feito a partir da história clínica de pacientes em tratamento para diabetes, e foram incluídos aqueles sem uso de terapia insulínica ou AGLP-1 e em uso de, no máximo, dois anti-hiperglicemiantes orais.

Os critérios de exclusão foram: uso de álcool > 30 gramas/dia em 10 anos para homens e > 20 gramas/dia para mulheres (conforme relato dos pacientes do consumo de álcool por semana: frequência máxima de duas vezes por semana nos últimos 5 anos), hepatites virais B e C, HIV, fármacos que prejudicam a beta-oxidação de ácidos graxos (metotrexate, amiodarona, tetraciclina, tamoxifeno, quimioterápicos), hepatite autoimune, doenças biliares, distúrbios genéticos metabólicos, ferritina acima de 1000 mg/dL, infecção do trato urinário de repetição, diabéticos em uso de análogos de GLP-1 ou em terapia tripla oral ou em terapia com insulina.

6.2.1 Grupos de Randomização e Tratamento

Em cada grupo, tratamento e placebo, os indivíduos que atenderam a todos os critérios de elegibilidade e forneceram consentimento informado por escrito foram aleatoriamente designados entre tratamento e placebo conforme dias pares e ímpares respectivamente. Estabelecemos 12 meses de tratamento para o ensaio clínico: um grupo recebendo dapagliflozina (dose 10 mg uma vez ao dia) e um placebo semelhante (uma vez ao dia). Os comprimidos de 10 mg de dapagliflozina foram obtidos sem patrocínio da indústria farmacêutica e

comprimidos de placebo de aparência semelhante foram fornecidos por uma farmácia de manipulação local. Mensalmente os pacientes compareciam aos locais de atendimento e recebiam a medicação e relatavam se houve algum efeito adverso.

Os sujeitos foram avaliados a cada quatro meses com a realização dos exames laboratoriais (transaminases hepáticas, GGT, glicemia, insulina, hemoglobina glicada, ferritina, perfil lipídico) e concentrações séricas de IGF-1. Durante a consulta médica foram realizados: avaliação clínica para determinação do peso corporal em balança antropométrica com peso até 200 kg e medida da altura (em centímetros) para cálculo do índice de massa corporal ($IMC = \text{peso}/\text{altura}^2$), circunferência abdominal em centímetros (medida com fita inelástica como o ponto médio entre a borda inferior da última costela e a borda superior da crista ilíaca) e pressão arterial. Após 12 meses foram novamente submetidos a um segundo exame de RM.

6.2.2. Procedimento de Imagem

Todos os participantes foram submetidos à ressonância magnética usando um scanner de corpo inteiro de 1,5 T (Philips Multiva). As imagens foram adquiridas por sequências multiplanares ponderadas em GE-T1, T2-TSE, SIT, In e Out-Phase em duas 2 medidas, uma em cada lobo e expressas como valor médio. Os parâmetros de imagem foram TR = 214 ms, TE 4,6 ms para *in phase* e 2,3 ms para *out phase*, intervalo de corte de 1 mm, tamanho da matriz 216 x 162 e um tempo total de varredura de 18 s (uma única apneia) (172). O grau de conteúdo lipídico hepático foi estimado pelo cálculo da fração de hepática de gordura (FHG) usando a seguinte fórmula: $FHG = [(SIT1IP - SIT1OP) / (2 \times SIT1IP)] \times 100$, em que SIT1IP é a razão da intensidade do sinal hepático para intensidade do sinal esplênico em imagens ponderadas em T1 *in phase* e SIT1OP é a razão entre a intensidade do sinal hepático e a intensidade do sinal esplênico em imagens ponderadas em T1 *out phase* (50).

6.2.3 Comprimento de Telômeros de Leucócitos

O DNA genômico de leucócitos periféricos foi extraído do sangue venoso total com o PureLink Genomic DNA Mini Kit (ThermoFisher Scientific), e as concentrações e a pureza do DNA foram avaliadas usando o Espectrofotômetro de Microvolume NanoDrop (Thermo Fisher Scientific). O comprimento relativo dos telômeros dos leucócitos foi medido pela reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR), de acordo com o método descrito por Cawthon et al. (2002), para medir a relação T/S relativa (154). As reações de qPCR foram realizadas para o telômero (T) e o gene de cópia única 36B4 (S) com composição idêntica, cada um contendo 10 µL de SYBR Green (Rox qPCR Master Mix, Thermo Fisher Scientific), 20 ng de DNA (4 µL), 100 nM (1 µL) de cada primer (frente e reverso) e 4 µL de água MilliQ, em placas de 96 poços. As sequências de primers foram aquelas descritas por O'Callaghan (221). As placas de qPCR continham as amostras dos participantes, uma amostra de referência e um controle negativo, e a reação foi realizada usando o sistema AB7500 PCR. As condições de ciclagem térmica incluíram uma etapa inicial de ativação de 10 min a 95°C, seguida por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 min. Após isso, a análise da curva de fusão foi realizada para verificar a especificidade dos produtos da qPCR. A amostra de referência e a amostra de controle negativo foram analisadas em triplicata e as amostras dos participantes foram analisadas em duplicata. As amostras em que os duplicados ou os triplicados apresentaram uma diferença de Ct de 0,5 ou mais foram repetidas.

6.2.4 Desfechos Primários e Secundários

Os desfechos primários foram redução maior ou igual a 30% na fração hepática de gordura conforme utilizado em ensaio clínico randomizado com dapagliflozina (216) e normalização de transaminases séricas (para pontos de corte AST e/ ou ALT < 35 U/L). Os desfechos secundários foram redução do peso, HOMA-IR, normalização de GGT, redução superior a 1% de hemoglobina glicada e melhora nos escores de fibrose. Avaliamos também o comprimento relativo dos telômeros antes e após o tratamento em metade da amostra.

6.2.5. Análise Estatística

As variáveis contínuas foram apresentadas como mediana e intervalos interquartis, pois apresentavam distribuição assimétrica, conforme indicado pelo teste de D'Agostino-Pearson. As variáveis categóricas (sexo, diabetes tipo 2, tratamento do diabetes, valores de HOMA-IR acima da referência, enzimas hepáticas séricas acima da referência e níveis séricos de ferritina acima da faixa de referência) foram apresentadas como frequências.

Realizamos uma tabela 2 x 2 para comparar os pacientes que tiveram redução igual ou superior a 30% da fração hepática de gordura e normalização da AST, ALT entre os grupos tratamento e placebo com $p < 0,0025$. Realizamos também, para comparar as variáveis categóricas e contínuas, o teste exato de Fisher e o teste de Mann-Whitney, respectivamente entre os grupos tratamento e placebo nos dados em baseline e após o tratamento. Para as demais variáveis durante o estudo foi utilizado um valor de $p \leq 0,05$ como estatisticamente significativo. Os dados foram apresentados como mediana e intervalos interquartis, pois não apresentavam distribuição normal, conforme indicado pelo teste de D'Agostino-Pearson. A correlação entre as variáveis categóricas no baseline e tratamento final com a FHG nos grupos placebos e tratamento foi realizada pelas correlações de Spearman. O comprimento dos telômeros antes e após o tratamento foi avaliada pelo teste de Mann-Whitney. A análise dos dados foi realizada utilizando GraphPad Prism versão 9.0.

Com relação ao comprimento de telômeros de leucócitos, agrupamos os sujeitos do estudo em dois grupos, de acordo com o comprimento T/S relativo abaixo e acima da mediana, e comparamos as variáveis categóricas e contínuas entre os dois grupos usando o teste exato de Fisher e o teste de Mann-Whitney, respectivamente. As variáveis que foram significativamente diferentes entre os sujeitos com comprimento T/S relativo abaixo e acima da mediana foram incluídas em um modelo de regressão logística multivariada em que a relação T/S relativa foi a variável dependente. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. A análise dos dados foi realizada utilizando GraphPad Prism versão 9.0 e Stata versão 16.0.

6.3 RESULTADOS

6.3.1 Resultados do Ensaio Clínico Piloto

47 pacientes foram selecionados, 23 preencheram os critérios de inclusão para o ensaio clínico, 5 pacientes foram perdidos no seguimento. Ao final acompanhamos por 12 meses, 18 pacientes, 12 pacientes no grupo tratamento e 6 pacientes no grupo placebo conforme mostra figura 1.

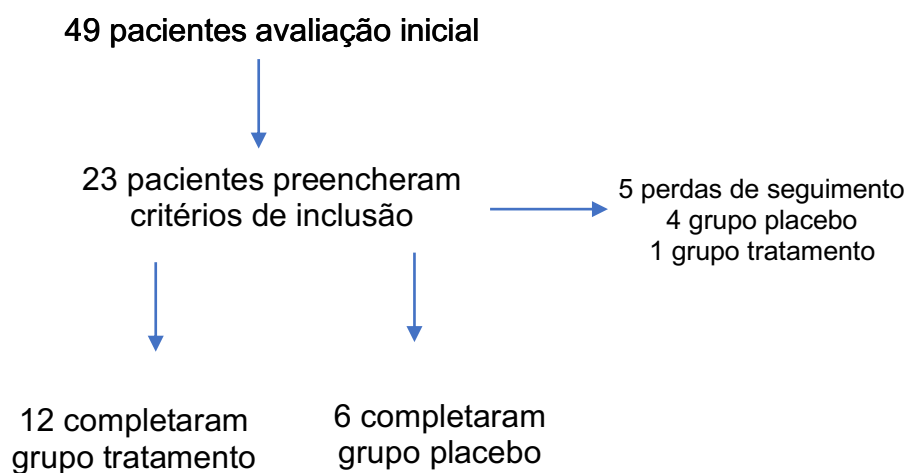


Figura 1. Desenho do estudo

A tabela 1 mostra as medianas dos pacientes na avaliação inicial comparando os grupos para determinar se havia diferença entre as variáveis estudadas. Apenas a AST estava mais elevada no grupo placebo comparada ao grupo tratamento.

Tabela 1 – Mediana dos pacientes na avaliação inicial e final

Medianas dos pacientes nas avaliações iniciais e finais						
Variáveis	Tratamento	Placebo	p ¹	Tratamento	Placebo	p
	Inicial (n=12)	Final (n=6)		Final (n=12)	Final (n=6)	
Idade						
(anos)	40	49,5	0,39	40	49,5	0,39
IMC						
(kg/m ²)	35,48	36,7	0,13	33,76	31,5	0,23
CA (cm)	111,5	101,5	0,25	105	98,5	0,05
GJ (mg/dl)	95,5	90,5	0,39	96,5	90	0,11
Insulina						
(mUi/L)	12,03	17	0,21	17,4	15,6	>0,99
HOMA-IR ²	2,96	3,73	0,23	3,95	3,88	0,72
HbA1c	5,5	6,15	0,15	5,65	5,85	0,28
AST (UI/L)	36	47,5	0,02	26	32	0,2
ALT (UI/L)	52,5	63	0,43	31	48	0,1
GGT (UI/L)	52	44	0,38	39	38,5	0,66
IGF-1						
(ng/dl)	138,5	146	0,89	143	145	0,75
Ferritina	338,35	225,95	0,3	228	208,5	0,61
CT						
(mg/dL)	182,5	184	0,86	177	198,5	0,47
HDL						
(mg/dL)	42,5	51,5	0,09	52,5	50,5	0,83
TGL						
(mg/dL)	156	143,8	0,39	146,5	125	0,82

FIB4	0,775	1,18	0,12	0,82	1,25	0,1
BARD	1	1	0,98	1	1	0,64
FHG	24,9	17,1	0,16	18,69	18,88	0,96

Valores apresentados como mediana (intervalo interquartil).

¹ valor de p pelo teste de Mann-Whitney para variáveis contínuas e teste exato de Fisher para variáveis categóricas.

² Avaliado apenas em participantes com tolerância normal à glicose.

ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; IMC: índice de massa corporal; GJ: glicose plasmática de jejum; IJ: insulina plasmática em jejum; FIB4: fibrose-4; HbA1c: hemoglobina glicada; HDL-C: colesterol de lipoproteína de alta densidade; FHG: fração de gordura hepática; HOMA-IR: Modelo Homeostático de Avaliação da Resistência à Insulina; LDL: lipoproteína de baixa densidade; CT: colesterol total; TG: triglicerídeo; ULNR: limite superior da faixa normal; CC: circunferência da cintura.

Não houve diferença entre o grupo tratamento e placebo quanto à redução igual ou superior a 30% da fração hepática de gordura e normalização da AST, ALT e demais desfechos secundários conforme mostra a tabela 2.

Tabela 2. Tabela 2x2 para comparação entre tratamento e placebo quanto aos desfechos metabólicos e redução da FHG

Desfechos	Placebo	Tratamento	p ¹
Redução do peso >5%			
Sim	2	2	0,56
Não	4	10	
Redução FHG >30%			
Sim	2	3	>0,99
Não	4	9	
Redução de HbA1c >1%			
Sim	0	2	0,52
Não	6	10	

AST < 35 U/L			
Sim	2	5	>0,99
Não	4	7	
ALT < 35 U/L			
Sim	3	5	>0,99
Não	3	7	
GGT < 50 U/L			
Sim	1	2	>0,99
Não	5	10	

¹ valor de p pelo teste de Mann-Whitney para variáveis contínuas e teste exato de Fisher para variáveis categóricas.

ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; FHG: fração de gordura hepática; HbA1c: hemoglobina glicada; GGT: gamaglutamiltransferase.

O grupo tratamento obteve redução da FHG de - 6,39% (inicial 24,9% vs final 18,69%) enquanto no grupo placebo houve ligeiro aumento + 1,78% (17,1% vs 18,88%) sem diferença estatística.

A correlação de Spearman para o grupo tratamento mostrou correlação moderada com circunferência abdominal, AST, ALT, GGT na avaliação final conforme mostra tabela 3.

Tabela 3. Correlações da FHG com parâmetros clínicos e metabólicos no grupo tratado nas avaliações inicial e final.

Correlações FHG com variáveis grupo tratado (n=12)				
	Inicial	p	Final	p
Idade (anos)	0,1368	0,66	0,01	0,97
IMC (kg/m ²)	-0,08	0,78	0,4729	0,12
CA (cm)	0,151	0,63	0,7856	0,0035
GJ (mg/dl)	0,1471	0,64	0,2386	0,45
Insulina (mUi/L)	0,2515	0,43	0,0119	0,99
HOMA-IR	0,3234	0,43	0,059	0,89
HbA1c	-0,127	0,69	0,2794	0,37
AST (UI/L)	-0,514	0,09	0,7188	0,01
ALT (UI/L)	-0,1121	0,72	0,7298	0,009
GGT (UI/L)	0,4518	0,14	0,659	0,022
IGF-1 (ng/dl)	0,1439	0,65	-0,42	0,168
Ferritina	-0,2522	0,42	0,4328	0,17
CT (mg/dL)	0,009	0,77	0,37	0,23
HDL (mg/dL)	-0,017	0,95	0,246	0,43
TGL (mg/dL)	0,1366	0,67	0,245	0,43
FIB4	-0,017	0,96	0,22	0,48
BARD	-0,064	0,85	0,3244	0,34

¹ Valores apresentados como r² Spearman.

ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; IMC: índice de massa corporal; GJ: glicose plasmática de jejum; IJ: insulina plasmática em jejum; FIB4: fibrose-4; HbA1c: hemoglobina glicada; HDL-C: colesterol de lipoproteína de alta densidade; HFF: fração de gordura hepática; HOMA-IR: Modelo Homeostático de Avaliação da Resistência à Insulina; LDL: lipoproteína de baixa densidade; CT: colesterol total; TG: triglicerídeo; CC: circunferência da cintura.

A correlação de Spearman para o grupo placebo não mostrou correlação estatisticamente significativa com quaisquer dos parâmetros clínicos ou metabólicos conforme mostra tabela 5.

Não houve correlação da FHG com concentrações séricas de IGF-1 em nenhum dos grupos conforme tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Correlações da FHG com parâmetros clínicos e metabólicos no grupo tratado nas avaliações inicial e final.

