

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS  
DA SAÚDE  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA CIRÚRGICA  
TESE DE DOUTORADO**

**LUCAS SPADARI MAGGIONI**

**A LIPOPEROXIDAÇÃO PLASMÁTICA COMO PREDITOR DE  
ESTEATOHEPATITE NÃO ALCOÓLICA EM OBESOS MÓRBIDOS COM  
DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA**

**PORTO ALEGRE  
2014**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA CIRÚRGICA  
NÍVEL: DOUTORADO

**A LIPOPEROXIDAÇÃO PLASMÁTICA COMO PREDITOR DE  
ESTEATOHEPATITE NÃO ALCOÓLICA EM OBESOS MÓRBIDOS COM  
DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA**

LUCAS SPADARI MAGGIONI

Tese de doutorado apresentada como requisito para obtenção do Grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Vontobel Padoin

PORTO ALEGRE

2014

M1931 Maggioni, Lucas Spadari Maggioni

A lipoperoxidação plasmática como preditor de esteatohepatite não alcoólica em obesos mórbidos com doença hepática gordurosa não alcoólica / Lucas Spadari Maggioni Porto Alegre: PUCRS, 2014.

100 f. il. : tab. Inclui artigo científico encaminhado para publicação.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Vontobel Padoin.

Tese (Doutorado) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Clínica Cirúrgica.

1 ESTRESSE OXIDATIVO. 2. OBESIDADE MÓRBIDA. 3. LIPOPEROXIDAÇÃO. 4. DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA. 6. ESTUDO TRANSVERSAL. I. Padoin, Alexandre Vontobel. II. Título.

Bibliotecária responsável: Isabel Merlo Crespo CRB 10/1201

*À minha esposa Júlia e à  
minha filha Laura, amores da  
minha vida, inspirações do  
meu dia e que me estimulam a  
buscar sempre o melhor.*

## AGRADECIMENTOS

- Ao meu orientador Dr. Alexandre Vontobel Padoin, pela parceria, disponibilidade e responsabilidade.
- Ao Dr. Claudio Corá Mottin, pelo estímulo científico, criação desta linha de pesquisa e auxílio no desenvolvimento e execução do projeto.
- Ao Dr. Henrique Sarubbi Filmann, pela contribuição e participação na elaboração e execução do projeto.
- À Dra. Norma Possa Marroni e ao Dr. Fábio Cangeri Di Naso, do Laboratório de Hepatologia e Fisiologia Experimental do HCPA, pela ajuda na análise do estresse oxidativo.
- Ao Dr. Aluisio de Castro Maciel, pela ajuda na interpretação dos exames histopatológicos
- À Daniela Benzano, pela ajuda e disponibilidade na realização da análise estatística.

## RESUMO

A patogênese da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) não está completamente esclarecida. Existem evidências cada vez maiores de que o estresse oxidativo participa desse processo. O objetivo do presente estudo é avaliar o papel de marcadores plasmáticos de estresse oxidativo em obesos mórbidos com DHGNA. Foram incluídos 43 obesos mórbidos submetidos ao *bypass* gástrico em *Y-de-Roux*, com biópsia hepática obtida durante a cirurgia. O estresse oxidativo plasmático foi mensurado por meio das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e ao superóxido dismutase (SOD). A análise histológica evidenciou NASH em 65,1% dos pacientes e esteatose simples em 34,9%. Os níveis plasmáticos de TBARS foram significativamente maiores nos pacientes com NASH, quando comparados aos com esteatose simples [1,65 (1,43-1,82) nM/ml vs 1,12 (1,04-1,42) nM/ml; P=0,002]. Houve correlação da TBARS com o *NAS score* ( $r_s = 0,470$ ; P=0,001). Entre os pacientes com NASH e esteatose simples, não houve diferença no status antioxidante plasmático medido pela SOD. Nossos achados sugerem que a lipoperoxidação plasmática está associada com a gravidade da DHGNA em obesos mórbidos.

**Palavras chaves:** Estresse oxidativo, obesidade mórbida, lipoperoxidação, doença hepática gordurosa não alcoólica.

## ABSTRACT

The pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is not completely elucidated. There is increasing evidence that oxidative stress is involved in this process. The objective of the present study was to evaluate the role of plasma markers of oxidative stress in morbidly obese patients with NAFLD. Forty-three morbidly obese patients were subjected to Roux-en-Y gastric bypass with a liver biopsy obtained during surgery. Plasma oxidative stress was measured by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and superoxide dismutase (SOD) assays. Histologic analysis showed NASH in 65.1% of patients and simple steatosis in 34.9%. The plasma TBARS levels were significantly greater in the patients with NASH when compared to those with simple steatosis [1.65 (1.43-1.82) nM/ml vs 1.12 (1.04-1.42) nM/ml;  $P=0.002$ ]. There was a correlation of TBARS with NAS score ( $r_s = 0.470$ ;  $P = 0.001$ ). Among the patients with NASH and simple steatosis, there was no difference in plasma antioxidant status measured by SOD. Our findings suggest that plasma lipid peroxidation is associated with the severity of NAFLD in the morbidly obese patients.

**Keywords:** Oxidative stress, obesity, fatty liver

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Células adiposas magras versus células adiposas gordas.....	21
<b>Figura 2.</b> Papel da obesidade na patogênese das doenças.....	24
<b>Figura 3.</b> Efeitos das Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio.....	39
<b>Figura 4.</b> Mecanismos que levam à disfunção hepatocitária, inflamação e fibrose na NASH.....	41
<b>Gráfico 1.</b> Comparação do grau de esteatose entre os pacientes com NASH versus esteatose isolada.....	55
<b>Gráfico 2.</b> Comparação do estágio de fibrose entre os pacientes com NASH versus esteatose isolada.....	55
<b>Gráfico 3.</b> Relação da lipoperoxidação plasmática (TBARS) com a DHGNA.....	56
<b>Gráfico 4.</b> Relação da lipoperoxidação plasmática (TBARS) com <i>NAS score</i> .....	57
<b>Gráfico 5.</b> Correlação da lipoperoxidação plasmática com <i>NAS score</i> .....	58
<b>Gráfico 6.</b> Atividade da SOD em relação à DHGNA.....	59
<b>Gráfico 7.</b> Atividade da SOD em relação ao <i>NAS score</i> .....	59



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classificação de peso pelo IMC.....	15
<b>Tabela 2.</b> Classificação de NASH. Escore de atividade.....	36
<b>Tabela 3.</b> Classificação de NASH. Escore de fibrose.....	36
<b>Tabela 4.</b> Características demográficas e antropométricas dos pacientes.....	52
<b>Tabela 5.</b> Análise das variáveis bioquímicas.....	53
<b>Tabela 6.</b> Análise das comorbidade.....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS

AASLD	Associação Americana para Estudo das Doenças do Fígado
AGL	Ácido Graxos Livres
ALT	Alanino Aminotransferase
Apo B	Apolipoproteína B
AST	Aspartato Aminotransferase
AUROC	Área sob a curva ROC
CYP 2E1	Citocromo P 450 2E1
DHGNA	Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica
DM 2	<i>Diabetes Mellitus 2</i>
FA	Fosfatase Alcalina
GGT	Gama Glutamil Transpeptidase
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
Hb A1C	Hemoglobina Glicada
HNE	4-hidroxi-nonenal
HOMA-IR	<i>Homeostatic Model Assesment – Insulin Resistance</i>
IL-1B	Interleucina 1B
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IMC	Índice de Massa Corporal
MCP-1	Proteína Quimiotóxica dos Macrófagos 1
MDA	Malondialdeído
NAS score	<i>NAFLD Activity Score</i>
NASH	<i>Nonalcoholic Steatohepatitis</i>
NF $\kappa$ β	Fator Nuclear $\kappa$ β
NHANES	Pesquisa Nacional de Saúde e Exame Nutricional
NOS	Espécies Reativas de Nitrogênio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Proteína C Reativa
RCQ	Relação Cintura Quadril
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
SOD	Superóxido dismutase
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
TBARS	Substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
TGs	Triglicerídios
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral $\alpha$

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	10
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1 OBESIDADE.....	15
2.1.1 Definição e Diagnóstico.....	15
2.1.2 Epidemiologia .....	17
2.1.3 Fisiopatogenia .....	19
2.1.4 Doenças associadas.....	23
2.1.5 Tratamento.....	24
2.2. DOENÇA HEPÁTICA GORDUOSA NÃO ALCOÓLICA.....	27
2.2.1 Definição .....	27
2.2.2 Epidemiologia .....	28
2.2.3 Fisiopatogênica .....	29
2.2.4 História Natural da DHGNA .....	32
2.2.5 Testes Diagnósticos.....	33
2.2.6 Tratamento.....	36
2.3 ESTRESSE OXIDATIVO.....	38
3. JUSTIFICATIVA .....	42
4. OBJETIVOS.....	43
4.1 OBJETIVO GERAL.....	43
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
5. PACIENTES E MÉTODOS .....	44
5.1 DELINEAMENTO.....	44
5.2 HIPÓTESE.....	44
5.3 PACIENTES .....	44
5.3.1 Critérios de Inclusão.....	45
5.3.2 Critérios de Exclusão .....	45
5.4 MÉTODOS.....	45
5.4.1 Análise sérica.....	46
5.4.2 Definição de comorbidades.....	46
5.4.3 Estresse Oxidativo.....	47
5.4.3.1 Medida das Substâncias que Reagem ao Acido Tiobarbitúrico (TBARS) .....	47

5.4.3.2 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD) .....	48
5.4.4 Análise histológica .....	49
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
5.6 ASPECTOS ÉTICOS .....	50
6. RESULTADOS .....	52
6.1 Pacientes .....	52
6.2 Análise das variáveis bioquímicas .....	52
6.3 Relação da DHGNA com as comorbidades .....	54
6.4 Análise Histológica.....	54
6.5 Análise Lipoperoxidação Plasmática (TBARS).....	55
6.6 Análise da atividade da Superóxido Dismutase (SOD) .....	58
7. DISCUSSÃO .....	60
8. CONCLUSÕES .....	69
9. BIBLIOGRAFIA.....	70
ANEXOS .....	86

## 1. INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença de alta prevalência, com crescimento importante desde a década de oitenta, atingindo *status* de epidemia.<sup>1</sup> Considerada anteriormente um problema de países desenvolvidos e ocidentais, a epidemia da obesidade se difundiu e atingiu as diversas etnias.<sup>2</sup>

O aumento do tecido adiposo, fundamentação biológica da obesidade, leva a alterações importantes em suas funções.<sup>3</sup> As consequências dessas alterações são uma série de doenças crônicas, como *diabetes mellitus*, hipertensão, cardiopatia e doença cerebrovascular.<sup>4</sup> A obesidade também está associada a uma série de doenças digestivas, incluindo doença do refluxo gastroesofágico, câncer colorretal e a doença hepática gordurosa não alcoólica.<sup>5-7</sup>

A doença hepática gordurosa não alcoólica é um termo abrangente para a histopatologia do fígado, que compreende um espectro amplo de doenças, desde a esteatose simples até esteatohepatite não alcoólica e suas consequências, como fibrose hepática, cirrose e carcinoma hepatocelular.<sup>8</sup> O aumento da prevalência da obesidade e *diabetes mellitus* na população fez com que a doença hepática gordurosa não alcoólica se tornasse a doença hepática mais prevalente, com uma previsão de que, em 5 anos, torne-se a principal causa de transplante hepático.<sup>9</sup>

As intervenções eficazes no tratamento da doença hepática gordurosa não alcoólica são medidas que promovam estilos de vida mais saudáveis, objetivando a perda de peso sustentada, porém com pouca efetividade a longo prazo.<sup>10</sup> Nenhum tratamento farmacológico foi estabelecido para a DHGNA.<sup>11</sup> A cirurgia bariátrica, por outro lado, tem demonstrado melhora consistente da esteatose e da fibrose em pacientes obesos mórbidos.<sup>12</sup>

Faz-se necessário, desse modo, o conhecimento dos mecanismos fisiopatogênicos envolvidos na gravidade e progressão da DHGNA, possibilitando assim o desenvolvimento de tratamentos mais efetivos.

O estresse oxidativo, estado em que o equilíbrio redox tissular ou celular é alterado para um ambiente mais oxidante, traz, como consequência, modificações químicas irreversíveis de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos.<sup>13</sup> As alterações celulares levam à morte de hepatócitos, inflamação e ativação de células estreladas, podendo estar envolvidas na gênese da DHGNA.<sup>14</sup>

Existem poucos estudos que avaliaram o papel do estresse oxidativo na doença hepática gordurosa não alcoólica em pacientes obesos mórbidos.<sup>15-17</sup>

Diante do apresentado, o presente estudo tem como objetivo avaliar o estresse oxidativo em pacientes obesos mórbidos que foram submetidos à cirurgia bariátrica e demonstrar a associação entre o estresse oxidativo e a gravidade da doença hepática gordurosa não alcoólica.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 OBESIDADE

#### 2.1.1 Definição e Diagnóstico

A obesidade é definida com uma condição de excesso de gordura corporal que está associada a consequências adversas na saúde, e determinou-se um índice de massa corporal (IMC) igual ou maior a 30 kg/m<sup>2</sup> para realizar seu diagnóstico. Essa classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS)<sup>18</sup> baseia-se em padrões internacionais desenvolvidos para pessoas adultas descendentes de europeus, e, apesar de ser um indicador de fácil aplicação, não se correlaciona totalmente com a gordura corporal (Tabela 1).<sup>19</sup>

**Tabela 1** – Classificação de peso pelo IMC

<b>CLASSIFICAÇÃO</b>	<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>
Peso Baixo	<18,5
Peso Normal	18,5 – 24,9
Sobrepeso	25 – 29,9
Obesidade leve (grau I)	30 – 34,9
Obesidade moderada (grau II)	35 – 39,9
Obesidade mórbida (grau III)	≥ 40
Superobesidade	≥ 50

Adaptado de: Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a World Health Organization Consultation, 2000. WHO Obesity Technical Report Series, n.284.

O IMC não distingue a massa gorda da massa magra, podendo ser pouco estimado em indivíduos mais velhos, devido à sua perda de massa magra e consequente diminuição de peso, e superestimado em indivíduos musculosos.<sup>20</sup> A distribuição da gordura corporal, importante fator de risco para doenças associadas à obesidade, independentemente da gordura corporal total, não é avaliada por esse índice, ainda que indivíduos com o mesmo

IMC possam ter níveis diferentes de gordura visceral.<sup>21,22</sup> O IMC também não considera as diferenças étnicas e populacionais, que apresentam proporções corporais diversas.<sup>20</sup>

Pelos motivos citados acima, são necessários o diagnóstico correto da obesidade e a identificação de diferentes níveis de risco, utilizando ferramentas que possam quantificar, de alguma forma, a gordura corporal e sua distribuição.

O exame padrão ouro para diagnóstico de obesidade, no passado, era o peso submerso ou hidrostático. Recentemente, técnicas de imagem, como ressonância magnética, tomografia computadorizada e absorciometria com raios-X de dupla energia, que são capazes de mensurar com grande acurácia a gordura corporal total e sua distribuição, se tornaram os métodos mais precisos, porém o alto custo e a impossibilidade de disponibilizá-los em grande escala restringiram o seu uso na prática clínica.<sup>23-25</sup>

Para analisar a massa de gordura corporal e sua distribuição, têm sido amplamente utilizados métodos alternativos, mais acessíveis e menos dispendiosos:

- Pregas cutâneas: utilizadas como indicador de obesidade, pois há relação entre a gordura localizada nos depósitos do subcutâneo e a gordura visceral, porém a baixa reprodutibilidade desse método é a grande limitação;<sup>26</sup>

- Bioimpedância: método acurado, reprodutível e seguro para avaliação da composição corporal;<sup>27</sup>

- Relação circunferência abdominal/quadril (RCQ): já foi a medida mais usada para avaliação da obesidade central, entretanto, verificou-se que, após o emagrecimento, pode ocorrer erro, já que há redução da medida do quadril.<sup>28</sup> A OMS considera a RCQ um dos critérios para diagnóstico da síndrome metabólica, com valores de corte de 0,90 para homens e 0,85 para mulheres;<sup>29,30</sup>

- Circunferência abdominal: maior relação com a gordura visceral que a RCQ e também boa relação com a gordura corporal total. A OMS estabelece como pontos de



coorte da circunferência abdominal 94 cm para homens e 80 cm para mulheres caucasianas.<sup>31</sup>

O diagnóstico da obesidade e sua avaliação, devido às vantagens e limitações de cada método, sempre deve ser multimodal, permitindo assim o correto diagnóstico da alteração da gordura corporal e suas consequências.

### **2.1.2 Epidemiologia**

A obesidade é uma condição epidêmica atualmente. Antes, considerada um problema de países desenvolvidos e ocidentais, tem sua prevalência aumentada, em grande escala, nas diversas etnias.<sup>2</sup>

A OMS monitoriza a prevalência de obesidade no mundo por meio de seu banco de dados de IMC e estimou que, em 2008, aproximadamente 1,4 bilhão de pessoas apresentavam sobrepeso, sendo que, desses, ao menos 500 milhões de adultos eram obesos e que ao menos 40 milhões de crianças menores de 5 anos tinham sobrepeso. Desde 1980, o número de obesos duplicou no mundo, e há uma projeção da própria OMS para 2015, com aproximadamente 2,3 bilhões de adultos com sobrepeso e mais de 700 milhões de obesos.<sup>1</sup> Há uma variação muito grande na prevalência de sobrepeso e obesidade entre as diversas nações.<sup>2</sup>

Em estudo de Kelly e cols. em 2008, após extensa revisão dos dados disponíveis, verificou-se que 23,2% da população mundial apresentava sobrepeso e 9,8% da população era obesa. A prevalência de obesidade era maior nas grandes economias do mundo e a mais baixa na Índia. Em relação ao sexo, a prevalência da obesidade era consistentemente maior em mulheres em todas as regiões. Não foi encontrada relação entre obesidade e idade.<sup>32</sup>

As previsões mais conservadoras, que consideram apenas o aumento populacional das regiões urbanizadas, estimam um aumento de 45% na prevalência de obesidade para 2030, sendo que, nos países em desenvolvimento, há uma expectativa de que esse aumento possa chegar a 263%.<sup>32</sup>

Em estudo publicado em 2012, Flegal e colaboradores<sup>33</sup> estimaram, por meio da Pesquisa Nacional de Saúde e Exame Nutricional (NHANES), prevalência de excesso de peso em 68,8% da população americana adulta; desses, 35,7% apresentam obesidade e 6,3% com  $IMC \geq 40 \text{ kg/m}^2$ .