Correlações FHG com variáveis grupo placebo (n=6)				
Variáveis	Inicial	p	Final	p
Idade (anos)	-0,314	0,56	-0,085	0,91
IMC (kg/m ²)	-0,085	0,91	0,1429	0,8
CA (cm)	-0,085	0,91	0,1429	0,8
GJ (mg/dl)	-0,657	0,17	0,2571	0,65
Insulina (mUi/L)	0,5	0,45	0,1	0,95
HOMA-IR	0,2	0,78	0,1	0,95
HbA1c	0,724	0,12	0,667	0,15
AST (UI/L)	0,828	0,05	0,371	0,49
ALT (UI/L)	0,695	0,14	0,2029	0,72
GGT (UI/L)	0,142	0,892	-0,371	0,49
IGF-1 (ng/dl)	0,317	0,49	-0,371	0,65
Ferritina	-0,085	0,91	0,542	0,29
CT (mg/dL)	0,318	0,54	-0,376	0,46
HDL (mg/dL)	-0,142	0,8	-0,6	0,24
TGL (mg/dL)	0,2	0,71	0,08	0,91
FIB4	0,228	>0,99	0,657	0,17
BARD	-0,394	0,46	0,576	0,28

¹ Valores apresentados como r² Spearman.

ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; IMC: índice de massa corporal; GJ: glicose plasmática de jejum; IJ: insulina plasmática em jejum; FIB4: fibrose-4; HbA1c: hemoglobina glicada; HDL-C: colesterol de lipoproteína de alta densidade; HFF: fração de gordura hepática; HOMA-IR: Modelo Homeostático de Avaliação da Resistência à Insulina; LDL: lipoproteína de baixa densidade; CT: colesterol total; TG: triglicerídeo; CC: circunferência da cintura.

A figura 2 mostra o comprimento relativo dos telômeros (T/S) avaliado em 9 participantes do estudo (7 grupo tratamento e 2 grupo controle) e não houve diferença estatística no comprimento em 12 meses de seguimento.

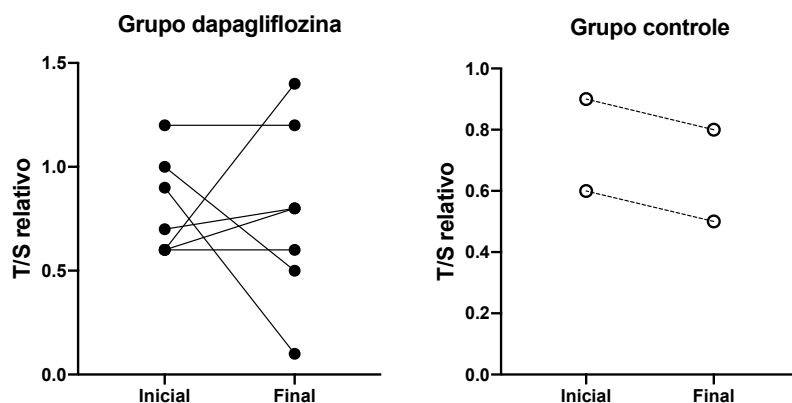


Figura 2. Comprimento de telômeros inicial e final nos grupos tratamento e controle.

6.3.2 Resultados do Estudo para Avaliação do Comprimento de Telômeros de Leucócitos

Foram incluídos 32 indivíduos com DHGNA, cujas características estão apresentadas na Tabela 6. A mediana de idade foi de 40 (34,5-56,7) anos, sendo a maioria homens (20; 62,5%). Oito (25%) participantes apresentavam o diagnóstico de DM2 e estavam em tratamento com metformina, em monoterapia ou em combinação com um segundo agente anti-hiperglicêmico. Nove participantes (28,1%) apresentavam hipertensão arterial sistêmica e 2 (6,6%) apresentavam hipotireoidismo. A maioria (25; 71,4%) era sedentária. Três indivíduos estavam em sobrepeso (1 homem e 2 mulheres) e 29 com obesidade (19 homens e 10 mulheres). A resistência à insulina, definida por HOMA-IR > 2,8, foi observada em 14 indivíduos, compreendendo 58,3% dos participantes com tolerância normal à glicose. Um total de 51,3% e 81,2% dos indivíduos incluídos apresentaram níveis séricos de AST e ALT acima do limite superior do intervalo normal, respectivamente, embora os valores médios tenham sido apenas ligeiramente elevados (abaixo de três vezes o limite superior do intervalo normal). Os valores do índice FIB4 e do escore BARD foram consistentes com um baixo risco de fibrose hepática. A mediana para o comprimento de telômero (T/S) relativo foi de 0,64.

Tabela 5 – Características dos participantes avaliados por comprimento de telômeros.

Variáveis	Todos (n=32)
Idade (anos)	40 (34,5-56,7)
Status sobre Tabagismo	
Nunca	26 (81,2%)
Ex-tabagista	4 (12,5%)
Fumante	2 (6,25%)
Exercícios	
Nenhum	26 (81,25%)
< 150 min/sem	4 (12,5%)
> 150 min/sem	2 (6,25%)
Circunferência cintura (cm)	109 (100-118)
IMC (Kg/m ²)	33,75 (31,24-37,9)
Hipotireoidismo	2 (6,2%)
HAS	9 (28,1%)
DM2	8 (25%)
GJ (mg/dL)	98 (83-107)
IJ (mUI/L)	12,29 (8,8-17,6)
HOMA-IR	3,29 (1,98-4,97)
HbA1c (%)	5,6 (5,3-6,1)
AST (U/L)	37 (28,2-42,7)
ALT (U/L)	47,5 (43-71)

GGT (U/L)	55,5 (31-84,7)
Ferritina (ng/dL)	388,5 (221,3-579,3)
FHG por RM (%)	19 (15,4-27,1)
FIB 4	0,96 (0,61-1,19)
BARD	1 (1-2)
T/S relativo	0,64 (0,50-0,93)
TC (mg/dL)	189 (166,3-210,3)
HDL – c (mg/dL)	42 (37-53)
TGL (mg/dL)	154 (113,3-189)
LDL (mg/dL)	110 (85-126)

Valores apresentados como mediana (intervalo interquartil).

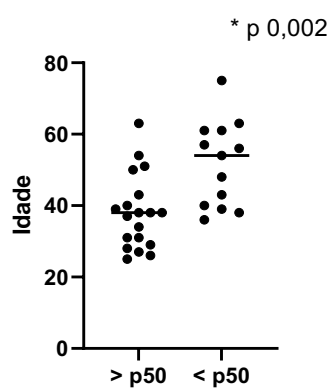
ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; IMC: índice de massa corporal; GJ: glicose plasmática de jejum; IJ: insulina plasmática em jejum; FIB4: fibrose-4; HbA1c: hemoglobina glicada; HDL-C: colesterol de lipoproteína de alta densidade; FHG: fração de gordura hepática; HOMA-IR: Modelo Homeostático de Avaliação da Resistência à Insulina; LDL: lipoproteína de baixa densidade; CT: colesterol total; TG: triglicerídeo; ULNR: limite superior da faixa normal; CC: circunferência da cintura.

Avaliamos também em subgrupo por sexo (homens e mulheres) se havia diferença entre as variáveis e o comprimento de telômeros e não houve diferença estatística (dados não mostrados).

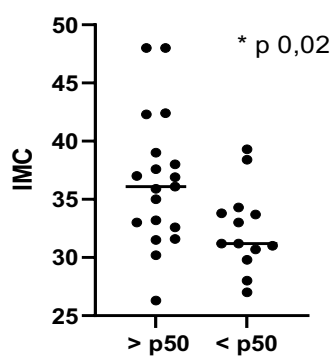
Examinamos a associação entre variáveis clínicas e bioquímicas e comprimento telômero (T/S) relativo comparando indivíduos com comprimento abaixo e acima da mediana (0,64). Indivíduos com comprimento telômero (T/S) relativo abaixo

da mediana tinham idade significativamente maior (Figura 2A), IMC mais baixo (Figura 2B), concentrações séricas de AST mais altas (Figura 2C) concentrações séricas de GGT mais altas (Figura 2D), concentrações séricas de ferritina sérica mais baixas (Figura 2E) e maior pontuação do escore de FIB4 (Figura 2F), quando comparados com aqueles que apresentaram comprimento telômero (T/S) relativo acima da mediana. Não houve diferença em relação à circunferência da cintura, GJ, IJ, HbA1c, concentrações séricas de ALT, escore BARD e lipídios séricos ao comparar indivíduos com comprimento telômero (T/S) relativo abaixo da mediana com aqueles acima da mediana (dados não mostrados).

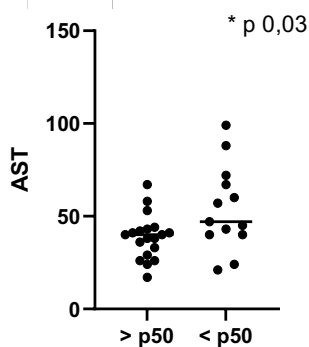
2 A



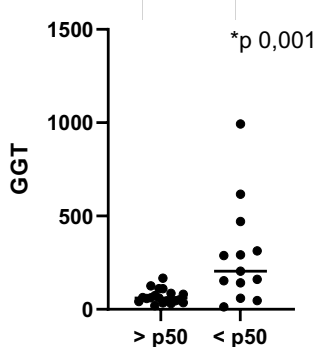
2 B



2 C



2 D



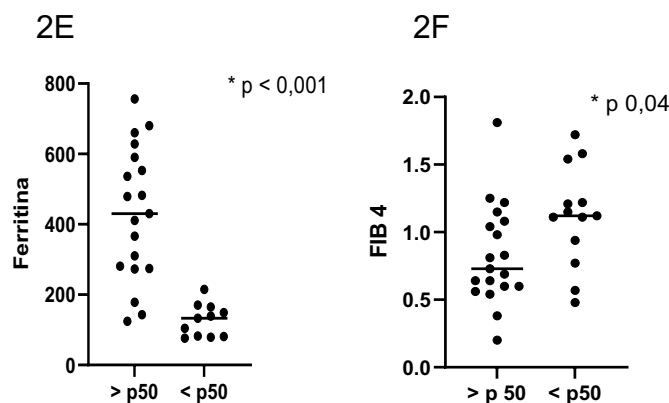


Figura 2. Associação entre variáveis clínicas e bioquímicas e relação T/S relativa comparando indivíduos com razão T/S relativa abaixo e acima da mediana. Idade > p 50: 38 anos (29-43); < p 50: 54 (39,5-61). IMC > p 50: 36,1 kg/m² (32,6-39); < p 50 31,2 (30,2-32). AST > p 50: 40 U/L (29-43); < p 50 47 (40-69,5). GGT > p 50: 60 U/L (42-86); < p 50 204 (100,4-392). Ferritina > p 50: 430 ng/dL (274-590); < p 50 133 (125-165). FIB4 > p 50: 0,73 (0,6-1,08); < p50 1,20 (0,85-1,38).

Um modelo de regressão logística multivariável considerando comprimento de telômero (T/S) relativo abaixo ou acima da mediana como variável dependente e idade, IMC, concentrações séricas de AST, GGT e ferritina e pontuação FIB4 como variáveis independentes indicaram que apenas a idade estava significativamente associada ao comprimento de telômero (T/S) relativo (Tabela 7).

Tabela 6 – Modelo Regressão Logística entre as variáveis clínica e bioquímica e T/S relativa abaixo e acima da mediana entre pacientes com DHGNA

Variáveis	Odds Ratio (IC 95%)	p
Idade	0.84 (0.71-0.99)	0.04
IMC	1.16 (0.91-1.47)	0.22
AST	1.01 (0.92-1.10)	0.90
GGT	1.00 (0.99-1.01)	0.78
Ferritina	1.00 (0.99-1.00)	0.48
FIB4	23.8 (0.15-29.70)	0.21

O modelo foi ajustado para todas as covariáveis listadas na tabela.

ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; IMC: índice de massa corporal; GGT: gama-glutamilttransferase; FIB4: fibrose-4;

6.4 DISCUSSÃO

6.4.1 Discussão para o Ensaio Clínico Piloto

A resposta ao tratamento medicamentoso para DHGNA/EHNA medida por conteúdo hepático de gordura por RM é um tema de grande debate (56), pois os dados dos estudos ainda são conflitantes se há correspondência entre a redução do conteúdo hepático de gordura com a melhora histológica (57,58). Acreditamos que não encontramos resultados de melhora radiológica e de transaminases devido ao pequeno tamanho amostra.

Dessa forma, a RM tem sido uma ferramenta importante para avaliar resposta ao tratamento medicamentoso. Nossos dados mostraram que não houve redução da FHG, transaminases, peso corporal e marcadores de resistência insulínica tanto em portadores de diabetes e tolerância à glicose normal. Esses achados podem ter sido encontrados devido ao pequeno tamanho amostral uma vez que diversos outros estudos mostraram efeitos em diversos parâmetros conforme discutiremos a seguir.

Outros efeitos além da glicosúria, como a melhora da inflamação no tecido gorduroso foi vista no estudo em que a canagliflozina foi comparada a glimepirida em pacientes com DM2 em tratamento por 52 semanas quanto à redução de adipocinas e biomarcadores inflamatórios. Foram 99 pacientes no grupo glimepirida e 100 pacientes no grupo canagliflozina. Houve redução significativa de todos os marcadores apenas no grupo canagliflozina: redução de leptina, adiponectina, IL-6, TNF-alfa e PCR de alta sensibilidade (222).

Ensaio clínico randomizado realizado por Kuchay e cols avaliou 50 pacientes com diabetes tipo 2 e DHGNA para tratamento com empagliflozina 10 mg/dia ou grupo controle (tratamento padrão sem empagliflozina) por 20 semanas. As mudanças na concentração de gordura hepática foram determinadas por RM. Desfechos secundários foram alterações em ALT, AST e GGT. O grupo empagliflozina obteve redução significativa da gordura hepática (diferença média entre RM e empagliflozina nos grupos controle de 4%; $p < 0,0001$). Comparado com a linha de base, redução significativa foi encontrada no final do tratamento RM para o grupo empagliflozina (16,2% para 11,3%; $p < 0,0001$) e uma mudança não significativa foi encontrada no grupo controle

(16,4% para 15,5%; p 0,057). Os dois grupos mostraram uma diferença significativa para a mudança em ALT (p 0,005) e diferenças não significativas para as concentrações séricas de AST e GGT (223).

Ensaio clínico randomizado, controlado com placebo conduzido por Cusi e cols avaliou os efeitos da canagliflozina por 24 semanas em 56 pacientes com DM2 em controle insatisfatório (HbA1c 7,5-9,5%). Houve maior redução da FHG medida por RM no grupo canagliflozina comparado ao placebo (38% x 20% de redução p 0,09). As concentrações séricas de ALT estavam normais na maioria dos pacientes no baseline, mas apresentou tendência de redução -3 vs -1 U/L (p 0,27). Houve redução significativa da glicemia em jejum (-26 vs 1 mg/dl p 0,002), HbA1c (-0,7% vs -0,1 p 0,001) e da insulinemia em jejum (-4 x -0,1 mU/L p 0,001). Com relação ao peso corporal, mais pacientes no grupo canagliflozina reduziram pelo menos 5 kg, com moderada correlação com a fração hepática de gordura (r-0,58 p < 0,001). Mais pacientes no grupo canagliflozina reduziram mais de 5% do peso corporal e tiveram queda maior que 30% da FHG (38% vs 7% p 0,009) (224).

Estudo de 24 semanas, internacional, multicêntrico, randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, por 78 semanas em 40 locais em cinco países avaliou 182 pacientes com DM2. A média de idade foram mulheres 63,3 e homens 58,6 anos; HbA1c 7,17%, IMC 31,9 kg/m² e peso corporal 91,5 kg inadequadamente controlados com metformina. Foi introduzido dapagliflozina 10 mg/d ou placebo adicionados à metformina por 24 semanas.

Neste estudo, na semana 24, os resultados comparados ao placebo com dapagliflozina foram os seguintes: redução do peso corporal -2,08 kg (IC - 2,84 a -1,31; p <0,0001), circunferência da cintura -1,52 cm (IC95% -2,74 a -0,31; p = 0,0143); massa gorda -1,48 kg (IC95% -2,22 a -0,74; p = 0,0001); proporção de pacientes que alcançaram redução de peso de pelo menos 5%, + 26,2% (IC 95% 15,5 a 36,7; p <0,0001); tecido adiposo visceral -258,4 cm³ (IC 95% -448,1 a -68,6; p nominal 0,0084); tecido adiposo subcutâneo -184,9 cm³ (IC 95% -359,7 a -10,1; p nominal 0,0385) (214).

A dapagliflozina foi estudada em 6 diferentes estudos para DHGNA em sujeitos com diabetes mellitus. Tais estudos não são passíveis de comparação direta, uma vez que têm métodos diferentes conforme descreveremos a seguir.