Há previsão de que, nas próximas duas décadas, ocorra um aumento de 33% na prevalência de obesidade na população americana, com 9% apresentando obesidade severa ( $IMC \geq 40 \text{ kg/m}^2$ ). Haverá um acréscimo de custo em gastos com saúde de 550 bilhões de dólares.<sup>34</sup> Para os sistemas de saúde, os indivíduos obesos custam 30% mais do que indivíduos eutróficos.<sup>35</sup>

No Brasil, a realidade não é diferente. A obesidade passou de 10,8% da população adulta em 2006 para 13,5% em 2009.<sup>36</sup> Últimos dados brasileiros, de 2013, indicam que 51% da população apresenta excesso de peso, desses, 17% são obesos, com maior prevalência no sexo masculino. Em Porto Alegre, a prevalência é ainda maior, com 55% das pessoas apresentando excesso de peso e 20% com obesidade.<sup>37</sup>

As causas para o aumento epidêmico da obesidade são, sem dúvida, os fatores ambientais. Há um claro desequilíbrio entre a ingesta calórica e o gasto de energia. A análise da ingesta alimentar dos quatro NHANES consecutivos confirmou essa tendência.<sup>38</sup> O uso crescente de automóveis como meio de locomoção e o aumento do número de horas gastos em frente à televisão também tiveram relação proporcional à obesidade. Estima-se que, para cada hora adicional de televisão assistida, há um aumento de 2% na prevalência de obesidade.<sup>39</sup>

### 2.1.3 Fisiopatogenia

A fundamentação biológica da obesidade é o aumento do tecido adiposo. Anteriormente considerado como uma massa inerte de armazenamento de energia, hoje se sabe que é um órgão complexo, com importantes funções fisiológicas e metabólicas, como a secreção de proteínas envolvidas na inflamação, na regulação do apetite e no controle energético.<sup>40,41</sup>

A formação do tecido adiposo inicia durante a vida intrauterina, originário do mesoderma. Existem dois tipos distintos de tecido adiposo: o tecido adiposo branco, que tem como função armazenamento de energia, e o tecido adiposo marrom, que participa da termogênese.<sup>40</sup>

O tecido adiposo marrom se desenvolve antes do nascimento. Sua função é de geração de calor através da oxidação dos ácidos graxos. A geração de calor por esse tecido adiposo permite a termorregulação e também a dissipação do excesso de calorias, mantendo, desse modo, o equilíbrio calórico e o peso corporal.<sup>42</sup>

A formação do tecido adiposo branco ocorre após o nascimento.<sup>43</sup> Ele é especializado em armazenar energia, fornecendo substrato para outros tecidos, como os músculos, durante períodos de jejum ou de necessidade de aumento da demanda energética.<sup>44</sup>

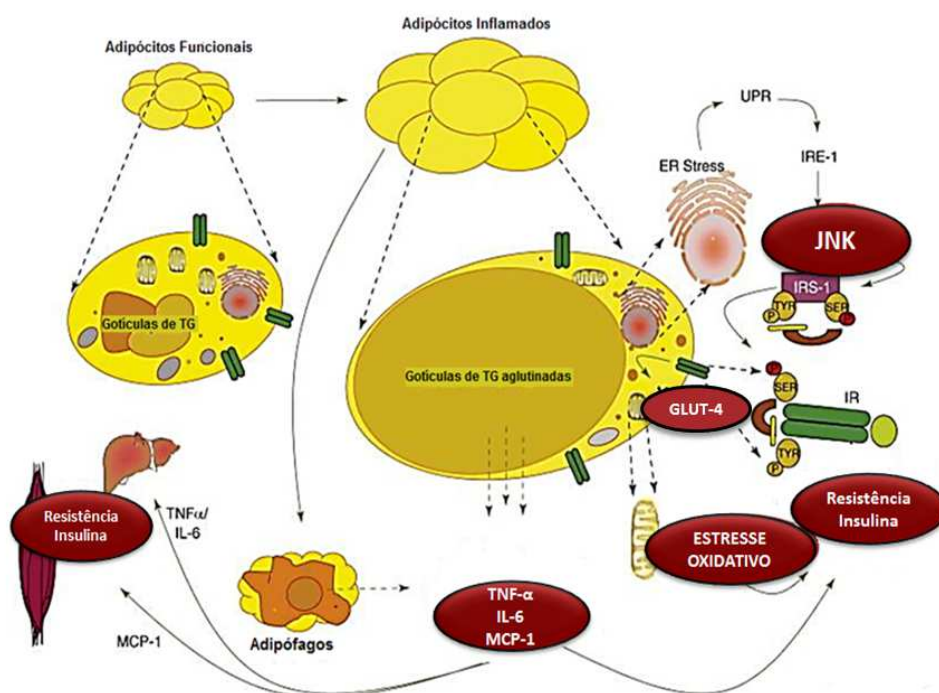
Nos adultos, a expansão do tecido adiposo branco se dá tanto por hipertrofia quanto por hiperplasia. Como os adipócitos maduros perderam sua capacidade de divisão, a hiperplasia ocorre através da diferenciação de células precursoras derivadas das células tronco mesenquimais pluripotentes.<sup>45,46</sup> Com o aumento do tecido adiposo, sua função fica danificada e é afetada pela inflamação tecidual e por propriedades metabólicas aberrantes, levando à iniciação e progressão das doenças associadas à obesidade.<sup>47,48</sup>

Os adipócitos brancos são células secretórias, liberando uma variedade de lipídios e proteínas em adição aos ácidos graxos que são mobilizados na lipólise.<sup>49,50</sup> A secreção de lipídios inclui colesterol, prostaglandinas, endocanabinoides, tocoferol, vitamina D e glicocorticoides.<sup>42</sup> Vários hormônios são sintetizados e secretados também pelos adipócitos, sendo os mais proeminentes a leptina e a adiponectina.<sup>51</sup>

A adiponectina e a leptina são hormônios produzidos primariamente pelo tecido adiposo. Os níveis séricos de leptina apresentam estreita relação com o IMC e gordura corporal, já que apresentam função de aumento de apetite, angiogênese e secreção de insulina.<sup>52,53</sup> A adiponectina, por outro lado, apresenta atividade antiinflamatória e sensibilizante à insulina.<sup>54,55</sup> Esses dois hormônios são parte de uma grande família de proteínas e fatores liberados pelos adipócitos denominados adipocinas.

Já foram identificadas mais de 100 adipocinas. Elas apresentam uma grande variedade de funções metabólicas, incluindo regulação do apetite, sensibilidade à insulina, angiogênese, regulação da pressão arterial, homeostase vascular, resposta imunológica e inflamação. Os adipócitos secretam grande quantidade de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ),<sup>56</sup> interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8) e a proteína 1 quimiotática dos macrófagos (MCP-1)<sup>57,58</sup>, e o próprio tecido adiposo é responsável pelo manejo da resposta corporal à insulina (figura 1).<sup>59,60</sup>

A questão central na biologia do adipócito é o porquê de, na obesidade, haver aumento na produção e liberação dessas adipocinas. A teoria inicial de que o aumento do tecido adiposo faz com que o mesmo se torne hipóxico e, como consequência, se desenvolva um estado inflamatório tecidual, baseia-se no fato de não ocorrer aumento proporcional do débito cardíaco e do fluxo sanguíneo tecidual. Não há fluxo sanguíneo adicional no tecido adiposo do paciente obeso no período pós prandial, e a formação de adipócitos gigantes, que ultrapassam a capacidade de difusão do oxigênio tecidual, potencializa a isquemia.<sup>42</sup>



**Figura 1: Células adiposas “magras” versus células adiposas “gordas”.** Adipócitos funcionais são os principais reguladores da homeostase da glicose com grande quantidade de receptores de insulina e GLUT-4 na superfície. Elas também depositam triglicerídeos com fonte de energia. Quando há uma sobrecarga de triglicerídeos, entretanto, eles se tornam uma fonte de adipocinas. Adicionalmente a sobrecarga lipídica inicia estresse mitocondrial e do retículo endoplasmático com geração de espécies reativas de oxigênio. Modificado de Drug Discovery Today.<sup>61</sup>

Outra teoria se baseia na alteração do microbioma intestinal. A obesidade está associada a elevados níveis plasmáticos de lipopolissacarídeos bacterianos, como consequência de uma alteração da permeabilidade intestinal causada pelo alta ingestão de dietas ricas em gorduras, além da translocação de bactérias intestinais para os tecidos do hospedeiro. Essas alterações levam à inflamação do tecido adiposo, refletindo-se no aumento sérico de citocinas inflamatórias e adipocinas, com consequente hiperglicemia e hiperinsulinemia.<sup>62</sup>

O estresse oxidativo também parece participar da alteração do tecido adiposo do obeso. As espécies reativas de oxigênio são capazes de agir como moléculas sinalizadoras, além de causar dano a proteínas, lipídios e ácidos nucleicos celulares. O dano do tecido

adiposo causado pelas ROS desencadearia o aumento da síntese e secreção das adipocinas, resultando num ambiente pró-inflamatório.<sup>63</sup>

Uma das principais alterações do tecido adiposo é a resistência à insulina, que apresenta várias consequências metabólicas. Randle e colaboradores,<sup>64</sup> mostraram a teoria dos ácidos graxos livres e resistência à insulina: uma relação inversamente proporcional entre ácidos graxos não esterificados plasmáticos e tolerância à glicose. Estudos prospectivos confirmaram posteriormente tal hipótese, demonstrando que o nível elevado de ácidos graxos livres era preditor de aumento da resistência à insulina.<sup>65</sup> Quando os ácidos graxos livres estão elevados, ocorre redução de 50% na síntese de glicogênio muscular, oxidação de glicose corporal e inibição da captação de glicose, resultando no estado de resistência à insulina,<sup>66</sup> quadro semelhante ao que ocorre em indivíduos obesos e diabéticos.<sup>67,68</sup>

A gordura visceral representa um poderoso fator de risco à resistência à insulina. Os adipócitos do abdômen são resistentes à ação antilipolítica da insulina e, com o aumento da lipólise, ácidos graxos livres são liberados na veia porta, expondo o fígado a altos níveis de lipídios.<sup>69</sup> Esse aumento de gordura, por consequência, acaba transformando tecidos que originalmente são insulino-sensíveis, como fígado, pâncreas e músculo esquelético, em tecidos insulino-resistentes.<sup>70</sup>

O estado pró inflamatório gerado pelo tecido adiposo acabará gerando estresse do retículo endoplasmático, que alterará a produção de proteínas e levará à apoptose celular, mais inflamação e resistência à insulina<sup>71</sup> e aumentará a produção de espécies reativas de oxigênio pela mitocôndria, que desencadeará um influxo de energia maior nessas células, aumentando a produção de ácidos graxos livres e, conseqüentemente, elevando ainda mais a resistência à insulina.<sup>72</sup>

Todas as alterações na fisiologia do tecido adiposo citadas acabam originando as doenças associadas à obesidade, que trarão grandes consequências na morbimortalidade desses pacientes.

#### **2.1.4 Doenças associadas**

A obesidade acarreta um risco aumentado de inúmeras doenças crônicas, como DM, dislipidemia, doenças cardíacas e cerebrovasculares, doenças articulares degenerativas, neoplasias, apneia do sono e doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). Pacientes com obesidade severa (obesidade mórbida) têm esse risco magnificado, com aumento expressivo da morbimortalidade (Figura 2).<sup>73</sup>

De acordo com a OMS, 44% da incidência de diabetes e 23% da incidência de cardiopatia isquêmica são atribuíveis à obesidade. Metanálises recentes<sup>74-76</sup> demonstraram que a obesidade aumenta o risco e a progressão de certos tipos de câncer e o desenvolvimento de doenças crônicas, diminuindo a qualidade de vida e sobrevida.<sup>77</sup> Dependendo do tipo de câncer, de 7 a 41% dos casos são atribuídos à obesidade como principal fator. Incluem-se nesses cólon, fígado, mama, endométrio, pâncreas e rim.<sup>78</sup>

Estudo de Kress e colaboradores, em 2005, demonstrou uma prevalência de 62% de hipertensão, 48% de dislipidemia, 40% de osteoartrite, 34% de DM e 13% de doença cardiovascular em obesos mórbidos americanos. Há um aumento de 7,15 vezes no risco de ser diabético e de 3,49 vezes de ser hipertenso na população obesa mórbida, quando comparados a pacientes eutróficos, sendo que apenas 18% dos obesos classe 2 e 3 não apresentam comorbidades.<sup>79</sup>



**Figura 2: Papel da obesidade na patogênese das doenças.** A obesidade está relacionada com uma série de doenças que levam ao decréscimo da qualidade e da expectativa de vida. Modificado de *Drug Discovery Today*.<sup>73</sup>

Outro estudo americano verificou um aumento no risco de desenvolver insuficiência cardíaca congestiva de 5,6 vezes, duas vezes no risco de acidente vascular encefálico isquêmico e 4,3 vezes no risco de tromboembolismo pulmonar.<sup>80</sup>

O NHANES demonstrou um aumento de 1100% na prevalência de DM em obesos mórbidos com idade entre 30 e 49 anos. Além disso, constatou um risco 4 vezes maior de síndrome metabólica nesse grupo.<sup>81</sup>

Pela importância das consequências clínicas da obesidade, é fundamental o desenvolvimento de estratégias de prevenção e tratamento nesses pacientes, melhorando, desse modo, a saúde e a qualidade de vida da população.

### 2.1.5 Tratamento

O tratamento da obesidade varia de medidas comportamentais, como atividade física e reeducação alimentar, à terapia medicamentosa e procedimentos cirúrgicos.



O tratamento básico para obesidade é a reeducação alimentar com redução da ingestão calórica. Sugere-se uma dieta planejada para criar um déficit de 500 a 1000 kcal por dia, levando a uma diminuição média de 0,5 a 1 kg por semana. Revisão sistemática sobre a efetividade a longo prazo desse tratamento evidenciou uma diminuição média de peso de 11 kg, porém com sucesso de apenas 15% na manutenção do peso. Quando se associou a dieta a outras terapias, a manutenção a longo prazo foi maior, chegando a 27% de sucesso na terapia comportamental associada.<sup>82</sup>

A atividade física isolada, independente do tipo de exercício e frequência, não se mostra eficaz na perda de peso; porém, quando associada à reeducação alimentar, além de induzir a uma maior perda de peso, contribui substancialmente para a manutenção do mesmo.<sup>83,84</sup>

O tratamento medicamentoso está indicado quando houver falha no tratamento não farmacológico. No Brasil, há cinco medicamentos registrados para o tratamento da obesidade: anfepramona, femproporex, mazindol, sibutramina e orlistate.

A anfepramona, um agente catecolaminérgico, que age no sistema nervoso central (SNC) inibindo a fome, tem se mostrado eficaz no tratamento da obesidade, com redução de peso corporal superior ao placebo (9,8% vs 3,1%).<sup>85</sup> Entretanto, apresenta efeitos adversos relacionados à ação noradrenérgica, como insônia, cefaleia, irritabilidade e euforia,<sup>86</sup> além do risco de dependência química.<sup>87</sup>

O femproporex, também apresenta ação catecolaminérgica, porém com poucos estudos controlados sobre seu uso e efetividade e com efeitos adversos e riscos semelhantes à anfepramona.<sup>88</sup>

O mazindol, um derivado tricíclico que tem ação no SNC, bloqueando a receptação da noradrenalina, se mostrou eficaz no tratamento da obesidade. Ensaio clínico duplo cego versus placebo, em pacientes obesos e diabéticos, evidenciou redução maior de peso,

22,3% versus 9,8% do peso corporal.<sup>89</sup> Apesar de efetivo, não existem estudos de segurança cardiovascular, limitando muito seu uso.

A sibutramina é um inibidor da recaptção da serotonina com efeitos noradrenérgicos, apresentando assim efeitos anorexígenos e sacietógenos. Tem se mostrado efetiva a longo prazo, com grande superioridade ao placebo na perda de peso, além de melhorar os parâmetros da síndrome metabólica.<sup>90-92</sup> Não há uma incidência grande de efeitos adversos com essa medicação, porém, em pacientes com história de doença cardiovascular, houve aumento de eventos cardiológicos.<sup>93</sup>

Por último, o orlistate, um inibidor das lipases pancreáticas, que age reduzindo a absorção de gorduras em 30%. Mostrou-se eficaz na perda do peso,<sup>94</sup> reduzindo o risco de desenvolver DM2 em 37%.<sup>95</sup> Apresenta, como efeitos adversos, sintomas gastrointestinais e o risco de deficiência de vitaminas lipossolúveis, além de apresentar várias interações medicamentosas.<sup>95</sup>

Diante das evidências da baixa efetividade da dieta e mudanças comportamentais e dos efeitos adversos associados à escassez de estudos das drogas na diminuição do peso a longo prazo, a cirurgia bariátrica assumiu papel relevante para o tratamento da obesidade mórbida.

Em 2007, Adams e colaboradores<sup>96</sup> publicaram uma grande coorte retrospectiva, composta por 7925 obesos submetidos ao *bypass* gástrico e 7925 obesos que realizaram tratamento clínico, evidenciando uma diminuição de mortalidade geral em 40%, após um seguimento médio de 7 anos, no grupo cirúrgico, sendo uma redução de 56% por doenças coronarianas, 92% por DM e 60% por câncer, embora houvesse um aumento de 56% na mortalidade por causas externas como acidentes e suicídio.