Análise retrospectiva realizada por Choi e cols avaliou pacientes com DM2 e DHGNA no Hospital Bucheon da Universidade Soonchunhyang entre 2015 a 2017. A esteatose hepática foi determinada por US. Foram selecionados pacientes em terapia anti-hiperglicêmica dupla (metformina + ISGLT2 ou metformina + IDPP4) nos 3 meses de diagnóstico da DHGNA. Os IDPP4 utilizados foram sitagliptina ou linagliptina. Foram avaliados 50 pacientes no grupo Dapagliflozina e 52 pacientes no grupo IDPP4. Embora no grupo da dapagliflozina os pacientes fossem mais jovens, com maior peso e maior HbA1c, glicemia em jejum e HOMA-IR, os valores iniciais de transaminases não diferiram (225).

Houve maior perda de peso no grupo dapagliflozina do que no grupo IDPP4 ($-2,9 \pm 5,4$ kg vs $-0,4 \pm 2,7$ kg p 0,005), maior redução glicemia em jejum no grupo dapagliflozina do que no grupo IDPP4 ($-26,5$ mg/dL vs $3,35$ mg/dL, p 0,002, respectivamente), porém sem diferença na HbA1c e perfil lipídico. AST e ALT diminuíram significativamente em ambos os grupos, mas com maior redução no grupo dapagliflozina do que no grupo IDPP4 ($-11,4 \pm 16,6$ U/L vs. $-6,0 \pm 13,8$ U/L, p 0,077; $-21,1 \pm 20,1$ U/L vs $-9,5 \pm 22,8$ U/L, p 0,008). Em particular, a diferença na redução da ALT entre os dois grupos foi estatisticamente significativa (-21.1 U/L vs -9.5 U/L p 0,008). A proporção de pacientes com normalização da ALT após o tratamento também foi significativamente maior no grupo dapagliflozina do que no grupo IDPP4 (80% vs 61,5%, p 0,041). Na análise multivariada, após ajuste para idade, sexo, peso corporal, alteração de peso corporal, HbA1c e colesterol total, o OR para a associação metformina com dapagliflozina para normalização da ALT nos pacientes com DM2 com DHGNA foi de 3,489 (p 0,04) (225).

Shimizu e cols realizaram estudo prospectivo de 63 pacientes com DM2 e DHGNA no ambulatório de diabetes do Dokkyo Medical University Hospital, aberto e cego, alocados aleatoriamente em uma proporção de 1:1 para receber dapagliflozina ou o tratamento padrão sem inibidores de SGLT2. O grupo tratamento recebeu dapagliflozina 5 mg por 24 semanas. O diagnóstico de DHGNA foi realizado através de Elastografia transitória. A análise de gordura visceral e subcutânea foi realizada pela análise dupla de bioimpedância elétrica (226).

Foram seguidos 33 pacientes do grupo de dapagliflozina e 24 pacientes do grupo de tratamento padrão. No grupo dapagliflozina, houve redução da gordura visceral e tecido subcutâneo assim como peso corporal (73,6 kg para 70,7 p 0,004 no grupo dapagliflozina; 76,6 kg para 75,8 kg p 0,491 no grupo controle; p 0,0075 para diferença entre os grupos). Houve redução significativa da HbA1c e do HOMA-IR após 24 semanas no grupo dapagliflozina, mas não no grupo de tratamento padrão. Após 24 semanas, diminuição significativa na AST, ALT e GGT no grupo dapagliflozina, enquanto não houve alterações nas enzimas hepáticas no grupo de tratamento padrão, porém muito discreta para AST (28 U/L para 27,5 p 0,0018; p entre os grupos 0,08) e maior para ALT (38 U/L para 26,5 p < 0,0001; p entre os grupos 0,02) e GGT (47 para 27 U/L p 0,0003; p entre os grupos 0,004) (226).

O EFFECT-II (*Effects of dapagliflozin and n-3 carboxylic acids on non-alcoholic fatty liver disease in people with type 2 diabetes*) um ensaio clínico multicêntrico, duplo-cego, randomizado, controlado por placebo, com duração de 12 semanas, foi realizado em cinco centros de pesquisa clínica em hospitais universitários na Suécia. Este estudo incluiu pacientes com diabetes tipo 2, com idade entre 40 e 75 anos, em tratamento com dose estável de metformina ou sulfonilureia isoladamente, ou em combinação por pelo menos 3 meses, com conteúdo hepático de gordura medido por RM acima de 5,5%. Quatro grupos foram divididos: dapagliflozina 10 mg, ômega 3 (OM-3CA 4 g), uma combinação de dapagliflozina 10 mg e OM-3CA 4 g, ou placebos correspondentes. Em cada grupo, receberam placebo (n = 21), monoterapia com OM-3CA (n = 20), monoterapia com dapagliflozina (n = 21) e terapia combinada com OM-3CA e dapagliflozina (n = 22). No total, 75 participantes (89%) completaram o estudo (227).

A dapagliflozina (-13%), OM-3CA (-15%) e combinação (-21%) reduziram significativamente a fração hepática de gordura em 12 semanas. Apenas o tratamento combinado (-21%, p 0,04), mas não o isolado, reduziu significativamente a fração hepática de gordura e o volume total de gordura hepática (-3%). Dapagliflozina em monoterapia reduziu os níveis de todos os biomarcadores medidos de lesão de hepatócitos, incluindo AST, ALT e GGT e citoqueratina 18. Os participantes que usaram dapagliflozina isoladamente e em

combinação com OM-3CA mostraram redução do peso corporal e da circunferência da cintura, enquanto aqueles que usaram OM-3CA isoladamente não apresentaram alteração em comparação ao grupo placebo. Nenhum evento adverso grave foi reportado. O tratamento com dapagliflozina melhorou significativamente o HOMA-IR comparado ao tratamento com OM-3CA. As alterações em glicose e insulina plasmáticas no grupo dapagliflozina em monoterapia se correlacionaram com as alterações encontradas na RM ($\rho = 0,55$, $p 0,02$ e $\rho = 0,62$, $p 0,005$, respectivamente). Não houve efeito significativo da OM-3CA em monoterapia ou da terapia combinada em nenhum dos biomarcadores da lesão hepática. Alterações na RM correlacionaram-se significativamente com as alterações em GGT ($\rho = 0,53$, $p 0,02$), mas não com os outros biomarcadores de lesão de hepatócitos no grupo dapagliflozina (227).

Tobita e cols realizaram um estudo piloto, aberto, não controlado. Foram seguidos 11 pacientes, com biópsia hepática percutânea para o diagnóstico e exclusão de outras causas. Todos os pacientes receberam prescrição de dapagliflozina uma vez ao dia na dose de 5 mg/ dia durante 24 semanas. A composição corporal foi feita por análise de bioimpedância (228).

As concentrações séricas de AST, ALT e GGT diminuíram progressivamente durante o estudo a partir dos valores basais de 52 U/L (43–55 U/L), 59 U/L (48–69 U/L) e 64 U/L (47-94 U/L), respectivamente, para valores de 26 U/L (24–38 U/L), 30 (20–37 U/ L) e 33 U / L (24-67 U/L), respectivamente, na semana 24 (todos $p < 0,01$ vs linha de base). Essas mudanças ocorreram juntamente com reduções significativas nas concentrações séricas de ferritina e insulina. Ambos os grupos de dapagliflozina aumentam numericamente as concentrações de beta-hidroxibutirato, porém não significativamente em relação ao placebo (228).

Arase e cols analisaram retrospectivamente pacientes com DHGNA e DM2, que receberam monoterapia com ISGLT2 por mais de 24 semanas, no Departamento de Gastroenterologia e Hepatologia do Hospital Oiso da Universidade de Tokai (Kanagawa, Japão) entre novembro de 2016 e julho de 2017. Os pacientes foram seguidos por 24 semanas e a FHG foi determinada por RMS. A mediana da idade dos pacientes foi de 60 anos (50-83 anos) e dez pacientes (58,8%) eram do sexo feminino. Dez pacientes receberam

dapagliflozina na dose de 5 mg/dia e sete pacientes receberam canagliflozina na dose de 100 mg/ dia por 24 semanas. A RM revelou uma redução significativa na fração hepática de gordura, mediana inicial 19,1% (6,9 -50,7%) para 9,2% mediana final (1,3 a 5,3%) na semana 24 ($p < 0,001$). Houve também redução significativa do peso corporal, 72,9 kg (48,8-101,2) vs 67,7 kg (44,7-98,7), $p < 0,001$ e IMC de 28,2 kg/m² (mediana 25,1 a 36,8) vs. 27,2 kg/m² (mediana 21,7 a 35,0), $p < 0,001$ (229).

Houve melhora significativa na HbA1c (6,5 vs 5,9%, $p 0,003$), glicemia em jejum (132 vs. 112 mg/dL, $p < 0,001$), insulina em jejum (18,5 vs. 11,8 μ U/mL, $p < 0,001$) e HOMA-IR (6,3-3,2, $p < 0,001$). As concentrações séricas de AST (30 vs. 21 UI /L), ALT (48 vs. 27 UI/L) e GGT (42 vs. 28 UI/L) também diminuíram significativamente. A análise das variáveis relacionadas à fibrose hepática revelou que o tratamento com ISGLT2 diminuiu significativamente o APRI (0,43 vs 0,35, $p = 0,031$), mas não o índice FIB-4. A creatinina sérica aumentou levemente, mas não houve mudanças significativas na ureia sérica e na taxa de filtração glomerular. Com relação aos eventos adversos leves observados durante 24 semanas de tratamento com ISGLT2 incluíram prurido da área genital em dois pacientes (11,8%) e infecção do trato urinário em um paciente (5,9%). Não houve eventos adversos graves (229).

Lee avaliou retrospectivamente, indivíduos com DM2 que foram acompanhados na Clínica de Diabetes do Hospital Queen Mary, em Hong Kong, dapagliflozina ou empagliflozina por 26 semanas, entre 2016 e fevereiro de 2017. Dos 115 participantes chineses com DM2 incluídos neste estudo, 69 e 46 foram tratados com dapagliflozina e empagliflozina, respectivamente. A idade média dos participantes foi de 56,3 anos, com duração média do diabetes de 16 anos. Após 6 meses de tratamento com ISGLT2, os parâmetros metabólicos, incluindo peso corporal, pressão arterial sistólica, glicemia de jejum e HbA1c, melhoraram significativamente. A perda de peso foi de 1,6 kg (IC 95 % -2,2 a - 1,1; $p < 0,001$), redução da PAS de 5,3 mmHg (IC95% - 9,1 a - 1,5; $p = 0,006$), glicemia em jejum de 1,9 mmol/L (IC95% - 2,5 a - 1,4; $p < 0,001$) e HbA1c de 1% (IC 95% - 1,2 a - 0,8; $p < 0,001$), bem como aumento significativo de HDL e diminuição da TFG, após 26 semanas (HDL: alteração média 0,04 mmol/L, IC 95% 0,003-0,08, $p 0,033$; TFG: alteração média -1,6ml/min/1,73m², IC 95% -2,9 a -0,3, $p 0,016$).

Houve melhora significativa também entre os pacientes em uso de insulina com redução de cerca 2,3 u/dia (230).

Houve também redução significativa nas concentrações séricas de ALT de 40,3 (\pm 28,0) para 29,0 (\pm 14,1 U/L) $p < 0,001$, os resultados mantendo consistentes entre vários subgrupos, com ou sem terapia com insulina de base. As concentrações séricas de AST também diminuíram significativamente de 28,2 (\pm 13,2) para 23,1 (\pm 7,5 U/L) $p < 0,001$. As concentrações séricas de ALT foram mais elevadas no início do estudo e reduziram significativamente maior em ALT após 6 meses de tratamento com ISGLT2. As melhoras em ALT após 6 meses não diferiram estatisticamente entre os participantes tratados com dapagliflozina versus empagliflozina (p 0,815), assim como entre os participantes com e sem insulinoaterapia de base (p 0,429). Em análises separadas, a redução nas concentrações séricas de ALT foi independentemente associada com as mudanças tanto na HbA1c quanto na glicemia em jejum (p 0,043 para mudança na HbA1c; p 0,014 para mudança na glicemia de jejum), mas não com as mudanças em outras variáveis clínicas, incluindo peso corporal (230).

No que se refere à avaliação das concentrações séricas de IGF-1, embora não tenhamos encontrado correlação como biomarcador, acreditamos na importância de sua avaliação em futuros estudos para DHGNA/EHNA, especialmente com relação à fibrose hepática. Uma recente revisão ressalta que concentrações séricas mais baixas de IGF-1 estão associadas a DHGNA tanto radiográfica quanto histológica em comparação com controles sem DHGNA. Estudos com avaliação histológica encontraram principalmente associações entre IGF1 mais baixo e inflamação lobular, balonização de hepatócitos, EHNA e fibrose, com menos evidências de que IGF-1 está fortemente correlacionado com a própria esteatose (231). Dessa forma, como nossos resultados mostram uma população de baixo risco para fibrose e por isso não tenhamos obtido correlação.

6.4.2 Discussão para a Avaliação de Comprimento de Telômeros de Leucócitos em DHGNA

No que se refere ao comprimento de telômeros, neste estudo transversal, investigamos se as características clínicas e bioquímicas da resistência à insulina, síndrome metabólica e DHGNA avaliada por ressonância magnética entre indivíduos com e sobrepeso/obesidade estavam associadas ao menor comprimento dos telômeros. Foram incluídos 8 indivíduos com DM2 (6 mulheres).

Quando dividimos os grupos pelo comprimento mediano dos telômeros, verificamos que os indivíduos acima da mediana apresentaram menor mediana de idade, menores concentrações séricas de AST, GGT, mas maiores valores de IMC e concentrações séricas de ferritina. A análise de subgrupos por sexo não indicou diferenças entre as variáveis.

Quando avaliados a partir de células na corrente sanguínea, os telômeros podem mostrar variação de seus comprimentos geneticamente predispostos devido a alterações induzidas pelo ambiente (232). Essas alterações no comprimento dos telômeros atuam como um indicador da saúde celular, que, por sua vez, pode fornecer status de risco para doenças. No geral, a avaliação de comprimento de telômeros é um marcador dinâmico de saúde biológica e bem-estar que, juntamente com comprimentos de telômeros geneticamente definidos, podem fornecer informações sobre o status saúde do indivíduo (233).

Uma vez que o comprimento dos telômeros é percebido como um marcador potencial do metabolismo celular, situações clínicas, estresse ou resistência tornou-se um bom candidato para um marcador preditivo e/ou diagnóstico. As variações nos comprimentos do TRF entre os recém-nascidos são tão amplas quanto as variações nos comprimentos do TRF entre os adultos. Além disso, um desgaste mais rápido dos telômeros aparece nos homens do que nas mulheres. No entanto, não há consistência na avaliação da associação entre sexo e comprimento dos telômeros em adultos, e essa hipótese tem evoluído dinamicamente. Alguns estudos mostram que os telômeros dos leucócitos são mais longos nas mulheres do que nos homens. Pode resultar da presença de um elemento de resposta ao estrogênio na região do promotor hTERT, o que

pode afetar a expressão desse gene e contribuir para a restauração dos telômeros (234).

Nossos resultados reiteram que a idade é um fator determinante para o encurtamento dos telômeros leucocitários, pois é um marcador de senescência celular, demonstrado por uma correlação negativa moderada tanto com a amostra total quanto por sexo.

O comprimento dos telômeros é máximo ao nascimento e diminui progressivamente com o avançar da idade. Este envelhecimento associado a doenças como diabetes, hipertensão, doença de Alzheimer, câncer e suas complicações associadas resultam em um efeito combinado de estresse oxidativo, inflamação e replicação celular repetida sobre ele, formando assim uma associação entre o comprimento dos telômeros e o envelhecimento cronológico e doenças relacionadas (232).

Um estudo longitudinal com seguimento de nascidos em Helsinque em 1934-44 avaliou o comprimento relativo dos telômeros leucocitários pelo método de PCR em tempo real. Foram avaliados 1.082 indivíduos e observou-se encurtamento em 93,7%. Nos homens, o encurtamento foi mais rápido 39,5% versus 35,5% ($p < 0,01$). Apenas nos homens houve correlação do encurtamento dos telômeros com peso, circunferência da cintura, IMC e percentual de gordura corporal. Em média, as mulheres tinham telômeros 11% mais longos que os homens ($p < 0,001$). A idade, a pressão arterial e a glicemia não estiveram associadas às alterações do comprimento de telômeros ao longo das avaliações de 10 anos, bem como ao surgimento de doenças crônicas (235).