Mais recentemente, dois estudos randomizados demonstraram a eficácia da cirurgia bariátrica na remissão do DM 2 em pacientes obesos mórbidos submetidos ao *bypass* gástrico e diversão biliopancreática, 75% e 95% em dois anos, respectivamente,<sup>97</sup>

além de melhor controle da hemoglobina glicada (Hb A1C  $\leq$ 6,0%), 12% no grupo do tratamento clínico versus 42% do grupo cirúrgico.<sup>98</sup>

## **2.2. DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA**

### **2.2.1 Definição**

A DHGNA é um termo abrangente para a histopatologia do fígado, que compreende um espectro de doenças, indo desde a esteatose simples até a esteatohepatite não alcoólica (NASH) e suas consequências, como a fibrose hepática em diferentes estágios, cirrose e carcinoma hepatocelular.<sup>99</sup> Foi reconhecida pela primeira vez em 1930, clinicamente aceita em 1950 e caracterizada histopatologicamente em 1980.<sup>100</sup>

A DHGNA é caracterizada histologicamente por esteatose hepática macrovesicular, e ocorre em indivíduos que não consomem álcool em quantidades consideradas danosas ao fígado (140 gramas de álcool por semana para homens e 70 gramas por semana para mulheres),<sup>101</sup> na ausência de outras doenças hepáticas crônicas.<sup>102-104</sup>

Um fígado saudável não deposita triglicerídeos de maneira substancial, definindo assim como um aumento da gordura hepática um nível igual ou maior a 5,5%, como demonstrado por Browning e colaboradores<sup>105</sup>, que verificaram, por meio da realização de ressonância nuclear magnética com espectroscopia, o nível normal de triglicerídeos no fígado de indivíduos saudáveis não obesos.

### 2.2.2 Epidemiologia

A DHGNA é uma das condições mais prevalentes na hepatologia devido ao aumento da prevalência de obesidade e DM, além do estilo de vida e alimentação da população ocidental.<sup>106</sup>

A prevalência combinada de hepatite C, hepatite B e álcool corresponde a apenas 20% das pessoas com elevação da alaninoaminotransferase (ALT), subentendendo-se que a DHGNA seja a principal causa de doença hepática crônica atualmente.<sup>107</sup>

A prevalência da DHGNA aumenta com a idade e varia entre as diferentes populações estudadas e o método de avaliação.

Alguns grupos estão sob risco aumentado, como os pacientes com DM 2, entre os quais, por estudo abdominal ultrassonográfico, há uma prevalência de esteatose de ao menos 50%<sup>108</sup> e pacientes obesos mórbidos com uma prevalência de DHGNA de até 93%, NASH em torno de 30% e fibrose hepática avançada de 2 a 9%.<sup>16,109,110</sup>

O estudo italiano Dionysos, que investigou a prevalência da DHGNA na população geral por meio da ultrassonografia, achou resultados similares em indivíduos com ou sem suspeita de doença hepática, 25% versus 20%. Esse estudo também demonstrou que nem sempre a DGHNA está associada a alterações da ALT ou da gama-glutamil transpeptidase (GGT) e que sua presença é mais provável em pessoa com obesidade, hiperglicemia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia e hipertensão arterial sistólica, todos componentes da síndrome metabólica.<sup>111,112</sup>

Na Europa, estima-se que aproximadamente 20 a 30% da população apresente DHGNA.<sup>113</sup> Nos países orientais, há uma prevalência em torno de 15%<sup>114</sup> e, nos Estados Unidos, entre 10 e 35%.<sup>115</sup>

Apesar da variação entre os estudos epidemiológicos, acredita-se que a prevalência da DHGNA seja subestimada. Sabe-se que 40% dos casos de cirrose criptogênica são secundários à DHGNA <sup>107</sup>, e há uma estimativa de que, na próxima década, ela ultrapasse o vírus da hepatite C como principal causa de cirrose e transplante hepático.<sup>116</sup>

### 2.2.3 Fisiopatogênia

A patogênese da DHGNA/NASH não é completamente entendida, porém muito progresso tem sido feito na última década.<sup>117</sup>

A teoria inicial foi baseada na hipótese dos dois “*hits*”. O primeiro *hit* seria o acúmulo de triglicerídeos hepático, aumentando a suscetibilidade do fígado à injúria mediada por um segundo *hit*, como citocinas e adipocinas inflamatórias, disfunção mitocondrial e estresse oxidativo, que acabariam levando à esteatohepatite e à fibrose.<sup>118,119</sup> Entretanto, há um reconhecimento cada vez maior do papel dos ácidos graxos livres (AGL), que poderiam promover dano hepático direto, levando à modificação dessa teoria.

Na obesidade e na resistência à insulina, há um influxo crescente de ácidos graxos livres no fígado que, por meio da B-oxidação ou esterificação, formarão triglicerídeos, levando ao acúmulo de gordura hepática. Existe evidência substancial de que esses AGL podem causar toxicidade direta, aumentando o estresse oxidativo e ativando vias inflamatórias,<sup>120</sup> portanto, o acúmulo de triglicerídeos hepáticos poderia ter papel protetor, prevenindo os efeitos tóxicos dos AGL.<sup>121</sup>

Mais um componente, o terceiro *hit*, foi adicionado à teoria posteriormente. No fígado saudável, a morte celular estimula a replicação de hepatócitos maduros, que reconstituirão a função tissular normal.<sup>122</sup> O estresse oxidativo é capaz de inibir a

replicação dos hepatócitos maduros, levando à expansão de células progenitoras como as células ovais.<sup>123</sup> A expansão dessas células está fortemente relacionada com o grau de fibrose e com a carcinogênese hepatocelular.<sup>123</sup> É justamente essa alteração na regeneração hepática que representaria o terceiro fator associado à patogênese da DHGNA.

O acúmulo de triglicerídeos no tecido hepático se dá por lipólise do tecido adiposo, por fontes dietéticas e pela lipogênese *de novo*.<sup>124</sup> Já foi demonstrado que, na DHGNA, 60% do conteúdo de triglicerídeos hepáticos é proveniente do influxo do tecido adiposo, 26% pelo lipogênese *de novo* e 15% da dieta.<sup>125</sup> Os triglicerídeos podem ser exportados do fígado pelas partículas de VLDL (*very low density lipoprotein*), que é formada pela incorporação dos triglicerídeos à apolipoproteína B (apo B),<sup>126</sup> portanto, aberrações na síntese e secreção da apo B também contribuiriam para o acúmulo hepático de triglicerídeos.<sup>127</sup>

A resistência à insulina que ocorre nos pacientes obesos também contribui para a gênese da DHGNA. A insulina apresenta potente ação supressora da lipólise tissular, entretanto, em situações de resistência à insulina, essa ação está prejudicada, aumentando o efluxo de AGL no tecido hepático.<sup>128</sup> Por outro lado, várias anormalidades relatadas na DHGNA, como o TNF- $\alpha$ , fator nuclear kappa  $\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ) e ceramida, interferem na cascata de sinalização da insulina, contribuindo para aumento da resistência à sua ação.<sup>129</sup>

Um componente importante para a progressão da DHGNA é a presença de inflamação no tecido hepático, a NASH. A inflamação é desencadeada, em parte, pela ativação das vias NF- $\kappa\beta$ , causada pelo aumento de AGL no tecido hepático.<sup>130</sup> O aumento da atividade da NF- $\kappa\beta$  está associado a uma elevada expressão de citocinas inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-6, interleucina 1-beta (IL-1 $\beta$ ) e ativação das células de Kupffer.<sup>130</sup> No paciente com NASH, os níveis séricos e hepáticos de TNF- $\alpha$  estão elevados<sup>131</sup> e se

correlacionam com a severidade histológica,<sup>132</sup> além de promover a resistência à insulina.<sup>133</sup> Achados semelhantes são encontrados com níveis elevados de IL-6.<sup>134</sup>

As adipocinas também parecem estar envolvidas na ocorrência da NASH. A leptina, que participa da regulação da ingesta e gasto energético, do sistema imunológico e promoção de inflamação e fibrogênese, está aumentada em pacientes obesos e naqueles com DHGNA, parecendo plausível seu papel na fisiopatogenia da doença.<sup>135</sup> Em contraste à leptina, a adiponectina apresenta relação inversamente proporcional ao percentual de gordura corporal e está reduzida em pacientes com DHGNA; ela apresenta atividades anti-inflamatórias e aumenta a sensibilidade à insulina.<sup>136</sup> Existem estudos demonstrando que os níveis de adiponectina podem auxiliar na distinção de NASH da esteatose simples.<sup>137,138</sup>

Como consequência do processo inflamatório, temos a fibrose e sua forma mais avançada, a cirrose, uma via final comum à maioria das doenças hepáticas crônicas, incluindo a NASH. Na maioria das condições de injúria hepática, há um mecanismo de reparo através da replicação de hepatócitos maduros,<sup>139</sup> entretanto, com uma injúria contínua, há redução na habilidade de proliferação desses hepatócitos. Nesse momento, outras vias de reparo são recrutadas, as células progenitoras hepáticas, que residem no Canal de Hering e são responsáveis pela reação ductular, participam desse processo.<sup>140</sup> A extensão da reação ductular se relaciona fortemente com o grau de fibrose periportal,<sup>141</sup> e os possíveis mecanismos incluem a secreção de citocinas pró fibróticas pela reação ductular,<sup>142</sup> além da transdiferenciação de colangiócitos para miofibroblastos.<sup>143</sup>

Apesar de a esteatose hepática ser comum em pacientes obesos e com resistência à insulina, apenas uma minoria progredirá para NASH e cirrose, sugerindo uma combinação de fatores ambientais e genéticos.<sup>144</sup> Várias doenças, como obesidade, DM2 e doença cardiovascular, apresentam um componente hereditário para suscetibilidade, incluindo a DHGNA, e esse componente genético pode ser responsável por 30-50% do risco

relativo.<sup>145</sup> Em adultos com DHGNA, os pacientes que apresentam NASH têm uma proporção maior de parentes de primeiro grau com NASH ou cirrose criptogênica,<sup>146</sup> além disso, após ajustar para outras variáveis como idade, etnia e IMC, a esteatose é mais comum em gêmeos ou parentes de crianças com DHGNA, em comparação àquelas sem esta condição.<sup>147</sup> Já foram identificados polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo lipídico, resistência à insulina, estresse oxidativo, citocinas, adipocinas e fibrogênese que aumentam a suscetibilidade para o desenvolvimento da NASH.<sup>148</sup> Estudos em NASH demonstraram polimorfismo de único nucleotídeo (SNP) nos genes da angiotensina e do fator de crescimento tissular  $\beta 1$ , que estão associados com fibrose hepática avançada em pacientes obesos.<sup>149</sup>

#### **2.2.4 História Natural da DHGNA**

Em décadas passadas, já se considerou a DHGNA uma patologia completamente benigna, entretanto vários estudos<sup>150-152</sup> têm ajudado a desmistificar essa crença.

Sabe-se que indivíduos com diagnóstico de DHGNA apresentam mortalidade maior do que pessoas sem essa patologia, mesmo após pareamento com sexo, idade e IMC.<sup>153</sup> A doença hepática contribui significativamente para essa diferença, já que é a terceira causa de mortalidade nesses pacientes, comparada à trigésima causa da população sem esse diagnóstico. Por outro lado, as duas principais causas de mortalidade nesses pacientes, que são a doença cardiovascular e o câncer, estão relacionadas à resistência à insulina, que tem íntima ligação com a DHGNA.

Dos pacientes que apresentam DHGNA, 30% apresentarão um quadro de NASH, dos pacientes com NASH, aproximadamente 20% desenvolverão cirrose e, desses, 30 a 40% morrerão por doenças relacionadas à falência hepática.<sup>154</sup> Para essa progressão, o



componente fundamental é a atividade necroinflamatória<sup>155</sup>, entretanto, já existem publicações evidenciando progressão para fibrose, mesmo sem esse componente na biópsia inicial, sugerindo que a DHGNA possa ser uma doença evolutiva.<sup>156,157</sup>

Obesidade, DM e a severidade da fibrose, na avaliação inicial, são os fatores mais associados com a progressão da fibrose.<sup>158-160</sup> As taxas de evolução para cirrose em 10 anos variam entre 5% e 20%, sendo as maiores para pacientes em nível hospitalar e as menores para estudos comunitários.<sup>159,161</sup>

Pacientes com NASH e fibrose avançada apresentam alto risco de desenvolver complicações hepáticas, em torno de 30% em 7 anos, taxas semelhantes a pacientes com cirrose por hepatite C que não responderam à terapia antiviral.<sup>159</sup>

Existem evidências de que a esteatose hepática aumente o risco de carcinoma hepatocelular mesmo em pacientes sem cirrose,<sup>162-164</sup> porém, há necessidade de mais estudos para avaliar a associação de maneira correta.

Vários estudos epidemiológicos indicam que a DHGNA está associada ao aumento do risco cardiovascular independentemente dos outros fatores de risco cardiometabólicos,<sup>165,166</sup> sugerindo que ela não seja apenas um marcador de doença cardiovascular, mas que esteja envolvida ativamente na patogênese da doença.<sup>167</sup>

### **2.2.5 Testes Diagnósticos**

A DHGNA é normalmente diagnosticada em pessoas assintomáticas após a detecção de elevação de aminotransferases em exames de rotina ou em ecografia abdominal alterada, realizada por outro motivo.<sup>168</sup>

O *guideline* da Associação Americana para Estudo das Doenças Hepáticas (AASLD) não encoraja o rastreamento para esteatose hepática, mesmo em grupos de alto risco, como obesos e diabéticos, por não haver evidências de ferramentas diagnósticas

adequadas e opções terapêuticas, tampouco estudos de custo-efetividade dos programas de rastreamento.<sup>11</sup>

Existem vários testes não invasivos capazes de identificar e quantificar a esteatose hepática.

O *Steatotest*, que incorpora doze variáveis em uma fórmula, apresenta boa acurácia, com área sob a curva ROC (AUROC) de 0,79, valor preditivo negativo de 93%, porém um valor preditivo positivo de apenas 63%.<sup>169,170</sup>

Bedogni propôs, em 2006, o Índice de Gordura Hepática, calculado por meio de uma fórmula que incorpora IMC, circunferência abdominal, triglicerídeos e GGT, apresentando uma boa acurácia, porém com a limitação de o padrão ouro utilizado ser a ecografia abdominal.<sup>171</sup>

O Escore de Gordura Hepática, DHGNA, que utilizou a espectroscopia por ressonância magnética como padrão, apresenta sensibilidade e especificidade de 95%, utilizando como variáveis presença de síndrome metabólica, DM, insulina sérica em jejum, AST e a razão AST/ALT.<sup>172</sup>

Os melhores testes para diagnóstico de esteatose hepática são os exames de imagem. A ecografia abdominal é o primeiro método a ser utilizado na prática clínica, pois é barato, facilmente disponível e com sensibilidade de 60-94% e especificidade 66-97%.<sup>173,174</sup> As grandes limitações da ecografia são a incapacidade de detecção de esteatose leve, ser operador dependente e com uma baixa concordância inter e intra-observador.<sup>175</sup> A sua acurácia diminui consideravelmente no paciente obeso, com sensibilidade abaixo de 50% e especificidade de 75%.<sup>176</sup>

A tomografia computadorizada apresenta acurácia similar à ecografia para detecção da DHGNA.<sup>177</sup> Por último, a ressonância magnética, superior à ecografia em detectar e quantificar a esteatose hepática, cuja correlação com a biópsia hepática é alta, com AUROC de 0,95 a 0,97, sensibilidade de 92-100% e 92-97% de especificidade.<sup>178</sup>

Outro fator importante a ser considerado na avaliação da DHGNA é a presença da NASH, pelo caráter progressivo dessa situação.

A presença de síndrome metabólica está associada ao risco de NASH e fibrose, ajudando a selecionar pacientes para biópsia hepática.<sup>11</sup>

Os níveis de aminotransferases não são bons preditores de NASH, com AUROC 0,6-0,7,<sup>179,180</sup> porém, quando seus níveis estão elevados, há aumento da chance de esteatohepatite.<sup>181</sup>

Múltiplos marcadores séricos foram avaliados como preditores de NASH, como citocinas, adipocinas, TNF- $\alpha$  e IL-6, e todos mostraram resultados conflitantes.<sup>131,182-184</sup>

Até o momento, não há teste diagnóstico que possa diagnosticar com acurácia quais pacientes irão desenvolver DHGNA avançada, isto é, fibrose em ponte, ou cirrose, por isso, a biópsia hepática permanece como o teste padrão ouro para confirmar a suspeita clínica de DHGNA, avaliar o grau de esteatose, alterações necroinflamatórias e, principalmente, estadiar a fibrose, distinguindo a esteatose simples da NASH.<sup>185</sup>

A forma de obtenção de tecido hepático está bem estabelecida na literatura, podendo ser realizada por meio de biópsia percutânea às cegas, biópsia transjugular, biópsia laparoscópica ou percutânea guiada por método de imagem (ultrassom ou tomografia computadorizada). É um procedimento seguro, mesmo quando realizado pela via percutânea, se realizado por profissional habilitado e experiente, após verificação do *status* da coagulação sanguínea. As complicações decorrentes são raras, e a mortalidade é de aproximadamente 1/10.000 a 1/ 20.000<sup>186</sup> e ocorrem exclusivamente nessa via, não havendo relatos de mortalidade por biópsia transoperatória.

Em 2002, um grupo cooperativo multicêntrico para estudo da NASH foi criado;<sup>187</sup> entre seus principais objetivos, o desenvolvimento e a validação de um sistema histológico que pudesse avaliar todo o espectro da DHGNA. O comitê de patologia desenvolveu um

escore para avaliação da atividade da DHGNA/NASH (*NAS score*) e outro separado para avaliação da fibrose (Tabela 2 e 3).<sup>188</sup>

**Tabela 2: Classificação da NASH** Escore de atividade. De Kleiner e colaboradores.<sup>188</sup>

<b>Grau de Esteatose (0-3)</b>	<b>Inflamação Lobular (0-3)</b>	<b>Balonização Hepatocitária (0-2)</b>
0: <5%	0: Nenhuma	0: Nenhuma
1: 5-33%	1: <2 focos/campo 20x	1: Leve, poucos
2: 34-66%	2: 2-4 focos/campo 20x	2: Moderada, vários
3: >66%	3: >4 focos/campo 20x	
NASH escore de atividade	0-2 sem NASH 3-4 incerteza NASH 5-8 NASH	

**Tabela 3: Classificação da NASH –** Escore de fibrose. De Kleiner e colaboradores.<sup>188</sup>

<b>Fibrose</b>
0: Nada
1a: Fibrose leve perissinusoidal de zona 3
1b: Fibrose moderada perissinusoidal de zona 3
1c: Fibrose portal apenas
2: Fibrose perissinusoidal e portal
3. Fibrose em ponte
4. Cirrose

### 2.2.6 Tratamento

Existe um consenso universal de que todos os pacientes com DHGNA devam receber intervenções que promovam estilos de vida mais saudáveis com perda de peso, controle dietético e atividade física, sendo essa a primeira opção a ser implementada em todos os pacientes.<sup>189-192</sup>

A recomendação de perda de peso varia de 0,5 Kg por semana a 7% do peso corporal para melhora da esteatose e até 10% do peso para melhora da atividade necroinflamatória em pacientes com excesso de peso.<sup>189,192,193</sup> Há uma concordância em recomendar uma dieta hipocalórica para promover a perda de peso, diminuindo a ingesta

de carboidratos e gordura saturada, evitando bebidas enriquecidas com frutose e aumentando o consumo de fibras, frutas e vegetais ricos em antioxidantes.<sup>189-191,193</sup>

O sedentarismo deve ser evitado com a implementação de uma atividade física regular. Existem evidências de que devem ser realizados ao menos 150 minutos por semana de uma atividade física de intensidade moderada e ao menos 75 minutos de atividade física intensa, associada à musculação duas vezes por semana.<sup>189</sup>

A terapia farmacológica deve ser reservada apenas para pacientes com NASH, entretanto as evidências que a suportam são fracas, havendo sugestões de seu uso apenas em ensaios clínicos.<sup>190,193</sup> A Associação Europeia para Estudo do Fígado sugere um curso de 1 a 2 anos de terapia com glitazonas ou vitamina E, associada ao ácido ursodesoxicólico em pacientes não diabéticos com NASH, baseada em estudo de Sanyal e cols., que evidenciou melhora de NASH, porém sem redução da fibrose.<sup>194</sup>

Como demonstrado, até o momento, não há tratamento médico estabelecido e comprovado para DHGNA, sendo a perda de peso moderada e sustentada o principal suporte no tratamento dessa patologia.<sup>195</sup> Em decorrência disso, a cirurgia bariátrica surgiu como opção terapêutica em obesos mórbidos. Estudo de Mottin e colaboradores<sup>196</sup> evidenciou que pacientes obesos mórbidos submetidos à cirurgia bariátrica apresentam importante regressão da esteatose após o emagrecimento, e Moretto e colaboradores<sup>197</sup> também evidenciaram que houve regressão da fibrose, no pós-operatório, de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica.

Todavia, têm se verificado que, em alguns pacientes, apesar da perda de peso e da redução do grau de esteatose após a cirurgia bariátrica, há aumento da inflamação e piora da fibrose hepática.<sup>198,199</sup> Os mecanismos responsáveis por essa piora não são conhecidos, postulando-se que a manutenção da resistência à insulina, mediada pelo estresse oxidativo, esteja envolvida no processo.<sup>200,201</sup>

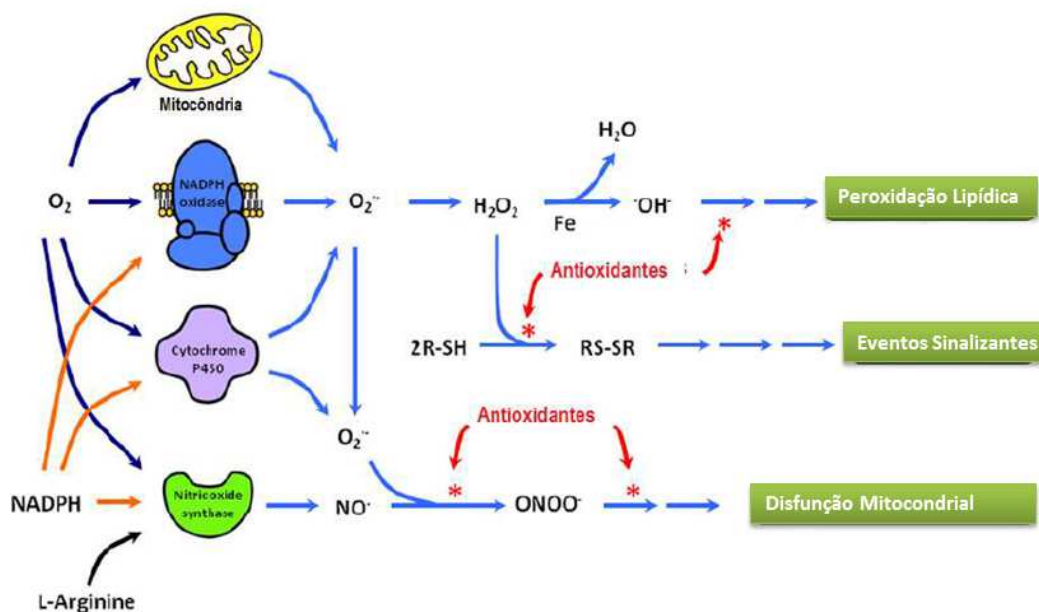
## 2.3 ESTRESSE OXIDATIVO

O oxigênio, indispensável à vida, também é tóxico. Os seres vivos, quando expostos à concentrações maiores do que as existentes na atmosfera, apresentam dano, que pode chegar à morte celular. Para se adaptarem a essas condições, os organismos aeróbios desenvolveram mecanismos protetores contra a eventual toxicidade do oxigênio, através de um complexo sistema antioxidante que inclui componentes enzimáticos e não enzimáticos.<sup>202</sup>

O estresse oxidativo é um termo comumente usado para se referir a um estado em que o equilíbrio redox tissular ou celular é alterado para um ambiente mais oxidante.<sup>203</sup> Algumas consequências do estresse oxidativo resultam de modificações químicas irreversíveis de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, levando a alterações nas vias de sinalização que controlam a morte celular, transcrição de genes, inflamação e ativação de células estreladas.<sup>204</sup>

O estresse oxidativo inicia com a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (NOS) como parte da função celular normal. Existem múltiplas fontes celulares de geração de ROS, porém as com maior significância são o transporte mitocondrial de elétrons, as enzimas P450 do retículo endoplasmático e as oxidases e peroxissomas ligadas à membrana celular. A produção de ROS por essas fontes pode ser estimulada por citocinas, inflamação e proteínas virais. Esse processo, inicialmente, gera superóxido, que é sequencialmente reduzido para formar peróxido de hidrogênio, radical hidroxil e, por último, água. Esses intermediários reativos interagem com outras moléculas para formar espécies reativas de oxigênio secundárias, como produtos da peroxidação lipídica, peroxinitrito e ácidos sulfênico e dissulfidos (Figura 3).<sup>205</sup>

Quando as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são abundantes, causam alterações na função mitocondrial, modulam a expressão de citocinas, alteram a resposta imune e ativam cascatas de sinalização, resultando na injúria hepatocelular, apoptose ou morte celular e fibrose hepática.<sup>206</sup>



**Figura 3:** Efeitos das Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio. Extraído de Singal e colaboradores.<sup>205</sup>

As espécies reativas de oxigênio apresentam propriedades distintas, que incluem a reatividade química, meia vida e solubilidade lipídica. A reatividade promove a toxicidade e alta reatividade resulta em curta meia vida, limitando a difusão. O ânion superóxido, por exemplo, apresenta uma meia vida de  $10^{-6}$  s, e o radical hidroxil, uma meia vida de  $10^{-9}$  s.<sup>207</sup> As espécies reativas de oxigênio, entretanto, atacam os ácidos graxos poliinsaturados da membrana, dando início à lipoperoxidação na célula, que resulta na formação de produtos do aldeído, como o 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) e o malondialdeído (MDA). O

HNE e o MDA apresentam meia vida maior que as ROS e apresentam potencial de difusão para outros sítios, amplificando os efeitos do estresse oxidativo.<sup>208</sup>

A peroxidação lipídica resulta na ruptura da membrana celular, causando disfunção da célula. O grau de lipoperoxidação se correlaciona com a disponibilidade de ácidos graxos, indicando que pode causar considerável dano no fígado esteatótico.<sup>209</sup> Em estudos experimentais, quando administrados a animais, o MDA e o HNE, que são proinflamatórios e profibrogênicos, induzem alterações histológicas consistentes com NASH.<sup>118</sup>

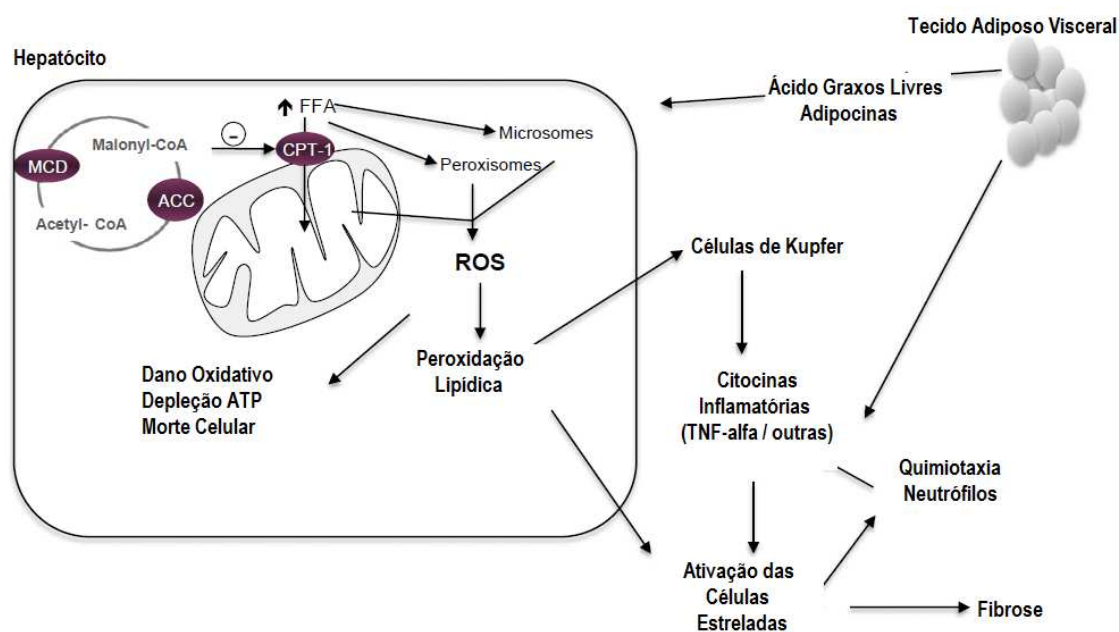
Sanyal e colaboradores<sup>210</sup> demonstraram, em 2000, que a lipoperoxidação no tecido hepático de pacientes com NASH é significativamente maior do que em pacientes com fígado normal. Em 2001, MacDonald e colaboradores<sup>211</sup> reportaram uma associação entre a lipoperoxidação e fibrose hepática em espécimes de biópsia de 39 pacientes com vários graus de DHGNA, achados confirmados por Chalasani e colaboradores<sup>212</sup>, que, além de evidenciarem a associação de NASH e os níveis séricos de lipoperoxidação, verificaram uma associação com a resistência insulínica.

Existem estudos demonstrando que o estresse oxidativo, particularmente os produtos da lipoperoxidação, participam da ativação das células estreladas hepáticas.<sup>213-215</sup> Essas moléculas estão associadas à produção excessiva de colágeno tipo I pelas células estreladas e ativação do promotor de colágeno  $\alpha 2$ , demonstrando uma possível ligação entre estresse oxidativo e fibrose hepática (Figura 4).<sup>206</sup>

Sabe-se que a resistência à insulina está diretamente ligada ao estresse oxidativo.<sup>216,217</sup> Nesse contexto, o estresse oxidativo é definido como estímulo importante na evolução da NASH, sendo o principal causador da lipoperoxidação, cujos produtos intermediários são importantes agentes pró-inflamatórios que ativam as células estreladas, favorecendo a fibrinogênese.<sup>14</sup>



Mecanismos celulares para controlar o estresse oxidativo são críticos para a homeostase celular e incluem enzimas, como catalase, superóxido dismutase (SOD), peroxiredoxinas e glutathione peroxidases.<sup>218</sup> Receptores de elétrons não enzimáticos, como vitamina E, vitamina C e glutathione, também apresentam papel importante na resposta celular ao estresse oxidativo.<sup>219</sup> Sob condições fisiológicas, o peróxido de hidrogênio é removido pela catalase, uma enzima presente nessas organelas, que metaboliza as espécies reativas de oxigênio.<sup>220</sup> Quando comparados pacientes com DHGNA e controles saudáveis, verifica-se também uma diminuição dos níveis de antioxidantes.<sup>221,222</sup>



**Figura 4: Mecanismos levando a disfunção hepatocitária, inflamação e fibrose na NASH.** Modificado de Rolo e colaboradores.<sup>223</sup>

Existe apenas um estudo que avaliou o comportamento do estresse oxidativo e sua relação com a resistência à insulina e esteatohepatite não alcoólica nos pacientes com obesidade mórbida, demonstrando uma possível participação do estresse oxidativo na patogênese da esteatohepatite não alcoólica,<sup>16</sup> porém com poucas variáveis avaliadas.

### 3. JUSTIFICATIVA

A prevalência da obesidade mórbida vem crescendo exponencialmente nas últimas décadas e se transformou em um dos principais problemas de saúde pública no mundo, tanto pelas comorbidades que estão associados a ela, quanto aos elevados custos que ela traz aos sistemas de saúde. O Rio Grande do Sul é o estado do nosso país com maior prevalência de pessoas com excesso de peso e, portanto, com o maior número de pessoas sob risco de apresentarem doenças relacionadas à obesidade.

Dentre as doenças, destaca-se a doença hepática gordurosa não alcoólica, que já é umas das principais causas de doença hepática crônica e a terceira causa de transplante hepático no mundo, com tendência a tornar-se a primeira causa nas próximas décadas, pelo aumento da obesidade e síndrome metabólica na população e pelo melhor controle de outras doenças, como hepatite C crônica, hepatite B crônica e etilismo.

Até o momento, não existe terapêutica medicamentosa que possa, de maneira eficaz, controlar a evolução da doença hepática gordurosa não alcoólica, sendo as únicas medidas o controle de peso por meio de medidas dietéticas e atividade física, porém com baixa efetividade, ou por meio da cirurgia bariátrica.

Para possibilitar o desenvolvimento de novas terapêuticas, é fundamental o esclarecimento da fisiopatogenia e o correto diagnóstico da doença. Nesse contexto, é que se demonstra a importância do estudo do estresse oxidativo e sua relação com a gravidade da DHGNA.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a relação do estresse oxidativo com a doença hepática gordurosa não alcoólica em pacientes obesos mórbidos submetidos ao *bypass* gástrico.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a lipoperoxidação antes da realização do *bypass* gástrico.
- Relacionar:
  - a lipoperoxidação plasmática com a severidade da doença hepática gordurosa não alcoólica.
  - o estado antioxidante com a gravidade da doença hepática gordurosa não alcoólica.
  - a lipoperoxidação com a resistência à insulina, hemoglobina glicada, o IMC, presença de comorbidades, ferritina e proteína C reativa.
- Verificar quais variáveis antropométricas, bioquímicas e clínicas apresentam relação com a presença de esteatohepatite não alcoólica em obesos mórbidos.

## **5.PACIENTES E MÉTODOS**

### **5.1 DELINEAMENTO**

Estudo transversal.

Fator de exposição: Obesidade mórbida.

Desfechos: Lipoperoxidação e doença hepática gordurosa não alcoólica.

### **5.2 HIPÓTESE**

A lipoperoxidação plasmática está associada à presença de NASH em obesos mórbidos com DHGNA candidatos à cirurgia bariátrica.

### **5.3 PACIENTES**

Foram incluídos pacientes obesos mórbidos submetidos ao *bypass* gástrico no Centro de Obesidade Mórbida e Síndrome Metabólica do Hospital São Lucas da PUCRS, no período de maio de 2010 a agosto de 2011, após a assinatura de consentimento pós-informação e aprovação do protocolo pelo CEP-PUCRS.

### 5.3.1 Critérios de Inclusão

- IMC > 40 kg/m<sup>2</sup> ou IMC > 35 kg/m<sup>2</sup> com comorbidades;
- Realizar *bypass* gástrico em *Y-de-Roux* por técnica aberta;
- Idade entre 18 e 65 anos.

### 5.3.2 Critérios de Exclusão

- Tratamento cirúrgico prévio para obesidade;
- Apresentar Hepatite B ou C crônicas;
- Anti-HIV positivo;
- Uso regular de bebida alcoólica (> 140g de álcool por semana para homens e > 70g/semama para mulheres) verificado pela avaliação psiquiátrica pré operatória;
- Doenças autoimunes associadas;
- Uso de drogas hepatotóxicas;
- Biópsia hepática com menos de 8 espaços porta.

## 5.4 MÉTODOS

No pré-operatório, todos pacientes foram avaliados para as seguintes variáveis:

#### 5.4.1 Análise sérica

-Enzimas hepáticas: aspartato aminotransferase (AST), alanino aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), gama glutamil transpetidase (GGT).

-Perfil lipídico: colesterol total e suas frações, triglicerídeos (TGs).

-Resistência à insulina: dosagem de glicemia de jejum e insulina sérica de jejum para cálculo do HOMA – IR (*Homeostatic Model Assesment – Insulin Resistance*) que é calculado pela fórmula :  $\text{insulina jejum } (\mu\text{UI/ml}) \times \text{glicemia jejum } (\mu\text{UI/ml})/22.5$ .

- HbA1C.

-Ácido úrico

-Proteínas inflamatórias: Proteína C Reativa (PCR) e ferritina.

#### 5.4.2 Definição de comorbidades

O diagnóstico de DM2 foi definido segundo critérios da *American Diabetes Association*: HbA1C  $\geq 6,5\%$  ou glicemia de jejum maior 126 mg/dL ou glicemia de 2 horas  $\geq 200$  md/dL no teste de tolerância oral à glicose com 75g.<sup>224</sup> Além desses critérios, obesos em uso de antidiabéticos orais ou insulina foram considerados como apresentando DM2.