Estudo conduzido a partir de dados da Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição (NHANES), envolvendo dados de 3564 homens e 3806 mulheres encontrou que, para o sexo feminino, triglicerídeos elevados foi altamente associado significativamente a uma redução no comprimento de telômeros de leucócitos nos modelos totalmente ajustados ($p < 0,001$). Nos grupos masculino e feminino, a circunferência da cintura associou-se significativamente com a diminuição do comprimento de telômeros médio ($p < 0,05$) (236).

Por outro lado, se existem diferenças de gênero na associação de variáveis antropométricas e metabólicas com o conteúdo de gordura hepática entre

indivíduos com DHGNA estabelecida e comprimento dos telômeros, permanece amplamente inexplorado.

Outro estudo com os dados da Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição (NHANES) de 1999-2000 (3567 indivíduos) e 2001-2002 (4260 indivíduos) em indivíduos com idade superior a 20 anos avaliou a relação entre o comprimento dos telômeros de leucócitos e DHGNA presumida por concentrações séricas elevadas de ALT, obesidade ou obesidade abdominal. Modelos de regressão logística foram utilizados para avaliar a relação entre o comprimento dos telômeros e os marcadores presumidos da DHGNA com ajuste para possíveis fatores de confusão. Não houve relação entre concentrações séricas elevadas ALT, obesidade abdominal ou obesidade e o comprimento dos telômeros em modelos ajustados no NHANES (OR 1,13, IC 95% 0,48–2,65; OR 1,17, IC 95% 0,52–2,62, respectivamente). Os homens mexicano-americanos tinham menor comprimento dos telômeros com DHGNA (OR 0,07, IC95% 0,006–0,79) usando diferentes indicadores de DHGNA (OR 0,012, IC95% 0,0006–0,24). Quando as concentrações séricas elevadas de ALT foram combinadas com obesidade abdominal ou obesidade, o encurtamento dos comprimentos dos telômeros estava associado à DHGNA presumida apenas em homens mexicanos (OR 0,15, IC 95% 0,03 a 0,64 para obesidade abdominal; OR 0,012, IC95% 0,0006 – 0,24 para obesidade). A origem mexicana com DHGNA teve menor comprimento dos telômeros do que os homens em outros grupos populacionais (237).

Estudo de Iglesias Molli e cols realizado na Argentina, avaliando o comprimento de telômeros absoluto por PCR em tempo real em 400 mulheres (idade média de $46,76 \pm 15,47$ anos) agrupou em três grupos: mulheres não obesas metabolicamente saudáveis (MNO), mulheres obesas sem SM (MOSS) e mulheres obesas com SM (MSO). As MNO apresentaram comprimento de telômeros significativamente maior que o MSO ($p = 0,033$; $r = -4,63$; IC95% $r = -8,89 / -0,37$), mas não diferiu do MOSS. Também foi observada uma diminuição no comprimento de telômeros com o aumento progressivo do número de componentes da SM ($p < 0,001$; $r = -2,06$; IC95% $r = -3,13 / -0,99$). Assim, esses resultados sugerem que a obesidade isolada não parece ter influência direta no comprimento de telômeros de leucócitos (238).

Nossos resultados indicaram que indivíduos com comprimento dos telômeros acima da mediana apresentaram um IMC maior. A interação genética com o equilíbrio metabólico e a homeostase da adiposidade é importante para doenças crônicas e regulação do comprimento dos telômeros. A obesidade apresenta efeitos adversos à saúde e diminuição da expectativa de vida, uma vez que o excesso de tecido adiposo promove aumento do estresse oxidativo e inflamação. Portanto, existe uma plausibilidade para associação entre telômeros mais curtos e aumento do IMC, aumento da adiposidade e acúmulo de gordura visceral (239). Uma revisão sistemática e meta-análise com o objetivo de avaliar a associação entre obesidade pediátrica e comprimento dos telômeros incluiu 11 estudos. A meta-análise mostrou que crianças com sobrepeso ou obesidade tinham comprimento de telômero mais curto do que crianças com peso normal (SMD: -0,85; IC 95%: -1,42 a -0,28; $p < 0,01$) (240).

Outra revisão sistemática incluiu 63 estudos com um total de 119.439 sujeitos. O método mais utilizado para avaliação da LT foi o PCR, 47 estudos (74%). Entre os 63 estudos selecionados, 24 (38%) não encontraram variáveis estatisticamente significativas que mostrassem associação entre obesidade e CT. Os 39 estudos restantes detectaram uma associação estatisticamente significativa entre obesidade e LT. Os outros 24 estudos encontraram uma relação inversa. Nove artigos relataram dados para crianças ou adolescentes. Seis estudos relataram associações inversas; dois não apresentaram os dados específicos das crianças, mas uma associação inversa em toda a amostra. Em um estudo, a associação foi significativa apenas entre os meninos. Três estudos não encontraram associação estatisticamente significativa entre obesidade e comprimento de telômeros em crianças (241). Portanto a relação entre a obesidade e redução de comprimento de telômeros precisa ser mais bem explorada.

Se a cirrose hepática está relacionada à senescência celular ainda é um ponto de debate. Em nosso estudo, embora não tenhamos realizado biópsia hepática para avaliar fibrose, usamos os validados escores BARD e FIB4 que revelaram que nossa amostra apresentava baixo risco de fibrose. Encontramos menores concentrações de AST e GGT em pacientes com maior comprimento dos telômeros. Alguns estudos compararam o comprimento dos telômeros com

a biópsia hepática, como o de Shin, que avaliou 23 indivíduos sem DHGNA, 15 com DHGNA e 45 com EHNA e mostraram que o comprimento dos telômeros medido a partir de tecidos hepáticos mostraram forte correlação negativa ($p < 0,001$) com a idade, independentemente do status da DHGNA. Portanto, o comprimento dos telômeros ajustado à idade diminuiu gradualmente com o aumento da gravidade da fibrose em pacientes com DHGNA ($p < 0,028$). Na análise multivariada, o comprimento dos telômeros ajustado para a idade (odds ratio 0,59; IC 95% 0,37-0,92; $p < 0,01$) e HDL-c (OR 0,94; IC 95% 0,80-0,99; $p < 0,039$) foram independentemente associados com fibrose significativa. O comprimento dos telômeros ajustado à idade tende a diminuir junto com o estágio de fibrose da DHGNA. Em particular, entre os componentes histológicos da DHGNA, a gravidade da fibrose parece estar relacionada ao comprimento dos telômeros no fígado (242).

Por outro lado, Laish et al avaliaram os telômeros leucocitários periféricos de 22 pacientes com DHGNA, 20 com cirrose criptogênica e 20 controles masculinos pareados por idade. O comprimento dos telômeros foi analisado usando hibridização in situ de fluorescência quantitativa, e a senescência celular foi avaliada pela porcentagem de células com focos de heterocromatina associados à senescência. Menor comprimento dos telômeros e aumento da senescência celular foi demonstrado em pacientes com DHGNA, em comparação com os pacientes com cirrose criptogênica e controles saudáveis. Enquanto o mRNA hTERT foi significativamente diminuído, o comprimento de telômeros foi aumentado em pacientes com cirrose criptogênica, em comparação com o grupo DHGNA e indivíduos saudáveis. Assim, existe uma correlação entre a expressão do mRNA hTERT e o comprimento dos telômeros em pacientes com DHGNA, o que pode estar relacionado a distúrbios metabólicos associados e ao risco de transformação maligna (243).

A análise dos dados do NHANES 1999-2002 avaliou comprimento de telômeros de leucócitos em pacientes com DHGNA presumida (definida como ALT > 30 U/L para homens e > 19 para mulheres) em 6.738 participantes com idade média de 46,3 anos revelou que a DHGNA presumida foi inversamente proporcional à CTL em adultos jovens de 20 a 39 anos, mas não na população em geral. O quartil de comprimento de telômeros mais curto foi associado a um

OR significativamente maior para fibrose avançada (medido pelo escore de fibrose NAFLD, FIB4 e índice de razão AST para plaquetas) em comparação com o quartil mais longo (OR 2,36 vs 2,01 $p < 0,05$) em um modelo de análise univariada e uma análise multivariada ajustada à idade, sexo, etnia, circunferência da cintura, tabagismo, diabetes, HAS e HDL (244).

É importante discutir que o encurtamento dos telômeros também foi observado nas ilhotas pancreáticas de pacientes com DM2, afetando tanto as células beta quanto, em menor grau, as células alfa, possivelmente contribuindo para a diminuição da secreção de insulina em estágios mais avançados da doença (245). Embora se reconheça que o estresse oxidativo excessivo induz danos nos telômeros e reduz seu comprimento e comprimento dos telômeros em células β pancreáticas, nesta mostrou-se encurtado em pacientes com DM, potencialmente levando a uma capacidade prejudicada de proliferar e secretar insulina e levar à morte celular acelerada. Por outro lado, a redução do comprimento dos telômeros de leucócitos também foi relatada em pacientes com obesidade ou resistência à insulina, ambos frequentemente associados ao DM2. Coletivamente, os dados disponíveis sugerem que hiperglicemia, estresse oxidativo e danos nos telômeros nos adipócitos e pancreáticos criam um ciclo vicioso subjacente à fisiopatologia do DM2. A redução de comprimento de telômeros em indivíduos com intolerância à glicose já está sendo reconhecida como fator de risco para o aparecimento de DM (246).

Estudo brasileiro analisou comprimento de leucócitos do sangue periférico por PCR em sujeitos com DM2 diagnosticados recentemente (tempo médio desde o diagnóstico de 1 ano, a maioria estava em monoterapia com metformina), incluindo 108 pacientes com DM2 (87 mulheres, 21 homens) e 125 (37 mulheres, 88 homens) controles pareados por idade com tolerância normal à glicose. A mediana do comprimento de telômeros não foi diferente entre pacientes com DM2 e controles. No entanto, análises de regressão linear múltipla mostraram que o comprimento de telômeros foi inversamente associado ao tempo desde o diagnóstico de DM2, glicemia de jejum e HbA1c, mas não com a HbA1c avaliada nos 5-12 meses anteriores, após ajuste para idade, sexo e IMC (247).

Um estudo de coorte realizado na China com seguimento de 6 anos de 64 pacientes com DM2 sem DHGNA no início do seguimento mostrou que 39 indivíduos desenvolveram esteatose nesse período. Não houve diferença significativa entre os dois grupos no comprimento dos telômeros basais; entretanto, ao final do sexto ano, o comprimento dos telômeros havia diminuído no grupo de indivíduos que desenvolveram DHGNA (248).

Estudo também chinês avaliou 442 pacientes entre 20 a 84 anos, com determinação de fibrose hepática avançada por NFS e pontuação FIB-4 (se NFS > 0,676 ou FIB-4 > 2,67). Comprimento de telômeros de leucócitos foi medido pelo comprimento do fragmento de restrição terminal por Southern blot. Neste estudo, 16,5% apresentavam fibrose avançada, 30,8% não tinham fibrose avançada e os 52,7% restantes eram indeterminados. Os pacientes com DM2 com fibrose hepática avançada eram mais velhos ($p < 0,001$) e maior tempo de diagnóstico de DM2 ($p = 0,002$). IMC, circunferência abdominal, ALT e AST também foram significativamente maiores em pacientes diabéticos com fibrose avançada (todos $p > 0,005$). Por regressões logísticas múltiplas, comprimento de telômeros foi significativamente associado com fibrose avançada em DM2 (OR: 0,997, IC 95%: 0,996–0,999; $p = 0,002$), juntamente com idade (OR 1,239 95% 1,129-1,359), sexo (OR: 0,217, IC 95%: 0,056–0,850; $p = 0,028$) e ALT (OR: 1,133, IC 95%: 1,016-1,210; $P < 0,001$). A duração do diabetes só foi significativamente associada à fibrose avançada em pacientes com DM2 com mais de 6 anos de doença (OR 1,557 IC 95% 1,059-2,291 $p = 0,024$). Curiosamente, apenas comprimento de telômeros (OR 0,998 95% CI 0,997-1,0 $p = 0,0043$) e idade (IC 95% 1,115 - 1,033-1,204 $p = 0,005$) foram significativamente relacionados à fibrose avançada em pacientes com DM2 do sexo feminino (249).

Outro estudo chinês avaliou 120 pacientes com DM2 sem DHGNA e 120 pacientes com DM2 pareados por idade com DHGNA. A DHGNA foi definida por US. Comprimento de telômeros de leucócitos em pacientes com DM2 com DHGNA foram significativamente mais longos do que aqueles sem DHGNA (6.400,2 pares de bases vs. 6.023,7 $p < 0,001$), especialmente quando a duração do diabetes foi inferior a 2 anos. Enquanto isso, a tendência de menor comprimento de telômeros foi associada ao aumento da duração do diabetes em pacientes com DM2 com DHGNA, mas não em pacientes com DM2 sem

DHGNA. Finalmente, comprimento de telômeros (OR 1,001, IC 95% 1,000-1,002, $p < 0,001$), bem como IMC (OR: 1,314, IC95% 1,169-1,477, $p < 0,001$) e triglicerídeos (OR: 1,984, IC 95% 1,432–2,747, $p < 0,001$), tiveram uma associação significativa com o status de DHGNA em pacientes com DM2 (250).

Meta-análise de 17 artigos publicados entre 1990-2015 identificou significativa associação entre o comprimento dos telômeros e DM2 em 5575 pacientes com diabetes e 6.349 indivíduos saudáveis. A diferença média agrupada agrupado por região geográfica indicou uma associação significativa entre o comprimento do telômero encurtado e diabetes mellitus (SMD: 3,41; IC 95%: 4,01, 2,80; heterogeneidade, $I^2 = 99\%$) (251).

Por fim, é digno de nota que novos estudos estão surgindo com relação ao comprimento de telômeros como marcador de doença isquêmica associado ou não a diabetes (252).

O ferro é um micronutriente essencial que é necessário para muitos aspectos da fisiologia humana (253) incluindo a homeostase metabólica e a estabilidade do genoma. Estudo em camundongos demonstra que o ferro tecidual está negativamente correlacionado com a expressão de TERT e TERC no fígado, rim e coração de camundongos parabióticos (254).

Dados do NHANES 1999-2002 dos EUA analisaram 7.336 adultos com 20 anos ou mais para concentrações séricas de ferritina (alta acima de 200 ng/dL para mulheres e 300 ng/dL para homens e baixo se < 30 ng/dL). Concentrações séricas elevadas de ferritina, comparados aos normais, foram inversamente associados ao comprimento dos telômeros. Após ajuste para fatores demográficos, socioeconômicos e de estilo de vida, IMC, proteína C reativa e composição do tipo de célula leucocitária, o coeficiente β para o comprimento dos telômeros transformados em log foi -0,020 (SE 0,009, $P = 0,047$). A associação foi mais forte em adultos de 65 anos ou mais (β _coeficiente -0,081, SE 0,017, $P < 0,001$) do que em adultos de 20 a 44 anos (β _coeficiente -0,023, SE 0,019, $P = 0,24$) ou adultos de 45 a 64 anos de idade (β _coeficiente 0,024, SE 0,015, $P = 0,10$) (P para interação 0,003). Concentrações séricas baixas de ferritina, comparados com concentrações séricas normais de ferritina, não foram significativamente associados ao comprimento dos telômeros (255).

Não encontramos estudos que analisassem a ferritina em DHGNA e CLT. Em indivíduos com Hemocromatose, o *Iron Overload Screening Study* demonstrou que indivíduos com fenótipo de ferro elevado (definido se a ferritina estava acima de 300 ng/mL para homens ou 200 ng/mL para mulheres) tinham telômeros mais curtos, mas não entre indivíduos com mutações HFE ou C282Y/C282Y. Neste último subgrupo com níveis de FS > 1.000 ng/mL (n = 11) o comprimento dos telômeros foi menor (255,3) do que aqueles com FS não elevada (<300 ng/mL em homens e <200 ng/mL em mulheres) (n = 29), mas sem significância estatística (p 0,29) (256).