O diagnóstico de hipertensão arterial sistêmica foi definido por pressão arterial  $\geq 140/90$  mmHg ou uso medicações anti-hipertensivas.<sup>225</sup>

A síndrome metabólica foi diagnosticada segundo os critérios da *Internacional Diabetes Federation*.<sup>226</sup>

### 5.4.3 Estresse Oxidativo

Amostras de sangue foram coletadas com heparina e centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos a 4°C. O plasma foi armazenado e os eritrócitos foram lavados 3 vezes com o mesmo volume de solução salina (NaCl 0,9%), sendo o sobrenadante descartado a cada lavagem e os eritrócitos separados. Dez µL de eritrócitos foram pipetados para a medida da concentração de hemoglobina de acordo com o método de Drabkin. Outros 100 µL de plasma foram pipetados para determinar os produtos gerados pela lipoperoxidação através do método *thiobarbituric acid reactive substances* (TBARS), e a medida foi realizada espectrofotometricamente a 535nm.<sup>227</sup>

#### 5.4.3.1 Medida das Substâncias que Reagem ao Acido Tiobarbitúrico (TBARS)

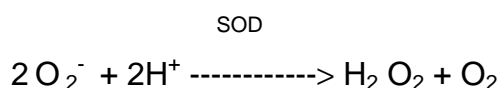
A técnica de TBARS consiste no aquecimento do homogeneizado com o ácido tiobarbitúrico e na conseqüente formação de um produto corado, medido em espectrofotômetro a 535 nm. O aparecimento de coloração ocorre devido à presença do malondealdeído e outras substâncias provenientes da peroxidação lipídica no material biológico.

As amostras de plasma foram colocadas em tubo de ensaio, nesta ordem de adição: 0,75 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10%, 0,25 mL do homogeneizado, 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% e 25 mL de água destilada. O TBA reage com produtos da lipoperoxidação, formando uma base de Schiff, e o TCA tem a função de desnaturar as

proteínas presentes, além de acidificar o meio da reação. Posteriormente, agitou-se cada tubo e fez-se a incubação em 100 ° C por 15 minutos. Após, os tubos foram resfriados e acrescentado 1,5 mL de álcool n-butílico para extrair o pigmento formado. Eles então foram colocados em agitador (Biomatic) por 45 segundos e centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm (1110 x g). Por último, o produto corado foi retirado e lido em espectrofotômetro (CARY 3E - UV - Visible Spectrophotometer Varian) com um comprimento de onda de 535 nm. A concentração de TBARS obtida foi expressa em nmol por mg de proteína.<sup>228</sup>

#### 5.4.3.2 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

A determinação da SOD nos eritrócitos foi realizada segundo Mirsa e Fridovich (1972). O método está baseado na inibição por superóxido dismutase da formação de adrenocromo na autoxidação da epinefrina.



Considerando que a epinefrina permanece estável em soluções ácidas e espontaneamente se oxida em soluções básicas, favorecendo a formação de adrenocromo, a SOD pôde ser medida espectrofotometricamente seguindo a troca de absorbância de epinefrina a 480nm, onde apresenta um pico de absorbância.

Para a reação ocorrer, foi preparada uma mistura com volume final de 1 mL com tampão bicarbonato (0,05 M; pH 10,2), fração citosólica e epinefrina (4 mM). A absorbância utilizada foi de 480 nm, a 30°C.



A reta padrão foi elaborada com concentrações crescentes de SOD (20 a 100 nM), para determinar a que concentração da mesma se produz a inibição da autoxidação da epinefrina em 50% , e os resultados foram expressos em U/mg de hemoglobina. Uma atividade enzimática se define como a quantidade de enzima que é capaz de inibir 50% da autoxidação da epinefrina.<sup>229</sup>

#### **5.4.4 Análise histológica**

Avaliada através de biópsia hepática por agulha de Trucut com diâmetro de 1,5mm, realizada no início da cirurgia.

O exame anatomopatológico foi realizado no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital São Lucas da PUCRS, por um patologista, ciente de que os pacientes eram obesos mórbidos, porém cegado quanto aos dados clínicos e laboratoriais.

O tecido hepático foi fixado em formalina tamponada a 4% por 24 hs e então incluído em parafina, sendo seccionado posteriormente em micrótomo com espessura de 5  $\mu$ m. Nas fases de coloração, as lâminas foram mergulhadas nos corantes hematoxilina-eosina durante 5 minutos cada, intermediadas por um banho de água corrente.

Foi realizada coloração de picrossirius segundo protocolo proposto por Junqueira e colaboradores em 1979<sup>230</sup> para avaliação do grau de fibrose.

A doença hepática gordurosa não alcoólica foi classificada através do *NAS score*.<sup>188</sup> Para o diagnóstico de NASH, foi considerada a presença de esteatose associada à balonização hepatocitária e/ou infiltrado inflamatório.

## **5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Foram digitados os dados no programa Excel e posteriormente exportados para o programa SPSS v18.0 para análise estatística. Foram descritas as variáveis categóricas por frequências e percentuais. As variáveis quantitativas que tiveram distribuição simétrica foram descritas pela média e o desvio padrão e, quando a sua distribuição foi assimétrica, pela mediana e o intervalo interquartil.

Foram comparadas as variáveis quantitativas com distribuição simétrica entre dois grupos pelo teste t de Student para amostras independentes e, entre três grupos, pelo teste de Análise de Variância (ANOVA), seguido do teste post hoc de Tukey, para detectar as diferenças. As variáveis quantitativas com distribuição assimétrica entre dois grupos foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney e, entre três grupos, pelo teste de Kruskal-Wallis. Caso esse teste apontasse diferença entre grupos, foi realizada uma ordenação por postos da variável e comparados esses postos entre os grupos pelo teste post hoc de Tukey.

As variáveis quantitativas foram correlacionadas entre si pelos coeficientes de correlação de Pearson ou Spearman, segundo a distribuição das variáveis.

Foi considerado um nível de significância de 5%.

## **5.6 ASPECTOS ÉTICOS**

Todos os pacientes submetidos à cirurgia bariátrica assinam um Termo de Consentimento Informado relativo à cirurgia e aos vários procedimentos, cuidados e exames que deverão realizar, incluindo a realização da biópsia hepática transoperatória.

A realização dos exames citados neste projeto faz parte do protocolo assistencial do Centro da Obesidade e Síndrome Metabólica (COM) do Hospital São Lucas (HSL) da PUCRS, e também de uma linha de pesquisa em patologias associadas à obesidade mórbida e seu tratamento cirúrgico.

Para avaliação do estresse oxidativo, é necessário somente coleta de 10 ml de sangue do paciente por punção venosa periférica, podendo causar apenas dor leve local, hematomas/equimoses, sem acrescentar riscos maiores.

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS. Aprovado sob número 11/05594. Foi obtido o consentimento informado de todos os participantes (anexo 3).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Pacientes

Foram incluídos 43 pacientes, divididos inicialmente em dois grupos: esteatose simples com 15 pacientes (34,9%) e esteatohepatite com 28 pacientes (65,1%). Não houve diferença entre os grupos em relação à idade, IMC, circunferência abdominal e relação cintura/quadril, apresentando diferença em relação ao sexo, com uma frequência maior de esteatohepatite entre homens (tabela 4).

**Tabela 4:** Características demográficas e antropométricas dos pacientes.

VARIÁVEIS	ESTEATOSE	ESTEATOHEPATITE	P
N (%)	15 (34,9%)	28 (65,1%)	
IDADE (ANOS)	34,4 ± 6,8	38,7 ± 9,1	0,113
SEXO(M/F)	0 / 15	13 / 15	0,001
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	46,2 ± 8,37	45,13 ± 7,85	0,676
CIRCUNFERÊNCIA ABDOMINAL (cm <sup>2</sup> )	125,2 ± 20,39	130,93 ± 15,37	0,311
RELAÇÃO CINTURA/QUARIL	0,92 ± 0,9	0,98 ± 0,9	0,052

### 6.2 Análise das variáveis bioquímicas

Quando avaliadas as variáveis bioquímicas, verificaram-se níveis maiores de alanino aminotransferase no grupo com esteatohepatite (57,8 ± 48,1 U/L), comparado ao grupo com esteatose simples (25,6 ± 11,2U/L), com P= 0,002. Também verificaram-se diferenças entre os grupos com esteatohepatite e esteatose simples em relação a GGT, 43,5 (28,5 – 80) U/L versus 24 (22 – 50) U/L ( P= 0,032), em relação ao ácido úrico, 6,86

$\pm 1,8$  mg/dL versus  $5,04 \pm 1,54$  mg/dL ( $P= 0,002$ ) e, em relação aos triglicerídeos,  $203,21 \pm 97,68$  mg/dL versus  $131,76 \pm 61,64$  mg/dL ( $P= 0,014$ ). Avaliando a homeostasia da glicose, houve diferenças também em relação à insulina de jejum,  $31,7 \pm 16,46$  mU/mL para o grupo com esteatohepatite e  $15,9 \pm 7,3$  no grupo com esteatose isolada ( $P < 0,001$ ); na resistência à insulina aferida pelo HOMA-IR,  $7,04$  ( $4,86 - 11,35$ ) para o grupo com esteatohepatite e  $5,7$  ( $5,3 - 5,9$ ) para o grupo com esteatose simples ( $P= 0,001$ ). Verificaram-se ainda níveis maiores de ferritina no grupo com esteatohepatite,  $359 \pm 326$  mg/dL versus  $90,9 \pm 83,3$  mg/dL. Não houve diferenças nas demais variáveis bioquímicas analisadas, conforme demonstrado na tabela 5.

**Tabela 5. Análise das variáveis bioquímicas**

VARIÁVEIS	ESTEATOSE	ESTEATOHEPATITE	P
N (%)	15 (34,9%)	28 (65,1%)	
AST (U/L)	25,5 $\pm$ 10,2	35,2 $\pm$ 19,8	0,084
ALT (U/L)	25,6 $\pm$ 11,2	57,8 $\pm$ 48,1	0,002
FA (U/L)	92,6 $\pm$ 29,7	82,5 $\pm$ 19,2	0,197
GGT* (U/L)	24 (22 – 50)	43,5 (28,5 – 80,0)	0,032
Colesterol (mg/dL)	178,87 $\pm$ 42,1	197,18 $\pm$ 42,32	0,183
HDL (mg/dL)	49,6 $\pm$ 10,3	45,1 $\pm$ 8,7	0,147
LDL (mg/dL)	101,2 $\pm$ 34,8	114,1 $\pm$ 42,4	0,316
TGs (mg/dL)	131,76 $\pm$ 61,64	203,21 $\pm$ 97,68	0,014
Acido úrico (mg/dL)	5,04 $\pm$ 1,54	6,86 $\pm$ 1,8	0,002
Glicemia de jejum (mg/dL)*	89 (86 – 94)	102 (86 – 136,7)	0,136
Insulina de jejum (mU/dL)	15,9 $\pm$ 7,3	31,7 $\pm$ 16,46	<0,001
HbA1C (%)*	5,7 (5,3 – 5,9)	6,05 (5,65 – 7,47)	0,08
HOMA-IR*	3,25 (2,2 – 5,01)	7,04 (4,86 – 11,35)	0,001
Ferritina (mg/dL)	90,9 $\pm$ 83,3	359,0 $\pm$ 326,7	<0,001
Proteína C Reativa(mg/dL)	4,95 $\pm$ 9,1	1,6 $\pm$ 1,2	0,188

\* se refere a variáveis expressas em mediana (p25 – p75). As demais estão expressas em média  $\pm$  DP.

### 6.3 Relação da DHGNA com as comorbidades

Analisou-se a relação da ocorrência de esteatohepatite com *diabetes mellitus*, hipertensão arterial sistêmica e síndrome metabólica. (Tabela 6).

**Tabela 6. Análise das comorbidades**

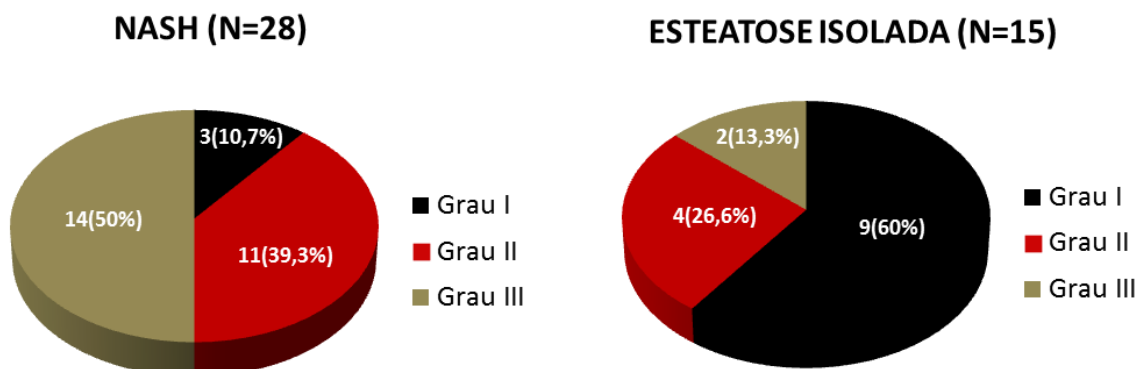
	ESTEATOSE (N/%)	ESTEATOHEPATITE (N/%)	P
DM	2 (13,3%)	8 (28,6%)	0,451
HAS	2 (13,3%)	16 (57%)	<b>0,014</b>
SM	5 (33,3%)	22 (78,6%)	<b>0,009</b>

### 6.4 Análise Histológica

Quando comparou-se a esteatose entre os pacientes com NASH e esteatose isolada, verificou-se graus maiores de esteatose no pacientes com NASH com  $P < 0,001$  (Gráfico 1).

Verificou-se também que nenhum paciente com esteatose isolada apresentava fibrose, enquanto dos pacientes com NASH, 5 pacientes (17%) apresentavam fibrose estágio 1 e 7 pacientes (25%) apresentavam fibrose estágio 3 (Gráfico 2).

**Gráfico 1. Comparação do grau de esteatose entre os pacientes com NASH versus esteatose isolada**



**Gráfico 2. Comparação do estágio de fibrose entre os pacientes com NASH versus esteatose isolada**



### 6.5 Análise Lipoperoxidação Plasmática (TBARS)

Analisando-se o estresse oxidativo, foi verificada uma maior lipoperoxidação plasmática nos pacientes com esteatohepatite quando comparados aos pacientes com

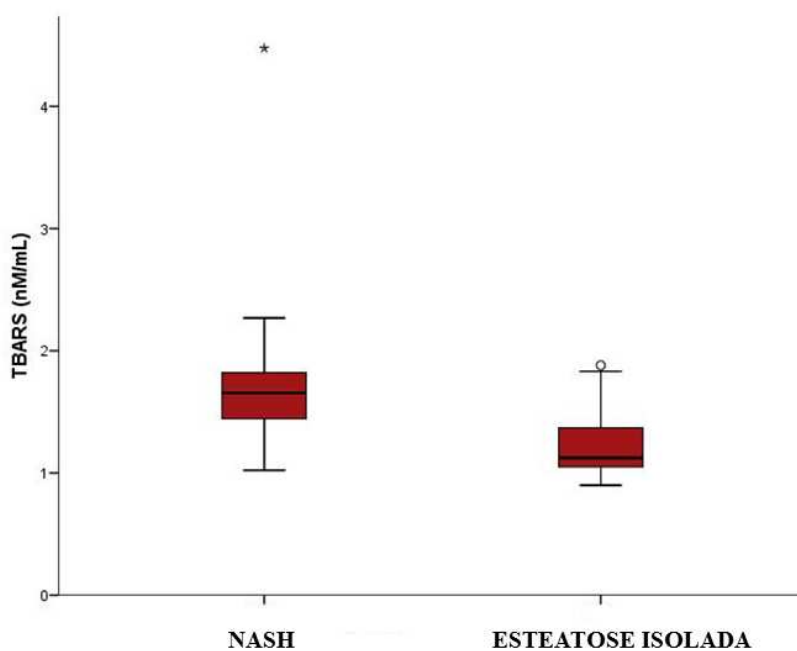
esteatose isolada, 1,65 (1,43 – 1,82) nM/mL versus 1,12 (1,04 – 1,41) nM/mL, com  $P=0,002$  (Gráfico 3).

Quando se analisaram as três categorias de atividade do *NAS score* (esteatose simples, esteatohepatite provável e esteatohepatite confirmada), verificou-se maior lipoperoxidação plasmática nos grupos com esteatohepatite confirmada e provável, comparados ao grupo sem esteatohepatite (Gráfico 2). Foi verificada uma correlação forte entre os níveis de TBARS e o *NAS score* ( $r_{sp}=0,470$ ,  $P=0,001$ ) (Gráfico 4).

Não foi constatada diferença na lipoperoxidação entre os pacientes com ou sem fibrose hepática, 1,52 (1,31 – 1,72) nM/mL versus 1,53 (1,12 – 1,83) nM/mL, com  $P=0,957$ , sendo que 7 pacientes do grupo com esteatohepatite apresentavam classificação 3 de fibrose do *NAS score*.

Não houve correlação entre os níveis de TBARS e ferritina ( $r_{sp}=0,27$ ), PC Reativa ( $r_{sp}=0,063$ ), HBA1C ( $r_{sp}=0,012$ ), IMC ( $r_{sp}=0,023$ ) e HOMA-IR ( $r_{sp}=0,178$ ).

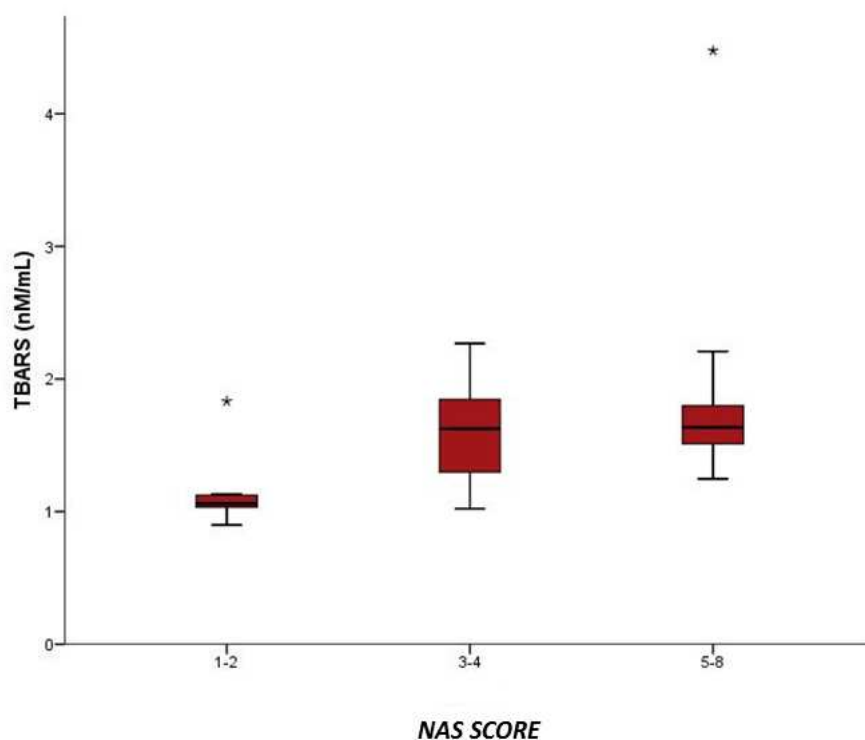
**Gráfico 3. Relação da lipoperoxidação plasmática (TBARS) com a DHGNA**





Não houve diferença no TBARS em relação à presença de comorbidades. Os obesos mórbidos diabéticos apresentavam TBARS 1,44 (1,15 – 1,77) nM/mL versus 1,55 (1,17 – 1,81) nM/mL dos que não tinham DM ( $P= 0,666$ ). Os pacientes com síndrome metabólica apresentavam TBARS de 1,61 (1,28 – 1,85) nM/mL, e os sem esse diagnóstico 1,31 (1,05 – 1,79) nM/mL, com  $P= 0,152$ . Não houve diferença nos pacientes com e sem HAS, 1,52 (1,23 – 1,769) nM/mL versus 1,55 (1,10 – 1,82) nM/mL ( $P= 0,834$ ). A lipoperoxidação plasmática também não foi influenciada pela superobesidade, 1,55 (1,14 – 1,72) nM/mL versus 1,53 (1,18 – 1,82) nM/mL dos pacientes com IMC menor que 50 ( $P= 0,988$ ).

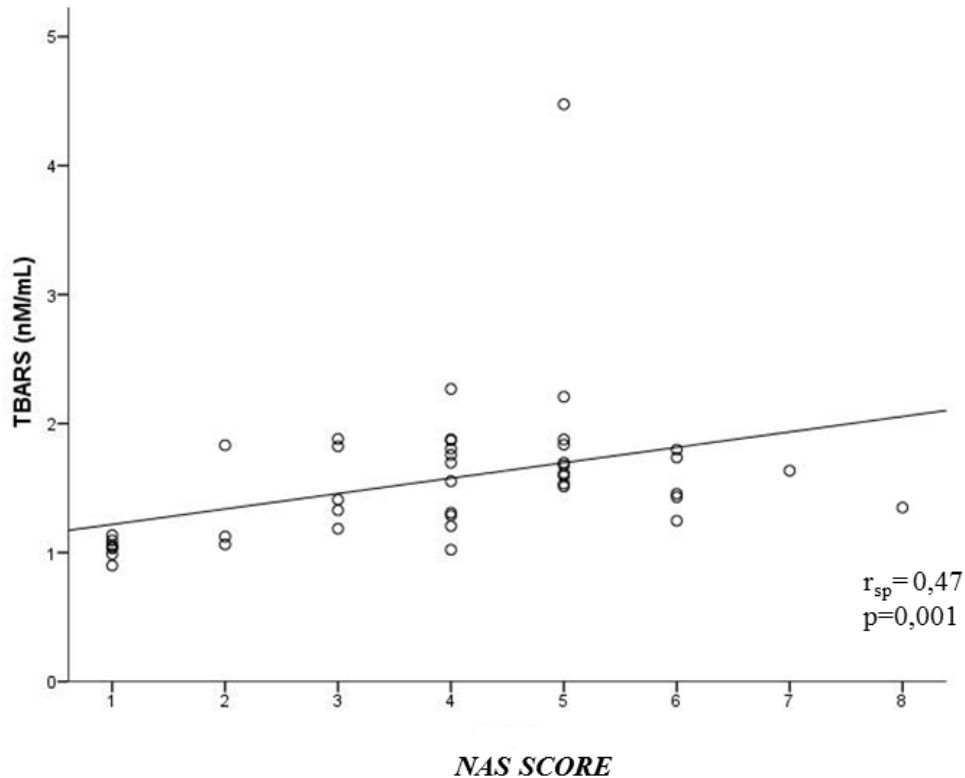
**Gráfico 4. Relação da lipoperoxidação plasmática (TBARS) com *NAS score***

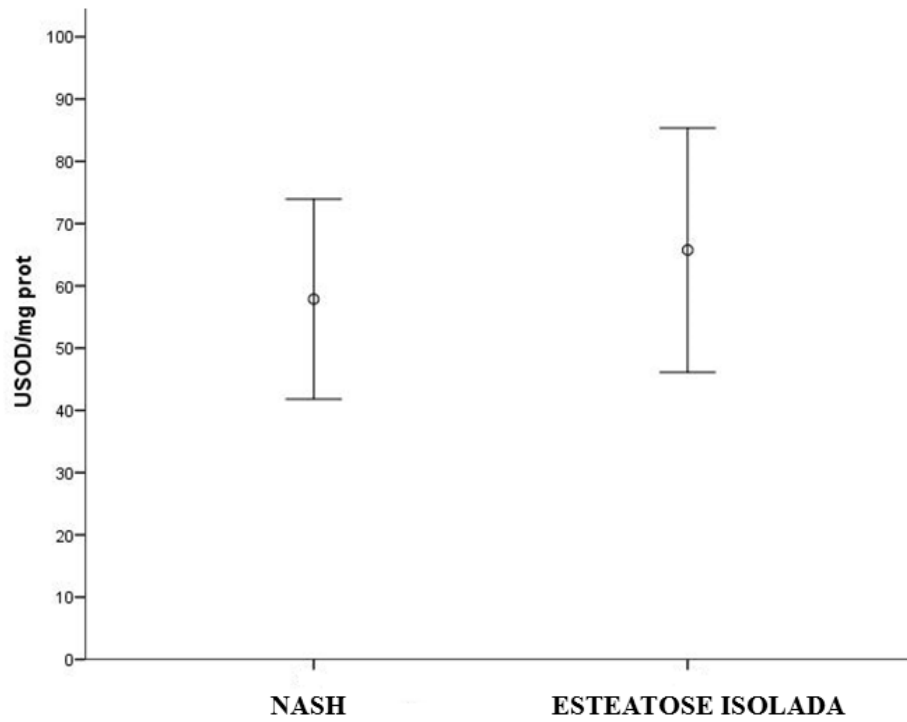
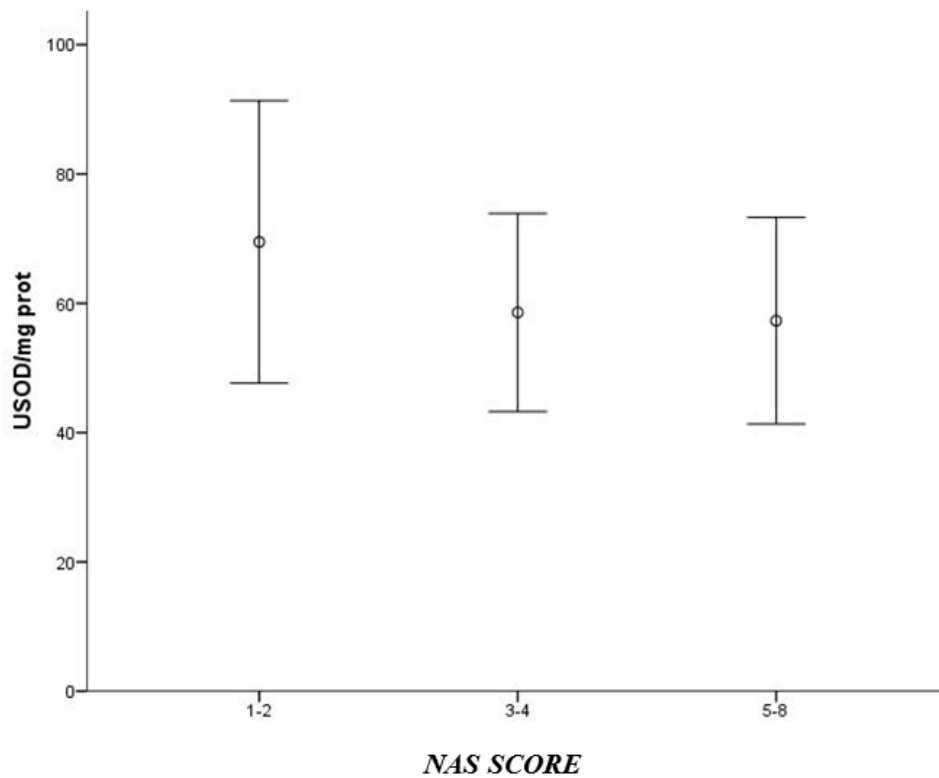


## 6.6 Análise da atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

Quando se analisou a atividade da SOD, não foi verificada uma atividade antioxidante maior no grupo com esteatose isolada,  $65,74 \pm 18,6$  USOD/mg de proteína versus  $57,86 \pm 16,05$  USOD/mg de proteína no grupo com esteatohepatite ( $P=0,163$ ). Vide gráfico 5. Também não foi constatada diferença quando se comparou a SOD com as três categorias do escore de atividade do *NAS score* (esteatose isolada, esteatohepatite incerta e esteatohepatite confirmada),  $69,49 \pm 21,84$  USOD/mg de proteína versus  $58,57 \pm 15,33$  USOD/mg de proteína versus  $57,31 \pm 15,99$  USOD/mg de proteína (Gráfico 6).

**Gráfico 5. Correlação da lipoperoxidação plasmática com *NAS score*.**



**Gráfico 6. Atividade da SOD em relação à DGHGNA****Gráfico 7. Atividade da SOD em relação ao *NAS score***

## 7. DISCUSSÃO

A obesidade é um fator de risco maior para a ocorrência da DHGNA.<sup>231</sup> Com o aumento da prevalência da obesidade na população, houve concomitante aumento da DHGNA, chegando a 30% nos países ocidentais.<sup>232</sup> Entre os obesos mórbidos, a prevalência é ainda maior, estando presente em mais de 90% dos pacientes.<sup>196,233</sup>

Embora a DHGNA seja um fator de risco independente para doença cardiovascular e mortalidade, apenas a presença de NASH está associada à doença hepática avançada.<sup>234</sup> Não são todos os obesos mórbidos, entretanto, que apresentam esteatose hepática,<sup>235</sup> não havendo relação do grau de esteatose com sexo, idade e IMC.<sup>236</sup> Os mecanismos que levariam à esteatose e à progressão da esteatose hepática para um quadro de NASH também não estão estabelecidos.<sup>237</sup>

A hipótese dos dois *hits* é um modelo de DHGNA amplamente aceito. O primeiro *hit* seria o distúrbio metabólico, que traria o influxo de ácidos graxos livres e a lipogênese *de novo*, levando à esteatose, e o segundo *hit*, que desencadearia a necroinflamação com consequente esteatohepatite, incluiria estresse oxidativo, diminuição da produção de ATP hepático e indução de citocinas próinflamatórias.<sup>118</sup>

O estresse oxidativo, em estudo com animais e humanos, foi demonstrado como um fator responsável pela progressão da esteatose para NASH.<sup>210,238-240</sup> Nesse contexto, ele representaria um segundo *hit* importante. O estresse oxidativo no fígado gorduroso tem origem na produção das ROS, como resultado da excessiva oxidação dos ácidos graxos, consequência da superexpressão das enzimas do citocromo P450 2E1 (CYP2E1).<sup>241</sup>

Nosso estudo foi o primeiro a demonstrar que a lipoperoxidação plasmática, aferida por meio da TBARS, se relaciona com a presença de NASH no paciente obeso mórbido, e ainda que os níveis plasmáticos de TBARS se correlacionam com a atividade do *NAS score*.

Já havia evidência de que a obesidade era um fator de risco independente para a lipoperoxidação plasmática. Olusi, em 2002, demonstrou maior lipoperoxidação em obesos mórbidos comparados a controles saudáveis, sugerindo que o estresse oxidativo poderia estar envolvido na gênese das doenças associadas ao excesso de peso.<sup>15</sup> Haveria três possíveis causas para esse fenômeno. Há elevado consumo de oxigênio no miocárdio do obeso, com maior produção de ROS, causada pelo aumento da respiração mitocondrial.<sup>242</sup> Há uma injúria celular progressiva e cumulativa, secundária à grande massa corporal, provavelmente hipóxica, liberando uma série de citocinas que levarão à geração de ROS e consequente lipoperoxidação.<sup>243</sup> Por último, a dieta hiperlipêmica desses pacientes, que altera o metabolismo do oxigênio mitocondrial.<sup>244</sup>

Madan e cols.<sup>245</sup> já relataram que pacientes com DHGNA apresentavam lipoperoxidação plasmática maior do que pacientes com hepatite viral crônica e do que de controles saudáveis. Achados semelhantes foram demonstrados por Yesilova e cols.<sup>14</sup>, que evidenciaram níveis elevados de MDA em pacientes com DHGNA. Esses achados sugeriram que a presença de elevada concentração plasmática de produtos da lipoperoxidação é um fenômeno único e não meramente um produto da inflamação, já que os pacientes com hepatite viral crônica, que apresentavam níveis menores de TBARS, tinham graus maiores de necroinflamação.

Em um modelo experimental de indução de NASH em camundongos, Matsuzawa e cols.<sup>246</sup> verificaram, após uma dieta aterogênica, com alto teor de gordura, a indução de estresse oxidativo. Foram identificados altos níveis de 4-HNE, ativação das células estreladas e inflamação hepática com balonização de hepatócitos. A sobrecarga de colesterol livre na mitocôndria alterou a concentração de glutatona celular, modificando seu metabolismo e a concentração de enzimas antioxidantes, aumentando o estresse oxidativo.<sup>247</sup>

Em 2004, Videla e cols.<sup>238</sup> demonstraram, em obesos mórbidos, que os parâmetros de estresse oxidativo no tecido hepático estão aumentados nos pacientes com DHGNA, quando comparados aos controles sem esteatose hepática, não havendo diferenças entre os grupos com e sem NASH. Houve, entretanto, aumento significativo da atividade da CYP2E1 nos pacientes com esteatohepatite. O aumento da atividade da CYP2E1 poderia ser o responsável pela geração de radicais livres, tornando o fígado mais suscetível ao estresse oxidativo.<sup>248</sup>

Albano e cols. relataram a associação entre os níveis circulantes de IgG contra produtos da peroxidação lipídica e a presença de fibrose avançada e cirrose em pacientes com DHGNA, porém não encontraram diferenças em pacientes com ou sem NASH.<sup>17</sup>

Em 2002, estudo conduzido por Seki e cols.<sup>239</sup> estudou a lipoperoxidação no tecido hepático de pacientes com esteatose isolada, NASH e fígados normais. Foi verificado que os fígados normais não apresentavam dano celular causado pelo HNE, enquanto 78,3% e 100% dos pacientes com esteatose isolada e NASH, respectivamente, apresentavam dano citoplasmático e nas células sinusoidais da zona 3. Detectou também dano nuclear causado pelo estresse oxidativo, mais frequente em pacientes com NASH (64,7%) do que em pacientes com esteatose isolada (8,7%), fato corroborado por Irie e cols.<sup>249</sup>, que demonstraram aumento na concentração hepática e plasmática de produtos resultantes do dano ao DNA pelos radicais livres em pacientes com NASH quando comparados a pacientes com esteatose isolada.

Oliveira e cols.<sup>16</sup> foram os únicos a demonstrar que os obesos mórbidos com NASH apresentavam aumento do estresse oxidativo no tecido hepático, quando comparados a obesos com esteatose isolada.

Há dúvidas se os níveis plasmáticos da peroxidação lipídica se correlacionam com a doença hepática. Na prática clínica, é difícil mensurar os níveis de estresse oxidativo hepático. Por outro lado, com a padronização dos marcadores séricos de estresse

oxidativo, há possibilidade de fácil aferição. Bonnefont-Rousselot e cols.<sup>250</sup> não encontraram essa associação, quando compararam os níveis séricos de TBARS em pacientes com esteatose hepática e hepatite viral, sugerindo que ele não seria um bom marcador para esteatose hepática, entretanto Chalasani e cols.<sup>212</sup> provaram que pacientes com NASH apresentavam altos níveis sistêmicos de produtos de lipoperoxidação, quando comparados a controles normais.

Com as evidências relatadas acima, podemos inferir que o estresse oxidativo participa da fisiopatogênese da DHGNA, não sendo apenas um subproduto da inflamação hepática, mas funcionando como um evento responsável pela evolução de um quadro de esteatose isolada para NASH. No obeso mórbido com DHGNA, a lipoperoxidação não é apenas um evento hepático, mas sim um processo sistêmico, podendo funcionar com um marcador sérico de NASH. Nosso estudo demonstrou esses fatos em obesos mórbidos com DHGNA, verificando níveis sistêmicos elevados de produtos da lipoperoxidação em pacientes com NASH, quando comparados com pacientes com esteatose isolada. Verificou ainda uma correlação dos níveis plasmáticos de TBARS com eventos hepáticos associados à NASH, como balonização hepatocitária e necroinflamação, componentes de atividade do *NAS score*.