Nosso estudo é limitado pelo pequeno tamanho da amostra e seus dados transversais. Existem poucos estudos que analisaram a DHGNA e o comprimento dos telômeros. Nosso objetivo foi investigar a interação de variáveis metabólicas com sobrepeso/obesidade em indivíduos com e sem diabetes e DHGNA com comprimento dos telômeros. Embora reconheçamos que a avaliação histológica de EHNA e fibrose teria permitido insights valiosos sobre o significado clínico do conteúdo de gordura no fígado, a importância da avaliação não invasiva está respaldada pela alta prevalência de DHGNA em todo o mundo.

6.5 CONCLUSÃO

Concentrações séricas de IGF-1 não tiveram associação com a fração hepática de gordura em DHGNA, isso pode ter acontecido por nossa amostra ser composta por pacientes com baixo risco de fibrose.

Embora nossos dados não tenham demonstrado eficácia dos ISGLT2 acreditamos que os mesmos devem ser mais bem estudados para o tratamento de pacientes com DHGNA sem DM2 em uma amostragem maior, uma vez que os estudos em pacientes com DM2 estão mostrando bons resultados.

Nossos achados reiteram que a idade é o fator mais importante associado ao comprimento dos telômeros e a obesidade por si só pode não predizer encurtamento de telômeros.

Maiores concentrações séricas de AST e GGT e maior pontuação no índice FIB4 foram associadas ao encurtamento de telômeros de leucócitos, e este é um ponto que deve ser estudado.

7.REFERÊNCIAS

1. Benedict M, Zhang X. Non-alcoholic fatty liver disease: an expanded review. *World J Hepatol.* 2017;16: 715-732.
2. Lindenmeyer CC, McCullough AJ. The Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease - An Evolving View. *Clin Liver Dis.* 2018; 22(1): 11–21.
3. Estes C, Anstee QM, Arias-Loste MT, Bantel H, Bellentani S, Caballeria J. Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016–2030. *J Hepatol.* 2018; 69:896–904.
4. Pappachan JM, Babu B, Krishnan B, Ravidran C. Non-alcoholic Fatty Liver Disease: A Clinical Update. *J Clin Transl Hepatol.* 2017; 5:384-393.
5. Vizuette J, Camero A, Malakouti M, Garapati K, Gutierrez J. Perspectives on NAFLD: an overview of present and future therapies. *J Clin Transl Hepatol.* 2017; 5: 67-75.
6. Ullah R, Rauf N, Nabi G, Ullah H, Shen Y, Zhou Y-D, Fu J. Role of Nutrition in the Pathogenesis and Prevention of Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Recent Updates. *Int J Biol Sci.* 2019; 15(2): 265-276.
7. Cheng S, Wiklund P, Autio R, Borra R, Ojanen X, Xu L, et al. Adipose Tissue Dysfunction and Altered Systemic Amino Acid Metabolism Are Associated with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *PLoS ONE.* 2015 10(10): e0138889. doi: 10.1371/journal.pone.0138889.
8. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M et al. The Diagnosis and Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Practice Guidance From the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatol.* 2018; 67(1): 328-357.
9. Sumida Y, Yoneda M. Current and future pharmacological therapies for NAFLD/NASH. *J Gastroenterology.* 2017. <https://doi.org/10.1007/ss00535-017-1415-1>.
10. Szanto KB, Li J, Cordero P, Oben JA. Ethnic differences and heterogeneity in genetic and metabolic makeup contributing to nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2019;12: 357–367.

11. Iqbal U, Perumpail BJ, Akhtar D, Kim D, Ahmed A. The Epidemiology, Risk Profiling and Diagnostic Challenges of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Medicines*. 2019; 1(6): 41-60.
12. Yao Y, Cai J, She Z, Li H. Insights into the Epidemiology, Pathogenesis, and Therapeutics of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Adv. Sci*. 2019; 6 (8): 1801585.
13. Saab S, Manne V, Nieto J, Schwimmer JB, Chalasani N. Nonalcoholic fatty liver disease in Latinos. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2016;14: 5-12.
14. Wruck W, Graffmann N, Kawala M-A, Adjaye J. Concise Review: Current Status and Future Directions on Research Related to Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Stem Cells*. 2017; 35: 89–96
15. Wong S-W, Ting Y-W, Chan W-H. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease-related hepatocellular carcinoma and its implications. *JGH Open*. 2018; 2: 235–241.
16. McPherson S, Hardy T, Henderson E, Burt AD, Day CP, Anstee QM. Evidence of NAFLD progression from steatosis to fibrosing-steatohepatitis using paired biopsies: Implications for prognosis and clinical management. *J Hepatol*. 2015; 62: 1148–1155.
17. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018;15(1): 11-20.
18. Thompson DS, Tennant IA, Soares DP, Osmond C, Byrne CD, Forrester TE et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Nonobese Subjects of African Origin Has Atypical Metabolic Characteristics. *J Endocr Soc*. 2019; 3(11): 2051–2063.
19. Jensen T, Abdelmalek MF, Sullivan S, Nadeau KJ, Green M et al. Fructose and sugar: A major mediator of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2018; 68: 1063–1075
20. Ouyang X, Cirillo P, Sautin Y, McCall S, Bruchette JL, Diehl AM et al. Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2008;48: 993–999.
21. Gastaldelli A, Cusi K. From NASH to diabetes and from diabetes to NASH: Mechanisms and treatment options. *JHEP Reports*. 2019;1: 312–328

22. Puri P, Daita K, Joyce A. The presence and severity of nonalcoholic steatohepatitis is associated with specific changes in circulating bile acids. *Hepatology*. 2018; 67 (2): 534-548.
23. Schuster S, Cabrera D, Arrese M, Feldstein AE. Triggering and resolution of inflammation in NASH. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018; 15 (6): 349-364
24. Legry V, Francque S, Haas JT, Verrijken A, Caron S. Bile Acid Alterations Are Associated With Insulin Resistance, but Not With NASH, in Obese Subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017; 102(10): 3783–3794.
25. Katsuomi G, Shimizu I, Yoshida Y et al. Senescence in cardiovascular and metabolic diseases. *Front Cardiovasc Med*. 2018; 5:18.
26. Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, Sanyal AJ. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med*. 2018;24(7): 908–922.
27. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*. 2016; 65:1038-1048.
28. Vasques ACJ, Rosado LEFPL, Alfenas RCF, Geloneze B. Análise Crítica do Uso dos Índices do Homeostasis Model Assessment (HOMA) na Avaliação da Resistência à Insulina e Capacidade Funcional das Células Pancreáticas. *Arq Bras Endoc Metab*. 2008; 52(1): 32-39.
29. Kuhn T, Nonnenmacher T, Sookthai D, Schubel R, Pacheco DAQ, von Stackelberg O et al. Anthropometric and blood parameters for the prediction of NAFLD among overweight and obese adults. *BMC Gastroenterol*. 2018;18: 113.
30. Abenavoli L, Milic N, Renzo LD, Preveden T, Médic-Stojanoska, De Lorenzo A. Metabolic aspects of adult patients with nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2016; 22(31): 7006-7016.
31. Xia JY, Holland WL, Kusminski CM, Sun K, Sharma AK, Pearson MJ. Targeted Induction of Ceramide Degradation Leads to Improved Systemic Metabolism and Reduced Hepatic Steatosis. *Cell Metab*. 2015; 22(2): 266–278.
32. Akazawa Y, Nakao K. To die or not to die: death signaling in nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol*. 2018;53: 893-906.

33. Golabi P, Otgonsuren M, de Avila L, Sayiner M, Rafiq N, Younossi ZM. Components of metabolic syndrome increase the risk of mortality in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Medicine (Baltimore)*. 2018;97:e0214.
34. Lara-Diaz VJ, Castilla-Cortazar I, Martín-Estal I, Garcia-Manarino M, Aguire GA, Puche JE et al. IGF-1 modulates gene expression of proteins involved in inflammation, cytoskeleton, and liver architecture. *J Physiol Biochem*. 2017;73: 245–258.
35. Cohen DH, Le Roith D. Obesity, type 2 diabetes, and cancer: the insulin and IGF connection. *Endocrine-Related Cancer*. 2012;19: 27–45.
36. Dichtel LE, Kathleen EC, Corey KE, Misdraji J, Bredella MA, Schorr M et al. The Association Between IGF-1 Levels and the Histologic Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Transl Gastroenterol*. 2017;8:e217. <https://doi:10.1038/ctg.2016.7>.
37. Takahashi Y. The Role of Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor-I in the Liver. *Int J Mol Sci*. 2017;18: 1447. \
38. Carvalho-Furtado ACL, Carvalho-Louro DM, Regattieri NAT, Rodrigues MP, Montenegro MLRN, Ferro AM, Pirangi PS and Naves LA. Transient Elastography and Controlled Attenuation Parameter (CAP) in the Assessment of Liver Steatosis in Severe Adult Growth Hormone Deficiency. *Front Endocrinol*. 2019; 10:364. <https://doi:10.3389/fendo.2019.00364>
39. Zhang E, Wartelle-Bladou C, Lepanto L, Lachaine J, Cloutier G, Tang A. Cost-Utility Analysis of Nonalcoholic Steatohepatitis Screening. *Eur Radiol*. 2015; 25(11): 3282-3294.
40. Zhou J-H, Cai J-J, She Z-G, Li H-L. Noninvasive evaluation of nonalcoholic fatty liver disease: Current evidence and practice. *World J Gastroenterol*. 2019;25(11): 1307-1326.
41. Cengiz M, Sentur KS, Cetin B, Bayrak AH, Bilek SU. Sonographic assessment of fatty liver: intraobserver and interobserver variability. *Int J Clin Exp Med*. 2014; 7(12): 5453.
42. Saadeh S, Younossi ZM, Remer EM, Gramlich T, Ong JP, Hurley M et al. The utility of radiologic imaging in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterol*. 2002; 123: 745-750.

43. Tana C, Tana M, Rossi S, Silingardi M, Schiavone C. Hepatic artery resistive index (HARI) and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) fibrosis score in NAFLD patients: cut-off suggestive of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) evolution. *J Ultrasound*. 2016; 19: 183–189.
44. Lin SC, Heba E, Wolfson T, Ang B, Gamst A, Han A et al. Noninvasive diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease and quantification of liver fat using a new quantitative ultrasound technique. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2015; 13(7): 1337–1345.
45. Liu K, Wong VW, Lau K, Liu SD, Tse YK, Yip TC et al. Prognostic value of controlled attenuation parameter by transient elastography. *Am J Gastroenterol*. 2017; 112: 1812-1823.
46. Ryu H, Ahn SJ, Yoon JH, Lee JM. Reproducibility of liver stiffness measurements made with two different 2-dimensional shear wave elastography systems using the comb-push technique. *Ultrasonography*. 2018. <https://doi.org/10.14366/usg18046>
47. Lapadat AM, Jianu IR, Ungureanu BS. Non-invasive imaging techniques in assessing non-alcoholic fatty liver disease: a current status of available methods. *J Med Life*. 2017;10(1): 19-26.
48. Tovo CV, de Mattos AZ, Coral GP, Branco FS, Suwa E, Mattos AA. Noninvasive imaging assessment of non-alcoholic fatty liver disease: focus on liver scintigraphy. *World J Gastroenterol*. 2015;21(15): 4432-4439.
49. Hayashi T, Saitoh S, Fukuzawa K, Tsuji Y, Takahashi J, Kawamura Y et al. Noninvasive Assessment of Advanced Fibrosis Based on Hepatic Volume in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gut and Liver*. 2017;11(5): 674-683.
50. Xiaozhou Ma, Nagaraj-Setty H, Kambadakone A, Mino-Kenudson M, Hahn PF, Sahani DV. Imaging-based Quantification of Hepatic Fat: Methods and Clinical Applications. *Radiographics*. 2009;29: 1253-1280.
51. Parente DB, Rodrigues RS, Paiva FF, Oliveira Neto JA, Machado-Silva L, Lanzoni V et al. Is MR Spectroscopy Really the Best MR-Based Method for the Evaluation of Fatty Liver in Diabetic Patients in Clinical Practice? *PLoS ONE*. 2014;9(11)e112574.

52. Traussigg S, Kienbacher C, Gajlosik M, Valkovic L, Halibasic E, Stift J et al. Ultra-high-field-magnetic resonance spectroscopy in non-alcoholic fatty liver disease: novel mechanistic and diagnostic insights of energy metabolism in non-alcoholic fatty steatohepatitis and advanced fibrosis. *Liver Inter.* 2017;1-10.
53. Hui SCN, So H kwan, Chan DFY, Wong SKH, Yeung DKW, Ng EKW et al. Validation of water-fat MRI and proton MRS in assessment of hepatic fat and the heterogeneous distribution of hepatic fat and iron in subjects with non-alcoholic fatty liver disease. *Eur J Radiol.* 2018;107: 7-13.
54. Artz ND, Haufe WN, Hooker CA, Hamilton G, Wolfson T, Campos GM et al. Reproducibility of MR-Based Liver Fat Quantification Across Field Strength: Same-Day Comparison Between 1.5T and 3T in Obese Subjects. *J Magn Reson Imaging.* 2015;42(3): 811-817.
55. Permutt Z, Le TA, Peterson MR, Seki E, Brenner DA, Sirlin C, Loomba R. Correlation between liver histology and novel magnetic resonance imaging in adult patients with non-alcoholic fatty liver disease - MRI accurately quantifies hepatic steatosis in NAFLD. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012; 36(1): 22–29.
56. Adams, LA. Accurate quantification of hepatic fat—is it important? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2015;12: 126–127.
57. Patel J, Bettencout R, Cui J, Salotti J, Hooker J, Bhatt A et al. Association of noninvasive quantitative decline in liver fat content on MRI with histologic response in nonalcoholic steatohepatitis. *Therap Adv Gastroenterol.* 2016;9(5): 692-701.
58. Bril F, Barb D, Lomonaco R, Lai J, Cusi K. Change in hepatic fat content measured by MRI does not predict treatment-induced histological improvement of steatohepatitis. *J Hepatol.* 2019.
59. Jayakumar S, Middleton MS, Lawitz EJ, Mantry PS, Caldwell SH, Arnold H et al. Longitudinal correlations between MRE, MRI-PDFF, and liver histology in patients with non-alcoholic steatohepatitis: Analysis of data from a phase II trial of selonsertib. *J Hepatol.* 2019;70: 133–141.
60. Harrison SA, Bashir MR, Guy CD, Zhou R, Moylan CA, Frias JP et al. Resmetirom (MGL-3196) for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis:

- a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet*. 2019; 394(10213):2012-2024.
61. Castera L, Friedrich-Rust M, Loomba R. Noninvasive Assessment of Liver Disease in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2019;156: 1264–1281.
 62. Marino L, Jornayvaz FR. Endocrine causes of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2015; 21(39): 11053-11076.
 63. Singh SP, Barik RK. NonInvasive Biomarkers in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Are We There Yet? *J Clin Exp Hepatol*. 2020;10(1): 88-98.
 64. Shah AG, Lydecker A, Murray K, Tetri BN, Contos MJ, Sanyal AJ. Use of the FIB4 index for non-invasive evaluation of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009;7(10): 1104-1112.
 65. Nones RB, Ivantes CP, Pedroso MLA. Can FIB4 and NAFLD fibrosis scores help endocrinologists refer patients with non-alcoholic fat liver disease to a hepatologist? *Arch Endocrinol Metabol*. 2017;61(3): 276-281.
 66. Bril F, McPhaul MJ, Caulfield MP, Castille J-M, Poynard T, Soldevilla-Pico C et al. Performance of the Steatotest, Actitest, Nashtest and Fibrotest in a multiethnic cohort of patients with type 2 diabetes mellitus. *J Invest Med*. 2018; 0: 1-19.
 67. Bril F, McPhaul MJ, Caulfield MP, Clark VC, Soldevilla-Pico S, Firpi-Morell R et al. Performance of plasma biomarkers and diagnostic panels for nonalcoholic steatohepatitis and advanced fibrosis in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2019; 42: 1-8.
 68. Chicho-Lach, Celinski K, Prozorow KB, Swatek J, Stomka M, Lach T. The BARD score and the NAFLD fibrosis score in the assessment of advanced liver fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Med Sci Monit*. 2012; 18(12): CR735-740.
 69. Nassif AT, Nagano TA, Okayama S, Nassif LS, Branco-Filho A, Sampaio-Neto J. Performance of the Bard Scoring System in Bariatric Surgery Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Obes Surg*. 2017.
 70. Ooi GJ, Burton PR, Doyle L, Wentworth JM, Bhathal PS, Cowley MC et al. Modified thresholds for fibrosis risk scores in nonalcoholic fatty liver disease are necessary in the obese. *Obes Surg*. 2017;27(1):115-125.

71. Xiao G, Zhu S, Xiao X, Yan L, Yang J, Wu G. Comparison of laboratory tests, ultrasound or magnetic resonance elastography to detect fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2017;66: 1486-1581.
72. Vilar-Gomez E, Chalasani N. Non-invasive assessment of non-alcoholic fatty liver disease: clinical prediction and blood-based biomarkers. *J Hepatol*. 2018 fev;68(2):305-315.
73. Chan T-T, Wong, V W-S. In Search of New Biomarkers for Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Liver Dis (Hoboken)*. 2016; 8(1): 19–23.
74. Daniels SJ, Leeming DJ, Eslam M, Hashem AM, Nielsen MJ, Krag A et al. ADAPT: An Algorithm Incorporating PRO-C3 Accurately Identifies Patients With NAFLD and Advanced Fibrosis. *Hepatology*. 2019;69(3):1075-1086
75. Quadri S, Ahlhom N, Lonsmann I, Pellegrini P, Poikola A, Luukkonen P et al. Obesity modifies the performance of fibrosis biomarkers in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2022; 107:e2008-2020.
76. Cusi K. A simple test to identify the risk of NASH and cirrhosis in people with obesity or diabetes: the time to screen is now. *J Clin Endocrinol Metab*. 2022;107:e3076-3077.
77. Sanyal A, Cusi K, Hartman ML, Zhang S, Bastur EJ, Bue-Vallesjey JM et al. Cytokeratin-18 and enhanced liver fibrosis scores in type 1 and type 2 diabetes and effects of two different insulins. *J Invest Med*. 2018;66: 661-668.
78. Bril F, Leeming DJ, Karsdal MA, Kalavalapalli S, Barb D, Lai J et al. Use of plasma fragments of propetides of type III, V, VI procollagen for the detection of liver fibrosis in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2019;42: 1-4.
79. Newsome PN, Cramb R, Davison DM, Dillon JF, Foulerton M et al. Guidelines on the management of abnormal liver blood tests. *Gut*. 2018; 67(1):6-19.
80. Wong T, Wong RJ, Gish RJ. Diagnostic and Treatment Implications of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterol Hepatol (NY)*. 2019; 15(2): 83–89.

81. Budd J, Cusi K. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: What Does the Primary Care Physician Need to Know? *Am J Med.* 2020;133(5):536-543.
82. Portillo-Sanchez P, Bril F, Maximos M, Lomonaco R, Biernacki D, Orsak B et al. High Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Normal Plasma Aminotransferase Levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(6): 2231-2238.
83. Ma X, Liu S, Zhang J, Dong M, Wang Y, Wang M et al. Proportion of NAFLD patients with normal ALT value in overall NAFLD patients: a systematic review and meta-analysis. *BMC Gastroenterol.* 2020; 20:10. <https://doi.org/10.1186/s12876-020-1165-z>.
84. Ramadori P, Klag T, Malek NP, Heikenwalder M. Platelets in chronic liver disease, from bench to bedside. *JHEP Reports.* 2019;1: 448–459
85. Lilford RT, Bentham L, Girling A, Lithcfield I, Lancashire R et al. Birmingham and Lambeth Liver Evaluation Testing Strategies Study (BALLETS): a prospective cohort study. *Health Technol Assess.* 2013;17(28): i-xiv.
86. Ong SY, Nicoll AJ, Delatycki MB. How should hyperferritinaemia be investigated and managed? *Eur J Intern Med.* 2016; 33:21.
87. Antunes SA, Canziani MEF. Hcpidin: an important iron metabolism regulator in chronic kidney disease. *J Bras Nefrol.* 2016;38(3): 351-355
88. Britton LJ, Subramaniam VN, Crawford DHG. Iron and non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2016; 22(36): 8112-8122.
89. Shah RA, Kowdley KV. Serum ferritin as a biomarker for NAFLD: ready for prime time? *Hepatol Int.* 2019; 13:110-112.
90. Lombardi R, Pisano G, Fargion S. Role of Serum Uric Acid and Ferritin in the Development and Progression of NAFLD *Int J Mol Sci.* 2016;17:548.
91. Haghgoo SM, Sharafi H, Alavian SM. Serum cytokines, adipokines and ferritin for non-invasive assessment of liver fibrosis in chronic liver disease: a systematic review. *Clin Chem Lab Med.* 2019;57(5):577-610.
92. Ryan J, Valenti L. Hepatic iron is the major determinant of serum ferritin in NAFLD patients. *Liver Int.* 2018;38(1): 164-173.
93. Hagstrom H, Nasr P, Bottai M, Ekstedt M, Kechagias S, Hultcrantz R et al. Elevated serum ferritin is associated with increased mortality in non-

- alcoholic fatty liver disease after 16 years of follow-up. *Liver Int.* 2016;36(11):1688-1695.
94. Du S-X, Lu L-L, Geng N, Victor DW, Chen L-Z, Wang C et al. Association of serum ferritin with non- alcoholic fatty liver disease: a meta-analysis. *Lipids Health Dis.* 2017;16(1):228.
 95. Jung JY, Shim JJ, Park SK, Ryoo J-H, Choi J-M, Oh I-H et al. Serum ferritin level is associated with liver steatosis and fibrosis in Korean general population. *Hepatol Int.* 2019;13(2):222-233.
 96. Barchetta I, Enhörning S, Cimini FA, Capoccia D, Chiappetta C, Di Cristofano C, et al. Elevated plasma copeptin levels identify the presence and severity of non-alcoholic fatty liver disease in obesity. *BMC Medicine.* 2019;17:85.
 97. Perdomo CM, Frühbeck G, Escalada J. Impact of Nutritional Changes on Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrients.* 2019;11:677.
 98. Hallsworth K, Adams LA. Lifestyle modification in NAFLD/NASH: Facts and figures *JHEP Reports.* 2019;1:468–479.
 99. Tarantino G, Citro V, Capone D. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Challenge from Mechanisms to Therapy. *J Clin Med.* 2020;9:15.
 100. De Chiara F, Checcllo CU, Azcón JR. High Protein Diet and Metabolic Plasticity in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Myths and Truths. *Nutrients.* 2019; 11, 2985.
 101. Papamiliadous ES, Roberts SK, Nicoll AJ, Ryan MC, Itsiopoulos C, Salim A et al. A randomised controlled trial of a Mediterranean Dietary Intervention for Adults with Non Alcoholic Fatty Liver Disease (MEDINA): study protocol. *BMC Gastroenterol.* 2016;16:14.
 102. Aller R, Fernandez-Rodrigues C, Iacono O, Banares R, Abad J, Carrion JÁ et al. Documento de consenso. Manejo de la enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHGNA). Guía de práctica clínica. *Gastroenterol hepatol (Ed. impr.).* 2018;41(5): 328-49.
 103. Romero-Gomez M, Zelber Sagi S, Trenell M. Treatment of NAFLD with diet, physical activity and exercise. *J Hepatol.* 2017;67(4): 829-846.

104. The Look AHEAD Research Group. The Look AHEAD Study: A Description of the Lifestyle Intervention and the Evidence Supportin it. Obesity (SilverSpring). 2006;14(5): 737-752.
105. The Look AHEAD Research Group. Effect of a 12-Month Intensive Lifestyle Intervention on Hepatic Steatosis in Adults with type Diabetes. Diabetes Care. 2010;33: 2156-2163.
106. Khan RS, Bril F, Cusi K, Newsome PN. Modulation of Insulin Resistance in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Hepatology. 2019;70(2): 711-724.
107. Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, McCullough A, Diehl AM, Bass NM et al. Pioglitazone, Vitamin E, or Placebo for Nonalcoholic Steatohepatitis. N Engl J Med. 2010; 362(18): 1676-1685.
108. Cusi K, Isaacs S, Barb D, Basu R, Caprio S, Garvey WT et al. American Association of Clinical Endocrinology Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Primary Care and Endocrinology Clinical Settings Co-Sponsored by the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). Endocr Pract. 2022; 28(5):528-562.
109. Sugita T, Amano K, Nakano M, Masubuchi N, Sugihara M, Matsuura T. Analysis of the Serum Bile Acid Composition for Differential Diagnosis in Patients with Liver Disease. Gastroenterol Res Pract. 2015;2015:717431.
110. Radaelli MG, Martucci F, Perra S, Accornero S, Castoldi G, Lattuada G et al. NAFLD/NASH in patients with type 2 diabetes and related treatment options. J Endocrinol Invest. 2018 maio;41(5):509-521.
111. Neuschwander-Tetri BA, Loomba R, Sanyal AJ, Lavine JE, Van Natta ML, Abdelmalek MF et al. Farnesoid X nuclear receptor ligand Obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. Lancet. 2015; 385: 956–965.
112. Abenavoli L, Falalyeyeva T, Boccuto L, Tsyryuk O, Kobyljak N. Obeticholic Acid: A New Era in the Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Pharmaceuticals (Basel). 2018;11(4):104.

113. Staels B, Rubenstrunk A, Noel B, Rigou G, Delataille P, Millatt LJ et al. Hepatoprotective effects of the dual peroxisome proliferator-activated receptor alpha/delta agonist, GFT505, in rodent models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2013;58: 1941–1952.
114. Ratziu V, Harrison SA, Francque S, Bedossa P, Lehert P et al. GOLDEN-505 Investigator Study Group. Elafibranor, an agonist of the peroxisome proliferator-activated receptor- α and - δ , induces resolution of non-alcoholic steatohepatitis without fibrosis worsening. *Gastroenterol*. 2016;150: 1147–1159.
115. Oseini A, Sanyal AJ. Therapies In Non-Alcoholic Steatohepatitis (Nash). *Liver Int*. 2017; 37(1): 97–103.
116. Sookoian S, Pirola CJ. Repurposing drugs to target nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol*. 2019;25(15): 1783-1792.
117. Gomes MG. Glitazonas e síndrome metabólica: mecanismos de ação, fisiopatologia e indicações terapêuticas. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2006; 50(2): 271-280
118. Hsiao PJ, Chiou YC, Jian H-J, Lee M-Y, Hsieh T-J, Kuo K-K. Pioglitazone Enhances Cytosolic Lipolysis, β -Oxidation and Autophagy to Ameliorate Hepatic Steatosis. *Sci Rep*. 2017;7(1):9030.
119. Korhonen P, Heintjes M, Williams R, Hoti F, Christopher S, Majak Met. al. Pioglitazone use and risk of bladder cancer in patients with type 2 diabetes: retrospective cohort study using datasets from four European countries. *BMJ*. 2016; 354: i3903.
120. Viscoli CM, Inzucchi SE, Young LH, Insogna KL, Conwit R, Furie KL et al. Pioglitazone and risk for bone fracture: safety data from a randomized clinical trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017; 102: 914–22.
121. Davidson MB, Pan D. An updated meta-analysis of pioglitazone exposure and bladder cancer and comparison to the drug's effect on cardiovascular disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Diabetes Res Clin Pract*. 2018; 135: 102–10.
122. Stefan N, Häring H-U, Cusi K. Non-alcoholic fatty liver disease: causes, diagnosis, cardiometabolic consequences, and treatment strategies. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2018; (18)30154-2.

123. Bril F, Biernacki DM, Kalavapalli S, Lomonaco R, Subbarayan SK, Lai J et al. Role of Vitamin E for nonalcoholic steatohepatitis in patients with type 2 diabetes: A randomized controlled trial. *Diabetes Care*. 2019;42 (8): 1481-1488.
124. Ozaki A, Yoneda M, Kessoku T, Iwaki M, Kobayashi T, Honda Y et al. Effect of tofogliflozin and pioglitazone on hepatic steatosis in non-alcoholic fatty liver disease patients with type 2 diabetes mellitus: A randomized, open-label pilot study (ToPiND study). *Contemp Clin Trials Commun*. 2019;17:100516.
125. Boeckmans J, Natale A, Rombaut M, Buyl K, Rogiers V, De Kock J et al. Anti-NASH Drug Development Hitches a Lift on PPAR Agonism. *Cells*. 2019;9(1):37.
126. Lavine JE, Schwimmer JB, Van Natta ML, Molleston JP, Murray KF, Rosenthal P et al. Effect of vitamin E or metformin for treatment of nonalcoholic fatty liver disease in children and adolescents: the TONIC randomized controlled trial. *JAMA*. 2011; 305 (16): 1659-1668.
127. Laursen TL, Hagemann CA, Wei C, Kazankov K, Thomsen KL, Knop FK et al. Bariatric surgery in patients with non-alcoholic fatty liver disease - from pathophysiology to clinical effect. *World J Hepatol*. 2019; 11(2): 138-149.
128. duPlessis J, Korf H, vanPelt J, Windmolders P, Elst IV, Verrijken A et al. Pro-inflammatory cytokines but not endotoxin-related parameters associate with disease severity in patients with NAFLD. *PLoS ONE*. 2016;11(12): 1-15.
129. Sheka AC, Adeyi O, Thompson J, Hameed B, Crawford PA, Ikramuddin S. Nonalcoholic Steatohepatitis A Review *JAMA* 2020;323(12): 1175-1183.
130. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel KA, Franklin BA et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. *Circulation*. 2005;112: 2735-2752.
131. Paudel MS, Tiwari A, Mandal A, Shrestha B, Kafle P, Chaulagai B et al. Metabolic Syndrome in Patients with Non- alcoholic Fatty Liver

- Disease: A Community Based Cross-sectional study. *Cureus*. 2010; 11(2): e4099.
132. Kim J, Lee DY, Park SE, Park C-Y, Lee W- Y, Oh K-W et al. Increased risk for development of coronary artery calcification in subjects with non-alcoholic fatty liver disease and systemic inflammation. *PLoS ONE*. 2017; 12(7): e0180118.
 133. Eriksson L, Nyström T. Activation of AMP-activated protein kinase by metformin protects human coronary artery endothelial cells against diabetic lipoapoptosis. *Cardiovasc Diabetol*. 2014;13: 152.
 134. Xu X, Lu Z, Fassett J, Zhang P, Hu X, Kwak D et.al. Metformin protects against systolic overload-induced heart failure independent of AMP-activated protein kinase $\alpha 2$. *Hypertension*. 2014;63(4): 723-728.
 135. Duarte SMB, Stefano JT, Oliveira CP. Microbiota and nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis (NAFLD/NASH). *Microbiota and nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis (NAFLD/NASH)*. *Ann Hepatol*. 2019;18(3):416-421.
 136. Brandt A, Hernández-Arriaga A, Kehm R, Sánchez V, Jin CJ, Nier A et al. Metformin attenuates the onset of non-alcoholic fatty liver disease and affects intestinal microbiota and barrier in small intestine. *Sci Rep*. 2019;9(1):6668.
 137. Taceli M, Celsa C, Magro B. Antidiabetic drugs in NAFLD: the accomplishment of two goals at once? *Pharmaceuticals (Basel)*. 2018;11(4):121.
 138. Marso SP, Daniels GH, Brown-Frandsen K, Kirstensen P, Mann JFE, Nauck MA et.al. Liraglutide and Cardiovascular Outcomes in type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2016;375: 311-322.
 139. Armstrong MJ, Gaunt P, Aithal GP, Barton D, Hull D, Parker R et al. Liraglutide safety and efficacy in patients with non-alcoholic steatohepatitis (LEAN): A multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet*. 2016;387: 679-690.
 140. Newsome PN, Buchholtz K, Cusi K, Linder M, Okanoue T, Ratziu V et al. A placebo-controlled trial of subcutaneous semaglutide in nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med*. 2021;384(12):1113e1124.