Esse fatos podem explicar, em parte, a maior prevalência de NASH encontrada em nosso estudo. Estudos epidemiológicos apontam que, dentre os pacientes com DHGNA, aproximadamente 30% apresentam NASH,<sup>154</sup> entre obesos candidatos à cirurgia bariátrica, a incidência de esteatohepatite é em torno de 37% , podendo chegar a 72,5%.<sup>251</sup> Demonstramos a presença de NASH em 65% dos obesos mórbidos, praticamente o dobro do que a população geral de pacientes com DHGNA. A lipoperoxidação sistêmica elevada em obesos mórbidos poderia acentuar o estresse oxidativo em um ambiente já propício a ele, o tecido hepático, potencializando, desse modo, a necroinflamação e suas consequências. Tal afirmação é embasada em estudo de Emery e cols.<sup>252</sup>, que demonstrou

diminuição da atividade da CYP2E1, fonte de radicais livres, após a realização da cirurgia bariátrica, e por Bell e cols.<sup>253</sup>, que relataram a diminuição da lipoperoxidação hepática no pós-operatório, fatores que explicariam também a melhora da esteatose e fibrose hepática demonstrada em estudos prévios do nosso grupo.<sup>196,197</sup>

Não encontramos diferenças no estado antioxidante plasmático, aferido através da dosagem da enzima SOD, nos pacientes obesos mórbidos com ou sem NASH. Há relatos na literatura demonstrando que a depleção de enzimas antioxidantes, como coenzima Q10, SOD, catalase e glutathione S-transferase, se correlacionam com a severidade da doença hepática.<sup>238,254,255</sup> Outros estudos, entretanto, demonstraram achado semelhante ao nosso, como o Madan e cols.<sup>245</sup> e Videla e cols.<sup>238</sup>. Teoricamente, esperaríamos uma redução na atividade da SOD nos pacientes com NASH. O fato de não termos encontrado essa associação pode ser explicado por uma sobre-regulação das defesas antioxidantes demonstrada em modelo murino de NASH.<sup>256</sup> Em estados de estresse oxidativo crônico, os níveis de SOD estão elevados compensatoriamente.<sup>257,258</sup> Além disso, durante a injúria celular, há liberação de grandes quantidades de SOD,<sup>259</sup> fatores que explicariam nosso achado.

Não verificamos correlação da lipoperoxidação com a presença de comorbidades como DM, HAS e síndrome metabólica. Na literatura, já existem evidências da participação do estresse oxidativo na gênese dessas doenças.<sup>63,260,261</sup> Acredita-se que o aumento do estresse oxidativo, gerado pelo acúmulo de gordura, possa ser o ponto de partida para a ocorrência das complicações metabólicas associadas à obesidade.<sup>262,263</sup> Os produtos da lipoperoxidação poderiam alterar a ação da insulina no músculo esquelético, diminuir a liberação de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas e romper diretamente a ação biológica da insulina.<sup>264,265</sup> Por se tratar de desfechos secundários de nosso estudo, desenhado para verificar a relação da lipoperoxidação com a gravidade da DHGNA, pode ter ocorrido um erro tipo II, faltando poder amostral para verificar essas associações.



Não foi encontrada associação da lipoperoxidação plasmática com os níveis séricos de ferritina. Não existem, pelo nosso conhecimento, estudos que avaliaram essa associação em obesos mórbidos. A ferritina pode servir como protetor contra o dano causado pelas ROS, fato demonstrado por estudos que verificaram aumento da sua concentração após modelo experimental de indução de estresse oxidativo hepático.<sup>266,267</sup> Também há evidência de que o ferro seja um potente catalisador do estresse oxidativo e poderia agir sinergicamente com outros promotores da lipoperoxidação.<sup>268</sup> Existem vários estudos que não documentaram um acúmulo de ferro significativo nos pacientes com NASH, concluindo que a hiperferritinemia é um efeito inespecífico da necroinflamação hepática, refletindo seu papel de proteína de fase aguda.<sup>269-272</sup> Fato esse corroborado por nosso estudo, que demonstrou que a ferritina é um marcador de NASH, sem se relacionar com a lipoperoxidação plasmática.

Também não encontramos correlação entre os níveis plasmáticos de peroxidação lipídica e a proteína C reativa. Sabe-se que a obesidade é um estado de inflamação crônica com aumento de marcadores inflamatórios, e que esses marcadores melhoram após a cirurgia bariátrica.<sup>273</sup> Davi e cols. já demonstraram, em mulheres obesas, associação entre o estresse oxidativo e marcadores inflamatórios.<sup>274</sup> Abramson e cols.<sup>275</sup> atribuíram 29% da variação da PCR como responsabilidade do estresse oxidativo. Não existem evidências de que a lipoperoxidação plasmática apresente relação com marcadores inflamatórios, subentendendo-se que o estresse oxidativo intracelular seja o responsável pela liberação de citocinas inflamatórias pelos adipócitos.

Um fator importante nos obesos mórbidos com DHGNA é a identificação de quais pacientes apresentam NASH. Predizer e prevenir o desenvolvimento de doença hepática avançada nesses pacientes é desafiador e permitiria um acompanhamento rigoroso, ajudando a definir a necessidade de tratamentos mais invasivos como a cirurgia bariátrica. O padrão ouro para diagnóstico e estadiamento da DHGNA é a biópsia hepática, porém

ela apresenta inconvenientes, como risco de complicações de 1 a 3% e, eventualmente, morte em 0,01%,<sup>276</sup> além de problemas amostrais, levando a erros diagnósticos em até 25% dos casos de DHGNA.<sup>277</sup> Há necessidade, portanto, de definir marcadores clínicos e laboratoriais que possam prever a presença de esteatohepatite nesses pacientes.

No nosso estudo, encontramos, como fatores associados à ocorrência de NASH em obesos mórbidos, os níveis séricos de ALT, GGT, TGs, ácido úrico, insulina sérica de jejum, HOMA-IR e ferritina. Também a presença de comorbidades, como HAS e a síndrome metabólica, foram associadas à esteatohepatite. Esses achados são contrários ao relato de Teixeira e *cols.*<sup>278</sup>, que não encontraram nenhum fator preditivo de NASH em obesos mórbidos. Entretanto, em seu estudo, houve uma incidência de apenas 13% de esteatohepatite, questionando-se os critérios histológicos utilizados. Já Salgado Junior e *cols.*<sup>279</sup> também verificaram que enzimas hepáticas, glicemia e triglicérides poderiam ser preditores de NASH.

Os níveis das enzimas hepáticas ALT e GGT, em nosso estudo, relacionaram-se com a ocorrência de NASH. Embora estivessem dentro dos valores considerados normais pela referência, pacientes com NASH apresentaram valores maiores do que grupo com esteatose simples. Este achado vai ao encontro do relato de Prati e *cols.* que verificaram erro na definição dos índices normais dessas enzimas, sugerindo que, para pacientes com DHGNA e hepatite C, fossem adotados níveis menores que os atuais.<sup>280</sup> Em estudo recente, Verma e *cols.*<sup>281</sup> não encontram níveis ótimos de ALT para prever a presença de NASH. Como em obesos mórbidos a probabilidade pré-teste de DHGNA é alta, os níveis elevados de enzimas hepáticas corroboram apenas para o diagnóstico de NASH, não podendo excluir a esteatohepatite em pacientes com valores dentro dos considerados normais.

Em nosso estudo, os níveis de triglicérides foram marcadores de NASH, resultado que vai ao encontro dos achados de Cao e *cols.*<sup>282</sup>, Ratziu e *cols.*<sup>283</sup> e Harnois e *cols.*<sup>284</sup> A

síntese de triglicerídeos está aumentada em fígados gordurosos acompanhados de obesidade e DM2 e esse representaria o primeiro *hit* da DHGNA.<sup>285</sup>

Sirota e cols.<sup>286</sup> demonstraram a associação de elevados níveis de ácido úrico com a DHGNA. Um estudo em crianças já havia demonstrado a associação da hiperuricemia com NASH.<sup>287</sup> Nosso estudo foi o primeiro a descrever essa associação em obesos mórbidos. Possível explicação para esse fato é a diminuição da excreção urinária de ácido úrico induzida pela hiperinsulinemia<sup>288</sup> e a hiperuricemia resultante do estresse oxidativo verificado na síndrome metabólica.<sup>289</sup>

Foi verificada uma marcada diferença na resistência à insulina em pacientes com e sem NASH, aferida através do HOMA-IR. A insulina é responsável pela regulação da expressão da CYP2E1, e a resistência à insulina poderia levar à superexpressão dessa enzima, contribuindo para a geração de ROS e consequente dano hepático nos pacientes com DHGNA.<sup>223,290</sup>

Não encontramos associação entre o diagnóstico de DM2 e NASH, embora pacientes com NASH apresentassem um prevalência maior de DM2 (28,6% versus 13%). Como já existem relatos dessa ligação,<sup>291,292</sup> nosso achado provavelmente se explique pelo tamanho amostral.

Estudos epidemiológicos já relataram uma prevalência maior de HAS, um componente da síndrome metabólica em pacientes com DHGNA.<sup>293-295</sup> A HAS poderia aumentar a produção de ROS vascular, alterando o *status* redox hepático,<sup>296</sup> fato demonstrado por Ikuta e cols.<sup>297</sup> em modelo experimental de indução de DHGNA em ratos hipertensos.

Em nosso estudo, verificamos que todos os homens obesos mórbidos apresentavam NASH, fato similar ao encontrado por Salgado Junior e cols.<sup>279</sup> na mesma população, sugerindo que o sexo masculino seja um preditor de graus mais severos de DHGNA,

embora essa análise esteja sujeita a vieses de seleção de pacientes candidatos à cirurgia bariátrica.

Nenhum fator antropométrico relacionou-se com a ocorrência da NASH entre obesos mórbidos, achado que vai ao encontro de outros relatos,<sup>197,279,298-300</sup> subentendendo-se que, entre obesos mórbidos, a repercussão sistêmica da obesidade é mais importante que o grau dela.

Como foi relatado anteriormente, pode-se constatar que a DHGNA no paciente obeso mórbido é um evento complexo. Vários fatores estão associados à apresentação mais grave e com potencial evolutivo da NASH. São cada vez maiores as evidências de que o estresse oxidativo participa da gênese dessa doença e talvez possa explicar a interação entre esses fatores. Definir quais obesos mórbidos apresentam esteatohepatite é fundamental para a tentativa de evitar a evolução para um quadro de cirrose e insuficiência hepática. Mostramos que a lipoperoxidação plasmática, além de ser marcador de NASH nesses obesos, se correlaciona com a gravidade da doença, provavelmente contribuindo para o dano hepático.

## 8. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo sugerem que:

- A lipoperoxidação plasmática se relaciona com a gravidade da DHGNA, sendo maior nos obesos mórbidos com NASH quando comparados à obesos mórbidos com esteatose simples;

- Há correlação entre os níveis plasmáticos de lipoperoxidação e o *NAS score*;

- Não há diferença nos estatus antioxidante plasmático, aferido pela enzima SOD, nos pacientes obesos mórbidos com esteatose simples e NASH;

- Não há correlação entre a lipoperoxidação plasmática e o metabolismo da glicose aferidos pela resistência à insulina, hemoglobina glicada e o diagnóstico de DM2;

- Não há correlação entre a lipoperoxidação plasmática e o IMC;

- Não há correlação entre a lipoperoxidação plasmática e a presença de comorbidades como HAS e síndrome metabólica;

- Não há correlação da lipoperoxidação plasmática com marcadores inflamatórios como a ferritina sérica e a proteína C reativa;

- São preditores de NASH em obesos mórbidos com DHGNA o sexo masculino, ALT, GGT, triglicerídeos, ácido úrico sérico, insulina de jejum sérica, HOMA-IR, ferritina sérica e o diagnóstico de HAS e síndrome metabólica.

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. Nguyen DM, El-Serag HB. The big burden of obesity. *Gastrointest Endosc* 2009;70:752-7.
2. World Health Organization. Obesity 2013., 2013. (Accessed at [www.who.int/obesity/en](http://www.who.int/obesity/en).)
3. Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest* 2011;121:2094-101.
4. Field AE, Coakley EH, Must A, et al. Impact of overweight on the risk of developing common chronic diseases during a 10-year period. *Arch Intern Med* 2001;161:1581-6.
5. El-Serag H. Role of obesity in GORD-related disorders. *Gut* 2008;57:281-4.
6. Pischon T, Nothlings U, Boeing H. Obesity and cancer. *Proc Nutr Soc* 2008;67:128-45.
7. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002;346:1221-31.
8. Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. *J Clin Gastroenterol* 2006;40 Suppl 1:S5-10.
9. Wree A, Broderick L, Canbay A, Hoffman HM, Feldstein AE. From NAFLD to NASH to cirrhosis-new insights into disease mechanisms. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013;10:627-36.
10. Caporaso N, Morisco F, Camera S, Graziani G, Donnarumma L, Ritieni A. Dietary approach in the prevention and treatment of NAFLD. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2012;17:2259-68.
11. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. *Gastroenterology* 2012;142:1592-609.
12. Mummadi RR, Kasturi KS, Chennareddygari S, Sood GK. Effect of bariatric surgery on nonalcoholic fatty liver disease: systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6:1396-402.
13. Kalyanaraman B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol* 2013;1:244-57.
14. Yesilova Z, Yaman H, Oktenli C, et al. Systemic markers of lipid peroxidation and antioxidants in patients with nonalcoholic Fatty liver disease. *Am J Gastroenterol* 2005;100:850-5.
15. Olusi SO. Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotective enzymes in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002;26:1159-64.
16. Oliveira CP, Faintuch J, Rascovski A, et al. Lipid peroxidation in bariatric candidates with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) -- preliminary findings. *Obes Surg* 2005;15:502-5.
17. Albano E, Mottaran E, Vidali M, et al. Immune response towards lipid peroxidation products as a predictor of progression of non-alcoholic fatty liver disease to advanced fibrosis. *Gut* 2005;54:987-93.
18. Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults--The Evidence Report. National Institutes of Health. *Obes Res* 1998;6 Suppl 2:51S-209S.

19. Gallagher D, Visser M, Sepulveda D, Pierson RN, Harris T, Heymsfield SB. How useful is body mass index for comparison of body fatness across age, sex, and ethnic groups? *Am J Epidemiol* 1996;143:228-39.
20. Deurenberg P, Deurenberg Yap M, Wang J, Lin FP, Schmidt G. The impact of body build on the relationship between body mass index and percent body fat. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999;23:537-42.
21. Rexrode KM, Carey VJ, Hennekens CH, et al. Abdominal adiposity and coronary heart disease in women. *JAMA* 1998;280:1843-8.
22. Lemieux S, Prud'homme D, Bouchard C, Tremblay A, Despres JP. Sex differences in the relation of visceral adipose tissue accumulation to total body fatness. *Am J Clin Nutr* 1993;58:463-7.
23. Ross R, Leger L, Morris D, de Guise J, Guardo R. Quantification of adipose tissue by MRI: relationship with anthropometric variables. *J Appl Physiol* (1985) 1992;72:787-95.
24. Thaete FL, Colberg SR, Burke T, Kelley DE. Reproducibility of computed tomography measurement of visceral adipose tissue area. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995;19:464-7.
25. Erselcan T, Candan F, Saruhan S, Ayca T. Comparison of body composition analysis methods in clinical routine. *Ann Nutr Metab* 2000;44:243-8.
26. Peterson MJ, Czerwinski SA, Siervogel RM. Development and validation of skinfold-thickness prediction equations with a 4-compartment model. *Am J Clin Nutr* 2003;77:1186-91.
27. Eckerson JM, Stout JR, Housh TJ, Johnson GO. Validity of bioelectrical impedance equations for estimating percent fat in males. *Med Sci Sports Exerc* 1996;28:523-30.
28. Wing RR, Jeffery RW, Burton LR, Thorson C, Kuller LH, Folsom AR. Change in waist-hip ratio with weight loss and its association with change in cardiovascular risk factors. *Am J Clin Nutr* 1992;55:1086-92.
29. Molarius A, Seidell JC, Sans S, Tuomilehto J, Kuulasmaa K. Waist and hip circumferences, and waist-hip ratio in 19 populations of the WHO MONICA Project. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999;23:116-25.
30. Pereira RA, Sichieri R, Marins VM. [Waist:hips girth ratio as a predictor of arterial hypertension]. *Cad Saude Publica* 1999;15:333-44.
31. Lean ME, Han TS, Morrison CE. Waist circumference as a measure for indicating need for weight management. *BMJ* 1995;311:158-61.
32. Kelly T, Yang W, Chen CS, Reynolds K, He J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *Int J Obes (Lond)* 2008;32:1431-7.
33. Flegal KM, Carroll MD, Kit BK, Ogden CL. Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999-2010. *JAMA* 2012;307:491-7.
34. Finkelstein EA, Khavjou OA, Thompson H, et al. Obesity and severe obesity forecasts through 2030. *Am J Prev Med* 2012;42:563-70.
35. Wang YC, McPherson K, Marsh T, Gortmaker SL, Brown M. Health and economic burden of the projected obesity trends in the USA and the UK. *Lancet* 2011;378:815-25.
36. Moura EC, Claro RM. Estimates of obesity trends in Brazil, 2006-2009. *Int J Public Health* 2012;57:127-33.
37. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. 2010.
38. Kant AK, Graubard BI. Secular trends in patterns of self-reported food consumption of adult Americans: NHANES 1971-1975 to NHANES 1999-2002. *Am J Clin Nutr* 2006;84:1215-23.