141. Cusi K. Incretin-based therapies for the management of nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes. *Hepatology*. 2019;69(6): 2318-2322.
142. Lyu X, Zhu X, Zhao B, Du L, Chen D, Wang C et al. Effects of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors on beta-cell function and insulin resistance in type2 diabetes: meta-analysis of randomized controlled trials. *Sci Rep*. 2017; 7: 44865.
143. Cui J, Philo L, Nguyen P, Hofflich H, Hernandez C, Bettencourt R et al. Sitagliptin vs. placebo for non-alcoholic fatty liver disease: A randomized controlled trial. *J Hepatol*. 2016;65: 369-376.
144. DeFronzo RA, Norton L, Abdul-Ghani M. Renal, metabolic and cardiovascular considerations of SGLT2 inhibition. *Nat Rev*. 2017;13: 11-26.
145. Schernthaner G, Drexel H, Moshkovich E, Zilaitiene B, Martinka E, Czupryniak L et al. SGLT2 inhibitors in T2D and associated comorbidities — differentiating within the class. *BMC Endocr Disord*. 2019;19(1):64.
146. Jung CH, Mok JO. The Effects of Hypoglycemic Agents on Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Focused on Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitors and Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonists. *J Obes Metab Syndr*. 2019 mar;28(1):18-29.
147. Cotter DG, Ercal B, Huang X, Leid MG, d'Avignon DA, Graham MJ et al. Ketogenesis prevents diet-induced fatty liver injury and hyperglycemia. *J Clin Invest*. 2014;124(12): 5175–5190.
148. Watt MJ, Miotto PM, De Nardo W, Montgomery MK. The liver as an endocrine organ - linking NAFLD and insulin resistance. *Endocr Rev*. 2019;40(5):1367-1393.
149. Puchalska P, Crawford PA. Multi-dimensional Roles of Ketone Bodies in Fuel Metabolism, Signaling, and Therapeutics. *Cell Metabolism*. 2017; 25:262-284.
150. Patterson RE, Kalavalapalli S, Williams CM, Nautiyal M, Mathew JT, Martinez J, Reinhard MK, McDougall DJ, Rocca JR, Yost RA, Cusi K, Garrett TJ, Sunny NE. Lipotoxicity in steatohepatitis occurs despite an increase in tricarboxylic acid cycle activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2016; 310: 484–494.

151. d'Avignon AD, Puchalska P, Ercal B, Chang YJ, Martin SE, Graham MJ et al. Hepatic ketogenic insufficiency reprograms hepatic glycogen metabolism and the lipidome. *JCI Insight*. 2018;3(12): e99762.
152. Albrechtsen NJW, Pedersen J, Galsgaard KD, Sorensen MW, Suppli M, Janah L et al. The Liver- α -Cell Axis and Type 2 Diabetes. *Endoc Rev*. 2019;40(5):1353-1366.
153. Scheen AJ. Beneficial effects of SGLT2 inhibitors on fatty liver in type 2 diabetes: a common comorbidity associated with severe complications. *Diabetes Metab*. 2019;45(3):213-223.
154. De Lang T. Telomeres and senescence: ending the debate. *Science*. 1998; 279: 334-335.
155. Kass-Eisler A, Greider CW. Recombination in telomere-length maintenance. *Trends Biochem Sci*. 2000;25(4):200-4.
156. Fathi E, Charoudeh HN, Sanaat Z, Farahzadi R. Telomere shortening as a hallmark of stem cell senescence. *Stem Cell Investig*. 2019;6: 7.
157. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*. 1975;98(13): 503-508.
158. Tarik M, Ramakrishnan L, Sachdev HS, Tandon N, Roy A, Bhargava SK et al. Validation of quantitative polymerase chain reaction with Southern blot method for telomere length analysis. *Future Sci OA*. 2018;4: 4.
159. Montpetit AJ, Alhareeri AA, Montpetit M, Starkweather AR, Elmore LW, Filler K et al. Telomere length: a review of methods for measurement. *Nurs Res*. 2014;63(4): 289-299.
160. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acid Resid*. 2002;30(10):e47.
161. Doksani Y. The response to DNA damage at telomeric repeats and its consequences for telomere function. *Genes (Basel)*. 2019;10(4): 318.
162. Ahmed W, Linger J. Impact of oxidative stress in telomere biology. *Differentiation*. 2018;9: 21-27.
163. Turner KJ, Vasu V, Griffin DK. Telomere biology and human phenotype. *Cells*. 2019;8(1):73.

164. Cheng YY, Kao TW, Chang YW, Wu C-J, Peng T-C, Wu L-W et al. Examining the gender difference in the association between metabolic syndrome and the mean leukocyte telomere length. *PLoS ONE*. 2017 12(7): e0180687.
165. Yu Y, Cai J, She Z, Li H. Insights into the Epidemiology, Pathogenesis, and Therapeutics of Nonalcoholic Fatty Liver Diseases. *Adv Sci (Weinh)*. 2019;6(4): 1801585.
166. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2016;64: 1388-1402.
167. Rinella ME. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. *JAMA* 2015;313: 2263-73.
168. Pagano G, Pacini G, Musso G et al. Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: further evidence for an etiologic association. *Hepatology (Baltimore)*. 2002;35: 367-72.
169. Francque SM, van der Graaff D, Kwanten WJ. Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk: Pathophysiological mechanisms and implications. *J Hepatol*. 2016;65: 425-43.
170. Belfort R, Harrison SA, Brown K, Darland C, Finch J, Hardies J et al. A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *N Eng J Med*. 2006;355(22): 2297-307.
171. Howard BV. Insulin resistance and lipid metabolism. *Am J Cardiol*. 1999;84: 28j-32j.
172. Lee DH. Imaging evaluation of non-alcoholic fatty liver disease: focused on quantification. *Clin Mol Hepatol*. 2017;23(4): 290-301.
173. Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am J Gastroenterol*. 2003;98: 960-967.
174. Ioannou GN, Boyko EJ, Lee SP. The prevalence and predictors of elevated serum aminotransferase activity in the United States in 1999-2002. *Am J Gastroenterol*. 2006;101: 76-82.
175. Pan JJ, Fallon MB. Gender and racial differences in nonalcoholic fatty live disease. *World J Hepatol*. 2014;6(5): 274-83.

176. Lallukka S, Sädevirta S, Kallio MT, Luukkonen PK, Zhou Y, Hakkarainen A et al. Predictors of Liver Fat and Stiffness in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) - an 11-Year Prospective Study. *Sci Rep.* 2017;7(1):14561.
177. Di Costanzo A, Pacifico L, Chiesa C, Perla FM, Ceci F, Angeloni A et al. Genetic and metabolic predictors of hepatic fat content in a cohort of Italian children with obesity. *Pediatr Res.* 2019;85(5): 671-677.
178. Idilman IS, Keskin O, Celik A, Savas B, Elhan AH, Idilman R et al. A comparison of liver fat content as determined by magnetic resonance imaging-proton density fat fraction and MRS versus liver histology in non-alcoholic fatty liver disease. *Acta Radiol.* 2016;57: 271-8.
179. Pacifico L, Martino MD, Catalano C, Panebianco V, Bezzi M, Anania C et al. T1-weighted dual-echo MRI for fat quantification in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2011;17: 3012-3019.
180. Kang GH, Cruite I, Shiehorteza M, Wolfson T, Gamst AC, Hamilton G et al. Reproducibility of MRI-determined proton density fat fraction across two different MR scanner platforms. *J Magn Reson Imaging.* 2011;34: 928-34.
181. Gu J, Liu S, Du S, Zhang Q, Xiao J, Dong Q et al. Diagnostic value of MRI-PDFF for hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a meta-analysis. *Eur Radiol.* 2019;29: 3564-3573.
182. Sun W, Cui H, Li N, Wei Y, Lai S, Yang Y et al. Comparison of FIB-4 index, NAFLD fibrosis score and BARD score for prediction of advanced fibrosis in adult patients with non-alcoholic fatty liver disease: A meta-analysis study. *Hepatol Res.* 2016;46(9): 862-870.
183. Wong VW. Predicting NASH response with liver fat: Are we back to square one? *J Hepatol.* 2020;72(3): 386-388.
184. Yang S, Zhong J, Ye M, Miao L, Lu G, Xu C, Xue Z, Zhou X. Association between the non-HDL-cholesterol to HDL-cholesterol ratio and non-alcoholic fatty liver disease in Chinese children and adolescents: a large single-center cross-sectional study. *Lipids Health Dis.* 2020;19(1):242.

185. Ryoo JH, Hong HP, Park SK, Ham WT, Chung JY. The Risk for Insulin Resistance according to the Degree of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Korean Men. *J Korean Med Sci.* 2016;31(11): 1761-1767.
186. Gonzalez-Cantero J, Martin-Rodriguez JL, Gonzalez-Cantero A, Arrebola JP, Gonzalez-Calvin JL. Insulin resistance in lean and overweight non-diabetic Caucasian adults: Study of its relationship with liver triglyceride content, waist circumference and BMI. *PLoS One.* 2018; 9;13(2):e0192663
187. Jin HB, Gu ZY, Yu CH, Li YM. Association of nonalcoholic fatty liver disease with type 2 diabetes: clinical features and independent risk factors in diabetic fatty liver patients. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2005;4(3):389-92.
188. Leite NC, Salles GF, Araujo AL, Villela-Nogueira CA, Cardoso CR. Prevalence and associated factors of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type-2 diabetes mellitus. *Liver Int.* 2009;29(1):113-9.
189. Razavizade M, Jamali R, Arj A, Talari H. Serum parameters predict the severity of ultrasonographic findings in non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2012;11(5):513-20.
190. Mousavi SRMM, Geramizadeh B, Anushiravani A, Ejtehad F, Anbardar MH, Moini M. Correlation between Serum Ferritin Level and Histopathological Disease Severity in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Middle East J Dig Dis.* 2018; 10(2): 90-95.
191. Amin RF, El Bendary AS, Ezzat SE, Mohamed WS. Serum Ferritin level, microalbuminuria and non-alcoholic fatty liver disease in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab Syndr.* 2019;13(3):2226-2229.
192. You G, Ding J, Shen J, Wang Y, Sun Y. Association between serum ferritin and non-alcoholic fatty liver disease among middle-aged and elderly Chinese with normal weight *Asia Pac J Clin Nutr.* 2019;28(4): 747-753.
193. Jeong DW, Lee HW, Cho YH, Yi DW, Lee SY, Son SM et al. Comparison of Serum Ferritin and Vitamin D in Association with the Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Korean Adults. *Endocrinol Metab.* 2014;29: 479-488.

194. Parikh P, Patel, J, Ingle M, Sawant P. Serum ferritin levels predict histological severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease in India. *Indian J Gastroenterol*. 2015; 34(3): 200–208.
195. Buzzetti E, Petta S, Manuguerra R, Luong TV, Cabibi D, Corradini E et al. Evaluating the association of serum ferritin and hepatic iron with disease severity in non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int*. 2019;39: 1325–1334.
196. Stefan N, Roden M. Diabetes and Fatty Liver. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2019; 127 (1): 93–96
197. Tilg H, Moschen A, Roden M. NAFLD and diabetes mellitus. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14(1):32-42.
198. Colca J. NASH (non-alcoholic steatohepatitis), diabetes, and macrovascular disease: multiple chronic conditions and a potential treatment at the metabolic root. *Expert Opin Investig Drugs*. 2020;29(2):191-196.
199. Gastaldelli A. Insulin resistance and reduced metabolic flexibility: cause or consequence of NAFLD? *Clin Sci (Lond)*. 2017;131(22):2701-2704
200. Hu M, Phan F, Bourron O, Ferré P, Fougelle F. Steatosis and NASH in type 2 diabetes. *Biochimie*. 2017; 143:37-41.
201. Sung KC, Seo DC, Lee SJ, Lee MY, Wild SH, Byrne CD. Non alcoholic fatty liver disease and risk of incident diabetes in subjects who are not obese. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2019;29(5):489-495
202. Singh SP, Singh A, Misra D, Misra B, Pati GK, Panigrahi MK et al. Risk Factors Associated With Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Indians: A Case–Control Study. *J Clin Exp Hepatol*. 2015; 5: 295–302.
203. Lomonaco R, Bril F, Ortiz-Lopez C, Orsak, B, Biernacki D, Lo M et al. Metabolic Impact of Nonalcoholic Steatohepatitis in Obese Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2016; 39(4): 632–638.
204. Lai LL, Yusoff WNIW, Vethakkan SR, Mustapha NRN, Mahadeva S, Chan W-K. Screening for non-alcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus using transient elastography. *J Gastroenterol Hepatol*. 2019;34(8):1396-1403.

205. Mantovani A, Byrne CD, Targher G, Bonora E. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Risk of Incident Type 2 Diabetes: A Meta-analysis. *Diabetes Care*. 2018;41: 372–382.
206. Lallukka S, Yki-Jarvinen H. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of type 2 diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2016;30(3):385-95.
207. Targher G, Lonardo A, Byrne CD. Nonalcoholic fatty liver disease and chronic vascular complications of diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2018;14(2):99-114.
208. Liu Z, Cordoba-Chacon J, Kineman RD, Cronstein BN, Muzumdar R, Gong Z et al. Growth Hormone Control of Hepatic Lipid Metabolism. *Diabetes*. 2016; 65: 3598–3609.
209. Marchisello S, Pino AD, Scicali R, Urbano F, Piro S, Purrello F, Rabuazzo AA. Pathophysiological, Molecular and Therapeutic Issues of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: An Overview. *Int J Mol Sci*. 2019; 20:8.
210. Komiya C, Tsuchiya K, Shiba K, Miyachi Y, Furuke S, Shimazu N et al. Ipragliflozin improves hepatic steatosis in obese mice and liver dysfunction in type 2 diabetes patients irrespective of body weight reduction. *Plos ONE*. 2016; 11(3)e0151511.
211. Takase T, Nakamura A, Miyoshi H, Yamamoto C, Atsumi T. Amelioration of fatty liver index in patients with type 2 diabetes on ipragliflozin: an association with glucose-lowering effects. *Endocr J*. 2017; 64 (3): 363-367.
212. Tabuche H, Maegawa H, Tobe K, Nakamura I, Uno S. Effect of ipragliflozin on liver function in Japanese type 2 diabetes mellitus patients: a subgroup analysis of the STELLA-LONG TERM study (3-month interim results). *Endocr J*. 2019;66(1): 31-41.
213. Inoue H, Morino K, Ugi S, Tanaka-Mizuno S, Fuse K, Miyazawa I et al. Ipragliflozin, a sodium–glucose cotransporter 2 inhibitor, reduces bodyweight and fat mass, but not muscle mass, in Japanese type 2 diabetes patients treated with insulin: A randomized clinical trial. *J Diabetes Investig*. 2019;10(4): 1012-1021.
214. Bolinder J, Ljunggren Os, Kullberg J, Johansson L, Wilding J, Langkilde AM et al. Effects of Dapagliflozin on Body Weight, Total Fat

- Mass, and Regional Adipose Tissue Distribution in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus with Inadequate Glycemic Control on Metformin. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(3): 1020 –1031.
215. The CANVAS Program Collaborative Group. Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med.* 2017;377(7):644-657.
216. Zinman B, Wanner C, Lachin JM, Fitchett D, Bluhmki E, Hantel S et al. Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med.* 2015; 373: 2117-2128.
217. DECLARE-TIMI 58 investigators. Dapagliflozin and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med.* 2019; 380(4): 347-357.
218. DAPA-HF Trial Committees and Investigators. Dapagliflozin in patients with heart failure and reduced ejection fraction. *N Engl J Med.* 2019; 381(21): 1995-2008.
219. Papatheodoridi A-K, Chrysavgis L, Koutsilieris M, Chatzigeorgiou A. The role of senescence in the development of nonalcoholic fatty liver disease and progression to nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2020;71(1): 363-374.
220. Aravinthan A, Scarpini C, Tachtatzis P, Verma S, Penrhyn-Lowe S, Harvey R et al. Hepatocyte senescence predicts progression in non-alcohol-related fatty liver disease. *J Hepatol.* 2013;58(3): 549-556.
221. O'Callaghan NJ, Fenech M. A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length. *Biol Proced Online.* 2011; 13:3.
222. Garvey WT, Van Gaal L, Leiter LA, Vijapur KU, List J, Cuddihy R et al. Effects of canagliflozin versus glimepiride on adipokines and inflammatory biomarkers in type 2 diabetes. *Metabolism.* 2019;85: 32-37.
223. Kuchay MS, Krishan S, Mishra SK, Farooqui KJ, Singh MK, Wasir JS et al. Effect of Empagliflozin on Liver Fat in Patients With Type 2 Diabetes and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Randomized Controlled Trial (E-LIFT Trial). *Diabetes Care.* 2018; 41: 1801–1808.
224. Cusi K, Bril F, Barb D, Polidori D, Sha S, Ghosh A et al. Effect of canagliflozin treatment on hepatic triglyceride content in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2019; 21(4):812-821.

225. Choi DH, Jung CH, Mok JO, Kim CH, Kang SK, Kim BY. Effect of dapagliflozin on alanine aminotransferase improvement in type 2 diabetes mellitus with non-alcoholic fatty liver disease. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2018;33(3):387-394.
226. Shimizu M, Suzuki K, Kato K, Jojima T, Iijima T, Murohisa T et al. Evaluation of the effects of dapagliflozin, a sodium-glucose co-transporter-2 inhibitor, on hepatic steatosis and fibrosis using transient elastography in patients with type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Obes Metab*. 2019;21: 285-292.
227. Eriksson JW, Lundkvist P, Jansson PA, Johansson L, Kvarnstrom M, Moris L et al. Effects of dapagliflozin and n-3 carboxylic acids on non-alcoholic fatty liver disease in people with type 2 diabetes: a double-blind randomised placebo-controlled study. *Diabetologia*. 2018;61(9): 1923-1934.
228. Tobita H, Sato S, Miyake T, Ishihara S, Kinoshita Y. Effects of Dapagliflozin on Body Composition and Liver Tests in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis Associated with Type 2 Diabetes Mellitus: A Prospective, Open-label, Uncontrolled Study. *Curr Ther Res Clin Exp*. 2017;87:13-19.
229. Arase Y, Shiraishi K, Anzai K, Sato H, Teramura E, Tsuruya K et al. Effect of Sodium Glucose Co-Transporter 2 Inhibitors on Liver Fat Mass and Body Composition in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Type 2 Diabetes Mellitus. *Clin Drug Investig*. 2019;39(7):631-641.
230. Lee PCH, Gu Y, Yeung MY, Fong CHY, Woo YC, Chow WS et al. Dapagliflozin and Empagliflozin Ameliorate Hepatic Dysfunction Among Chinese Subjects with Diabetes in Part Through Glycemic Improvement: A Single-Center, Retrospective, Observational Study. *Diabetes Ther*. 2018; 9: 285-295.
231. Dichtel LE, Cordoba-Chacon J, Kinemam RD. Growth Hormone and Insulin-like Growth Factor 1 Regulation of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2022;107(7):1812-1824.
232. Rizvi S, Raza ST, Mahdi F. Telomere length variations in aging and age-related diseases. *Curr Aging Sci*. 2014;7(3): 161-167.

233. Fasching CL. Telomere length measurement as a clinical biomarker of aging and disease. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2018;55(7):443-465.
234. Lulkiewicz M, Bajsert J, Kopczynski P, Barczak W, Rubis B. Telomere length: how the length makes a difference. *Mol Biol.* 2020;7(49): 7181-7188.
235. Guzzardi MA, Iozzo P, Salonen M, Kajantie E, Eriksson JG. Rate of telomere shortening and metabolic and cardiovascular risk factors: A longitudinal study in the 1934–44 Helsinki Birth Cohort Study. *Ann Med.* 2015;47(6): 499-505.
236. Cheng YY, Kao TW, Chang YW, Wu C-J, Peng T-C, Wu L-W et al. Examining the gender difference in the association between metabolic syndrome and the mean leukocyte telomere length. *PLoS ONE.* 2017;12(7): e0180687.
237. Wojcicki JM, Rehkopf D, Epel E, Rosenthal P. Shorter Leukocyte Telomere Length in Relation to Presumed Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mexican-American Men in NHANES 1999–2002. *Int J of Hepatology.* 2017; 2017:8435158.
238. Iglesias Molli AE, Panero J, Dos Santos PC, González CD, Vilariño J, Sereday M et al. (2017) Metabolically healthy obese women have longer telomere length than obese women with metabolic syndrome. *PLoS ONE.* 2017;12(4): 1-13.
239. Tzanetakou IP, Katsilambros NL, Benetos A, Mikhailidis DP, Perrea DN. "is obesity linked to aging?": Adipose tissue and the role of telomeres. *Ageing Res Rev.* 2012;11(2): 220-220.
240. Lin L, Qin K, Chen D, Lu C, Chen W, Guo VY. Systematic review and meta-analysis of the association between paediatric obesity and telomere length. *Acta Paediatr.* 2021;10(10): 2695-2703.
241. Mundstock E, Sarria EE, Zatti H, Mattos Louzada F, Kich Grun L, Herbert Jones M, Guma FT, Mazzola In Memoriam J, Epifanio M, Stein RT, Barbé-Tuana FM, Mattiello R. Effect of obesity on telomere length: Systematic review and meta-analysis. *Obesity (SilverSpring)* 2015;23(11): 2164-2174.
242. Shin HK, Park JH, Yu JH, Jin YJ, Suh YJ, Lee JW, Kim W; Korean Nonalcoholic Fatty Liver Study Group (KNSG). Association between

- telomere length and hepatic fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Sci Rep.* 2021;9(11): 118004.
243. Laish I, Mannasse-Green B, Hadary R, Biron-Shental T, Konikoff FM, Amiel A et al. Telomere Dysfunction in Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Cryptogenic Cirrhosis *Cytogenet. Genome Res.* 2016;150(2):93-99
244. Kim D, Li AA, Ahmed A. Leucocyte telomere shortening is associated with nonalcoholic fatty liver disease-related. *Liver Int.* 2018;38(10): 1839-1848.
245. Kirchner H, Shaheen F, Kalscheuer H, Schmid SM, Oster H, Lehnert H. The Telomeric Complex and Metabolic Disease. *Genes.* 2017;8(7): 1-13.
246. Tamura Y, Takubo K, Aida J, Araki A, Ito H. Telomere attrition and diabetes mellitus. *Geriatric Gerontol Int.* 2016;16(1): 66-74.
247. Rosa ECC, Santos RRC, Fernandes LFA, Neves FAR, Coelho MS, Amato AA. Leukocyte telomere length correlates with glucose control in adults with recently diagnosed type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2018;135: 30-36.
248. Ping F, Li ZY, Lv K, Zhou MC, Dong YX, Sun et al. Deoxyribonucleic acid telomere length shortening can predict the incidence of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Investig.* 2017;8: 174-180.
249. Dong K, Zhang Y, Huang J-J, Xia, S-S, Yang Y Shorter leucocyte telomere length as a potential biomarker for nonalcoholic fatty liver disease-related advanced fibrosis in T2DM patients. *Annals Transl Med.* 2020;8(6): 318-327.
250. Zhang M, Hu ML, Huang JJ, Xia SS, Yang Y, Dong K. Association of leukocyte telomere length with non-alcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes. *Chin Med J (Engl).* 2019;132(24):2927-2933.
251. Wang J, Dong X, Cao L, Sun Y, Qiu Y, Zhang Y et al. Association between telomere length and diabetes mellitus: A meta-analysis. *J Int Med Res.* 2016;44(6): 1156-1173.

252. Piplani S, Prabhu M, Alemao NN, Akash C, Ram P, Ambar S et al. Conventional Risk Factors, Telomere Length, and ischemic heart disease: Insights into the Mediation Analysis. *Genome Integr.* 2021;31(12): 1.
253. Prá D, Franke SI, Henriques JA, Fenech M. Iron and genome stability: an update. *Mutat Res.* 2012;733: 92-99.
254. Zhang MW, Zhao P, Yung WH, Sheng Y, Ke Y, Qian ZM. Tissue iron is negatively correlated with TERC or TERT mRNA expression: A heterochronic parabiosis study in mice. *Aging (Albany NY).* 2018; 10(12): 3834-3850.
255. Liu B, Sun Y, Xu G, Snetselaar LG, Ludewig G, Wallace RB, Bao W. Association between Body Iron Status and Leukocyte Telomere Length, a Biomarker of Biological Aging, in a Nationally Representative Sample of US Adults. *J Acad Nutr Diet.* 2019;119(4): 617-625.
256. Mainous AG 3rd, Wright RU, Hulihan MM, Twal WO, McLaren CE, Diaz VA, McLaren GD, Argraves WS, Grant AM. Telomere length and elevated iron: the influence of phenotype and HFE genotype. *Am J Hematol.* 2013;88(6): 492-496.

ANEXO 1

**PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE PATOS DE MINAS – MINAS GERAIS.**

FACULDADE PATOS DE MINAS/MG

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE INIBIDOR DE SGLT2 PARA ESTEATOSE HEPÁTICA GORDUROSA NÃO-ALCOÓLICA EM DIABÉTICOS E NÃO-DIABÉTICOS: ENSAIO CLÍNICO

Pesquisador: DEBORA GONCALVES

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 94388618.1.0000.8078

Instituição Proponente: CENTRO EDUCACIONAL HYARTE-ML LTDA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.984.312

Apresentação do Projeto:

O presente trabalho irá avaliar a importância do estudo clínico intervencionista randomizado controlado com placebo, cego, aberto, com inclusão de pacientes acima de 20 anos, diabéticos e não diabéticos, selecionados em clínica de Radiologia, a partir de resultados de ultrassonografia evidenciando esteatose hepática. A amostra será obtida de forma consecutiva em período suficiente para obter o tamanho amostral calculado para 160 pacientes (80 por grupo). Em cada grupo, tratamento e placebo, amostra será dividida em 40 pacientes diabéticos e 40 pacientes não diabéticos. O estudo seguirá as normas internacionais conforme estipuladas pela Declaração de Helsinki. Todos os pacientes receberão um termo de consentimento livre e esclarecido e, aqueles que aceitarem a participação, terão coletadas amostras séricas para dosagem de glicemia, insulina, hemoglobina glicada, ALT, AST, ferritina, HBsAg,

anti-HBS, anti-HCV, perfil lipídico e IGF-1. Os pacientes acima de 20 anos que apresentarem alteração em

Endereço: Av. Juscelino Kubitschek de Oliveira, no1220

Bairro: Cidade Nova

UF: MG **Município:** **Telefone:** (34)3818-2300

CEP: 38.706-401

Fax: (34)3818-2300 **E-mail:** cep@faculdadepatosdeminas.edu.br

PATOS DE MINAS

Página 01 de 06



FACULDADE PATOS DE MINAS/MG

Continuação do Parecer: 2.984.312

transaminases, com diabetes (glicemia em jejum acima de 126 mg/dL e hemoglobina glicada acima de 6,5%) ou sem diabetes (glicemia em jejum abaixo de 126 mg/dL e hemoglobina glicada abaixo de 6,5%) serão incluídos no estudo e serão submetidos RNM de abdome superior para determinação do conteúdo hepático de lipídeos. Entre os pacientes diabéticos serão incluídos aqueles com duração da doença superior a 6 meses (em tratamento) e inferior a dez anos, sem uso de terapia insulínica e em uso de apenas um anti-hiperglicemiante oral. Os critérios de exclusão serão: uso

de álcool > 60 gramas/dia em

10 anos para homens e > 20 gramas/dia para mulheres, hepatites virais B e C, HIV, drogas que prejudicam a beta-oxidação (metotrexate, amiodarona, tetraciclina, tamoxifeno, quimioterápicos), hepatite auto-imune, doenças biliares, distúrbios genéticos metabólicos, ferritina acima de 1000 mg/dL, infecção do trato urinário de repetição, diabéticos em uso de análogos de GLP-1 ou em terapia dupla oral. Dessa forma, 80 pacientes receberão ISGLT2 (dapaglifozina) e 80 pacientes receberão placebo por 12 meses. Os sujeitos serão avaliados trimestralmente com a realização dos exames laboratoriais solicitados rotineiramente para controle de esteatohepatite (transaminases hepáticas, GGT, glicemia, insulina, hemoglobina glicada, ferritina, perfil lipídico) e avaliação clínica para determinação do peso corporal, circunferência abdominal em centímetros e pressão arterial. Após 12 meses serão novamente submetidos a um segundo exame de RNM. O conteúdo hepático de gordura será determinado pela técnica gradiente-eco de desvio químico, primeiramente descrita

por Dixon. Segundo os autores do trabalho, a sensibilidade e a especificidade documentada para essa

Endereço: Av. Juscelino Kubitschek de Oliveira, no1220

Bairro: Cidade Nova

UF: MG **Município:** **Telefone:** (34)3818-2300

CEP: 38.706-401

Fax: (34)3818-2300 **E-mail:** cep@faculdadepatosdeminas.edu.br

PATOS DE MINAS

Página 02 de 06



FACULDADE PATOS DE MINAS/MG

Continuação do Parecer: 2.984.312

técnica é de cerca de 81 % e 100%.O tamanho da amostra planejada foi de 160 indivíduos, com atribuição igual a cada um dos dois grupos de estudo (80 por grupo). Nós estimamos que, com esse tamanho de amostral, o estudo terá 90% de poder para detectar uma diferença absoluta na taxa de melhora na esteatohepatite não alcoólica de 25 pontos percentuais, com teste de hipótese bicaudal (erro tipo 1) de 0,025. Esta taxa de melhora foi obtida a partir de estudo prévio com desenho semelhante (sujeitos comNAFLD, porém sem diabetes) em que foi investigado o efeito da pioglitazona sobre desfechos relacionados

à NAFLD (10).NAFLD e DM2 tem como característica um estado inflamatório crônico que tem sido associado ao processo mais conhecido de senescência celular, o encurtamento de telômeros. O estudo também avaliará se o encurtamento de telômeros. esta associado a doença hepática gordurosa nãoalcoólica por coleta de sangue periférico.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a eficácia clínica do ISGLT2 em pacientes diabéticos e não diabéticos portadores de DHGNA

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O presente trabalho apresenta riscos para os pacientes, entretanto, os pesquisadores estão assegurando terapias corretas para a intervenção, caso haja complicações referentes ao tratamento sugerido.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os autores realizaram todas as alterações necessárias.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos estão de acordo com o esperado.

Recomendações:

Enviar relatórios anuais em fevereiro de 2019, fevereiro de 2020 e final até Setembro de 2020.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Considero o projeto de acordo com o esperado podendo ser iniciado de acordo com o cronograma de execução.

Endereço: Av. Juscelino Kubitschek de Oliveira, no1220

Bairro: Cidade Nova

UF: MG **Município:** **Telefone:** (34)3818-2300

CEP: 38.706-401

Fax: (34)3818-2300 **E-mail:** cep@faculdadepatosdeminas.edu.br

PATOS DE MINAS

Página 03 de 06



FACULDADE PATOS DE MINAS/MG

Continuação do Parecer: 2.984.312

Considerações Finais a critério do CEP:

Data para entrega de Relatórios parciais ao CEP/FPM: fevereiro de 2019, fevereiro de 2020. Data para entrega de Relatório Final ao CEP/FPM: Setembro de 2020.

OBS.: O CEP/FPM LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

O CEP/FPM lembra que:

a- segundo a Resolução 466/12, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo Participante da pesquisa.

b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.

c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/FPM dá-se em decorrência do atendimento a Resolução CNS 466/12, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Orientações ao pesquisador :

- O Participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 466/12) e deve receber uma via original do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS 466/12), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante da pesquisa ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 466/12). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador

Endereço: Av. Juscelino Kubitschek de Oliveira, no1220

Bairro: Cidade Nova

UF: MG **Município:** **Telefone:** (34)3818-2300

CEP: 38.706-401

Fax: (34)3818-2300 **E-mail:** cep@faculdadepatosdeminas.edu.br

PATOS DE MINAS

Página 04 de 06



FACULDADE PATOS DE MINAS/MG

Continuação do Parecer: 2.984.312

deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res.251/97, item III.2.e).

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto. O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1120204.pdf	23/09/2018 15:56:27		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	DoutoradoDHGNAcompleto.docx	23/09/2018 15:56:04	DEBORA GONCALVES	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	DoutoradoDHGNAcomresposta.docx	23/09/2018 15:55:07	DEBORA GONCALVES	Aceito
Folha de Rosto	FolhaRISGLT2.docx	15/07/2018 21:15:27	DEBORA GONCALVES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEDGHNA.docx	01/07/2018 10:41:24	DEBORA GONCALVES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Juscelino Kubitschek de Oliveira, no1220**Bairro:** Cidade Nova**UF: MG Município: Telefone:** (34)3818-2300**CEP:** 38.706-401**Fax:** (34)3818-2300 **E-mail:** cep@faculdadepatosdeminas.edu.br

PATOS DE MINAS

Página 05 de 06



FACULDADE PATOS DE MINAS/MG

Continuação do Parecer: 2.984.312

PATOS DE MINAS, 26 de Outubro de 2018

Assinado por:**HUGO CHRISTIANO SOARES MELO (Coordenador(a))**

Endereço: Av. Juscelino Kubitschek de Oliveira, no1220**Bairro:** Cidade Nova**UF: MG Município: Telefone:** (34)3818-2300**CEP:** 38.706-401**Fax:** (34)3818-2300 **E-mail:** cep@faculdadepatosdeminas.edu.br

PATOS DE MINAS

Página 06 de 06