39. Dietz WH, Jr., Gortmaker SL. Do we fatten our children at the television set? Obesity and television viewing in children and adolescents. *Pediatrics* 1985;75:807-12.
40. Algire C, Medrikova D, Herzig S. White and brown adipose stem cells: from signaling to clinical implications. *Biochim Biophys Acta* 2013;1831:896-904.
41. Daquinag AC, Zhang Y, Kolonin MG. Vascular targeting of adipose tissue as an anti-obesity approach. *Trends Pharmacol Sci* 2011;32:300-7.
42. Trayhurn P. Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. *Physiol Rev* 2013;93:1-21.
43. Poissonnet CM, Burdi AR, Garn SM. The chronology of adipose tissue appearance and distribution in the human fetus. *Early Hum Dev* 1984;10:1-11.
44. Cinti S. The adipose organ: morphological perspectives of adipose tissues. *Proc Nutr Soc* 2001;60:319-28.
45. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997;276:71-4.
46. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-7.
47. Rosen ED, Spiegelman BM. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 2006;444:847-53.
48. Yudkin JS. Adipose tissue, insulin action and vascular disease: inflammatory signals. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003;27 Suppl 3:S25-8.
49. Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzabal FJ, Burrell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;280:E827-47.
50. Rajala MW, Scherer PE. Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology* 2003;144:3765-73.
51. Trayhurn P, Drevon CA, Eckel J. Secreted proteins from adipose tissue and skeletal muscle - adipokines, myokines and adipose/muscle cross-talk. *Arch Physiol Biochem* 2011;117:47-56.
52. Emilsson V, Liu YL, Cawthorne MA, Morton NM, Davenport M. Expression of the functional leptin receptor mRNA in pancreatic islets and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion. *Diabetes* 1997;46:313-6.
53. Bouloumie A, Drexler HC, Lafontan M, Busse R. Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Circ Res* 1998;83:1059-66.
54. Yokota T, Oritani K, Takahashi I, et al. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood* 2000;96:1723-32.
55. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* 2001;7:941-6.
56. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993;259:87-91.
57. Wang Z, Lv J, Zhang R, et al. Co-culture with fat cells induces cellular insulin resistance in primary hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;345:976-83.
58. Wisse BE. The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:2792-800.



59. Tozzo E, Gnudi L, Kahn BB. Amelioration of insulin resistance in streptozotocin diabetic mice by transgenic overexpression of GLUT4 driven by an adipose-specific promoter. *Endocrinology* 1997;138:1604-11.
60. Kim JK, Michael MD, Previs SF, et al. Redistribution of substrates to adipose tissue promotes obesity in mice with selective insulin resistance in muscle. *J Clin Invest* 2000;105:1791-7.
61. Mittra S, Bansal VS, Bhatnagar PK. From a glucocentric to a lipocentric approach towards metabolic syndrome. *Drug Discov Today* 2008;13:211-8.
62. Shen J, Obin MS, Zhao L. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Mol Aspects Med* 2013;34:39-58.
63. Houstis N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 2006;440:944-8.
64. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1963;1:785-9.
65. Charles MA, Eschwege E, Thibault N, et al. The role of non-esterified fatty acids in the deterioration of glucose tolerance in Caucasian subjects: results of the Paris Prospective Study. *Diabetologia* 1997;40:1101-6.
66. Petersen KF, Shulman GI. New insights into the pathogenesis of insulin resistance in humans using magnetic resonance spectroscopy. *Obesity (Silver Spring)* 2006;14 Suppl 1:34S-40S.
67. Petersen KF, Hendler R, Price T, et al. <sup>13</sup>C/<sup>31</sup>P NMR studies on the mechanism of insulin resistance in obesity. *Diabetes* 1998;47:381-6.
68. Rothman DL, Shulman RG, Shulman GI. <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance measurements of muscle glucose-6-phosphate. Evidence for reduced insulin-dependent muscle glucose transport or phosphorylation activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1992;89:1069-75.
69. Getty L, Panteleon AE, Mittelman SD, Dea MK, Bergman RN. Rapid oscillations in omental lipolysis are independent of changing insulin levels in vivo. *J Clin Invest* 2000;106:421-30.
70. Yoshii H, Lam TK, Gupta N, et al. Effects of portal free fatty acid elevation on insulin clearance and hepatic glucose flux. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;290:E1089-97.
71. Gregor MF, Hotamisligil GS. Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *J Lipid Res* 2007;48:1905-14.
72. Eriksson JW. Metabolic stress in insulin's target cells leads to ROS accumulation - a hypothetical common pathway causing insulin resistance. *FEBS Lett* 2007;581:3734-42.
73. Sirin O, Kolonin MG. Treatment of obesity as a potential complementary approach to cancer therapy. *Drug Discov Today* 2012.
74. Okabayashi K, Ashrafian H, Hasegawa H, et al. Body mass index category as a risk factor for colorectal adenomas: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2012;107:1175-85; quiz 86.
75. Chen Y, Wang X, Wang J, Yan Z, Luo J. Excess body weight and the risk of primary liver cancer: an updated meta-analysis of prospective studies. *Eur J Cancer* 2012;48:2137-45.
76. Aune D, Greenwood DC, Chan DS, et al. Body mass index, abdominal fatness and pancreatic cancer risk: a systematic review and non-linear dose-response meta-analysis of prospective studies. *Ann Oncol* 2012;23:843-52.

77. Hursting SD, Berger NA. Energy balance, host-related factors, and cancer progression. *J Clin Oncol* 2010;28:4058-65.
78. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* 2008;371:569-78.
79. Kress AM, Hartzel MC, Peterson MR. Burden of disease associated with overweight and obesity among U.S. military retirees and their dependents, aged 38-64, 2003. *Prev Med* 2005;41:63-9.
80. Patterson RE, Frank LL, Kristal AR, White E. A comprehensive examination of health conditions associated with obesity in older adults. *Am J Prev Med* 2004;27:385-90.
81. Nguyen NT, Magno CP, Lane KT, Hinojosa MW, Lane JS. Association of hypertension, diabetes, dyslipidemia, and metabolic syndrome with obesity: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999 to 2004. *J Am Coll Surg* 2008;207:928-34.
82. Ayyad C, Andersen T. Long-term efficacy of dietary treatment of obesity: a systematic review of studies published between 1931 and 1999. *Obes Rev* 2000;1:113-9.
83. Sodlerlund A, Fischer A, Johansson T. Physical activity, diet and behaviour modification in the treatment of overweight and obese adults: a systematic review. *Perspect Public Health* 2009;129:132-42.
84. Franz MJ, VanWormer JJ, Crain AL, et al. Weight-loss outcomes: a systematic review and meta-analysis of weight-loss clinical trials with a minimum 1-year follow-up. *J Am Diet Assoc* 2007;107:1755-67.
85. Cercato C, Roizenblatt VA, Leanca CC, et al. A randomized double-blind placebo-controlled study of the long-term efficacy and safety of diethylpropion in the treatment of obese subjects. *Int J Obes (Lond)* 2009;33:857-65.
86. Li Z, Maglione M, Tu W, et al. Meta-analysis: pharmacologic treatment of obesity. *Ann Intern Med* 2005;142:532-46.
87. Cohen PA. Imported fenproporex-based diet pills from Brazil: a report of two cases. *J Gen Intern Med* 2009;24:430-3.
88. Cody JT, Valtier S, Stillman S. Amphetamine and fenproporex levels following multidose administration of fenproporex. *J Anal Toxicol* 1999;23:187-94.
89. Slama G, Selmi A, Haute couverture M, Tchobroutsky G. Double blind clinical trial of mazindol on weight loss blood glucose, plasma insulin and serum lipids in overweight diabetic patients. *Diabete Metab* 1978;4:193-9.
90. Arterburn DE, Crane PK, Veenstra DL. The efficacy and safety of sibutramine for weight loss: a systematic review. *Arch Intern Med* 2004;164:994-1003.
91. Bray GA, Blackburn GL, Ferguson JM, et al. Sibutramine produces dose-related weight loss. *Obes Res* 1999;7:189-98.
92. Fujioka K, Seaton TB, Rowe E, et al. Weight loss with sibutramine improves glycaemic control and other metabolic parameters in obese patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab* 2000;2:175-87.
93. James WP, Caterson ID, Coutinho W, et al. Effect of sibutramine on cardiovascular outcomes in overweight and obese subjects. *N Engl J Med* 2010;363:905-17.
94. Rucker D, Padwal R, Li SK, Curioni C, Lau DC. Long term pharmacotherapy for obesity and overweight: updated meta-analysis. *BMJ* 2007;335:1194-9.

95. Torgerson JS, Hauptman J, Boldrin MN, Sjoström L. XENical in the prevention of diabetes in obese subjects (XENDOS) study: a randomized study of orlistat as an adjunct to lifestyle changes for the prevention of type 2 diabetes in obese patients. *Diabetes Care* 2004;27:155-61.
96. Adams TD, Gress RE, Smith SC, et al. Long-term mortality after gastric bypass surgery. *N Engl J Med* 2007;357:753-61.
97. Mingrone G, Panunzi S, De Gaetano A, et al. Bariatric surgery versus conventional medical therapy for type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2012;366:1577-85.
98. Schauer PR, Kashyap SR, Wolski K, et al. Bariatric surgery versus intensive medical therapy in obese patients with diabetes. *N Engl J Med* 2012;366:1567-76.
99. Scherlock S, Dooley J. Doenças do Fígado e do sistema biliar. 11ª ed: Guanabara Koogan; 2004.
100. Hafeez S, Ahmed MH. Bariatric surgery as potential treatment for nonalcoholic fatty liver disease: a future treatment by choice or by chance? *J Obes* 2013;2013:839275.
101. American Gastroenterological Association medical position statement: nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002;123:1702-4.
102. Mulhall BP, Ong JP, Younossi ZM. Non-alcoholic fatty liver disease: an overview. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:1136-43.
103. Angulo P, Lindor KD. Non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17 Suppl:S186-90.
104. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999;116:1413-9.
105. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 2004;40:1387-95.
106. Feldman M, Friedman LS, Sleisenger M. Non-alcoholic fatty liver disease. 7ª ed: WB Saunders; 2002.
107. Weston SR, Leyden W, Murphy R, et al. Racial and ethnic distribution of nonalcoholic fatty liver in persons with newly diagnosed chronic liver disease. *Hepatology* 2005;41:372-9.
108. Gupte P, Amarapurkar D, Agal S, et al. Non-alcoholic steatohepatitis in type 2 diabetes mellitus. *J Gastroenterol Hepatol* 2004;19:854-8.
109. Boza C, Riquelme A, Ibanez L, et al. Predictors of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) in obese patients undergoing gastric bypass. *Obes Surg* 2005;15:1148-53.
110. Srivastava S, Younossi ZM. Morbid obesity, nonalcoholic fatty liver disease, and weight loss surgery. *Hepatology* 2005;42:490-2.
111. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology* 2005;42:44-52.
112. Levene AP, Goldin RD. The epidemiology, pathogenesis and histopathology of fatty liver disease. *Histopathology* 2012;61:141-52.
113. Scaglioni F, Ciccia S, Marino M, Bedogni G, Bellentani S. ASH and NASH. *Dig Dis* 2011;29:202-10.
114. Shi JP, Fan JG, Wu R, et al. Prevalence and risk factors of hepatic steatosis and its impact on liver injury in Chinese patients with chronic hepatitis B infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23:1419-25.

115. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther* 2011;34:274-85.
116. Paredes AH, Torres DM, Harrison SA. Nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis* 2012;16:397-419.
117. McCullough AJ. Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol* 2006;40 Suppl 1:S17-29.
118. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998;114:842-5.
119. Day CP. From fat to inflammation. *Gastroenterology* 2006;130:207-10.
120. Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, et al. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- $\alpha$  expression via a lysosomal pathway. *Hepatology* 2004;40:185-94.
121. Yamaguchi K, Yang L, McCall S, et al. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2007;45:1366-74.
122. Jou J, Choi SS, Diehl AM. Mechanisms of disease progression in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis* 2008;28:370-9.
123. Roskams T, Yang SQ, Koteish A, et al. Oxidative stress and oval cell accumulation in mice and humans with alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Pathol* 2003;163:1301-11.
124. Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest* 2008;118:829-38.
125. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2005;115:1343-51.
126. Adams LA, Angulo P, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. *CMAJ* 2005;172:899-905.
127. Charlton M, Sreekumar R, Rasmussen D, Lindor K, Nair KS. Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2002;35:898-904.
128. Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev* 2002;23:201-29.
129. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:85-96.
130. Cai D, Yuan M, Frantz DF, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- $\beta$  and NF- $\kappa$ B. *Nat Med* 2005;11:183-90.
131. Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF- $\alpha$  or adiponectin? *Hepatology* 2004;40:46-54.
132. Crespo J, Cayon A, Fernandez-Gil P, et al. Gene expression of tumor necrosis factor  $\alpha$  and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology* 2001;34:1158-63.
133. Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, et al. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of I $\kappa$ B $\beta$ . *Science* 2001;293:1673-7.
134. Klover PJ, Clementi AH, Mooney RA. Interleukin-6 depletion selectively improves hepatic insulin action in obesity. *Endocrinology* 2005;146:3417-27.

135. Huang XD, Fan Y, Zhang H, et al. Serum leptin and soluble leptin receptor in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2008;14:2888-93.
136. Berg AH, Combs TP, Scherer PE. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2002;13:84-9.
137. Kaser S, Moschen A, Cayon A, et al. Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2005;54:117-21.
138. Lemoine M, Ratziu V, Kim M, et al. Serum adipokine levels predictive of liver injury in non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2009;29:1431-8.
139. Sell S. Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells. *Hepatology* 2001;33:738-50.
140. Roskams TA, Theise ND, Balabaud C, et al. Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology* 2004;39:1739-45.
141. Richardson MM, Jonsson JR, Powell EE, et al. Progressive fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis: association with altered regeneration and a ductular reaction. *Gastroenterology* 2007;133:80-90.
142. Svegliati-Baroni G, De Minicis S, Marziani M. Hepatic fibrogenesis in response to chronic liver injury: novel insights on the role of cell-to-cell interaction and transition. *Liver Int* 2008;28:1052-64.
143. Xia JL, Dai C, Michalopoulos GK, Liu Y. Hepatocyte growth factor attenuates liver fibrosis induced by bile duct ligation. *Am J Pathol* 2006;168:1500-12.
144. Petta S, Muratore C, Craxi A. Non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis: the present and the future. *Dig Liver Dis* 2009;41:615-25.
145. Hirschhorn JN, Gajdos ZK. Genome-wide association studies: results from the first few years and potential implications for clinical medicine. *Annu Rev Med* 2011;62:11-24.
146. Zeybel M, Hardy T, Wong YK, et al. Multigenerational epigenetic adaptation of the hepatic wound-healing response. *Nat Med* 2012;18:1369-77.
147. Schwimmer JB, Celedon MA, Lavine JE, et al. Heritability of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2009;136:1585-92.
148. Wilfred de Alwis NM, Day CP. Genetics of alcoholic liver disease and nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis* 2007;27:44-54.
149. Dixon JB, Bhathal PS, Jonsson JR, Dixon AF, Powell EE, O'Brien PE. Pro-fibrotic polymorphisms predictive of advanced liver fibrosis in the severely obese. *J Hepatol* 2003;39:967-71.
150. Stepanova M, Younossi ZM. Independent association between nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular disease in the US population. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012;10:646-50.
151. Caldwell S, Argo C. The natural history of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis* 2010;28:162-8.
152. Rafiq N, Bai C, Fang Y, et al. Long-term follow-up of patients with nonalcoholic fatty liver. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009;7:234-8.
153. Adams LA, Lymp JF, St Sauver J, et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology* 2005;129:113-21.
154. McCullough AJ. The clinical features, diagnosis and natural history of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis* 2004;8:521-33, viii.
155. Argo CK, Northup PG, Al-Osaimi AM, Caldwell SH. Systematic review of risk factors for fibrosis progression in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2009;51:371-9.

156. Pais R, Pascale A, Fedchuck L, Charlotte F, Poynard T, Ratziu V. Progression from isolated steatosis to steatohepatitis and fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2011;35:23-8.
157. Pais R, Charlotte F, Fedchuk L, et al. A systematic review of follow-up biopsies reveals disease progression in patients with non-alcoholic fatty liver. *J Hepatol* 2013;59:550-6.
158. Harrison SA, Torgerson S, Hayashi PH. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a clinical histopathological study. *Am J Gastroenterol* 2003;98:2042-7.
159. Powell EE, Cooksley WG, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell LW. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology* 1990;11:74-80.
160. Fassio E, Alvarez E, Dominguez N, Landeira G, Longo C. Natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a longitudinal study of repeat liver biopsies. *Hepatology* 2004;40:820-6.
161. Hui JM, Kench JG, Chitturi S, et al. Long-term outcomes of cirrhosis in nonalcoholic steatohepatitis compared with hepatitis C. *Hepatology* 2003;38:420-7.
162. Marrero JA, Fontana RJ, Su GL, Conjeevaram HS, Emick DM, Lok AS. NAFLD may be a common underlying liver disease in patients with hepatocellular carcinoma in the United States. *Hepatology* 2002;36:1349-54.
163. Powell EE, Jonsson JR, Clouston AD. Steatosis: co-factor in other liver diseases. *Hepatology* 2005;42:5-13.
164. Adams LA, Angulo P. Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease. *Diabet Med* 2005;22:1129-33.
165. Targher G, Arcaro G. Non-alcoholic fatty liver disease and increased risk of cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 2007;191:235-40.
166. Oni ET, Agatston AS, Blaha MJ, et al. A systematic review: Burden and severity of subclinical cardiovascular disease among those with nonalcoholic fatty liver; Should we care? *Atherosclerosis* 2013;230:258-67.
167. Targher G, Bertolini L, Padovani R, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2007;30:1212-8.
168. Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 2006;43:S99-S112.
169. Poynard T, Ratziu V, Naveau S, et al. The diagnostic value of biomarkers (SteatoTest) for the prediction of liver steatosis. *Comp Hepatol* 2005;4:10.
170. Lassailly G, Caiazzo R, Hollebecque A, et al. Validation of noninvasive biomarkers (FibroTest, SteatoTest, and NashTest) for prediction of liver injury in patients with morbid obesity. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011;23:499-506.
171. Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, et al. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol* 2006;6:33.
172. Kotronen A, Peltonen M, Hakkarainen A, et al. Prediction of non-alcoholic fatty liver disease and liver fat using metabolic and genetic factors. *Gastroenterology* 2009;137:865-72.
173. Graif M, Yanuka M, Baraz M, et al. Quantitative estimation of attenuation in ultrasound video images: correlation with histology in diffuse liver disease. *Invest Radiol* 2000;35:319-24.

174. Palmentieri B, de Sio I, La Mura V, et al. The role of bright liver echo pattern on ultrasound B-mode examination in the diagnosis of liver steatosis. *Dig Liver Dis* 2006;38:485-9.
175. Strauss S, Gavish E, Gottlieb P, Katsnelson L. Interobserver and intraobserver variability in the sonographic assessment of fatty liver. *AJR Am J Roentgenol* 2007;189:W320-3.
176. Mottin CC, Moretto M, Padoin AV, et al. The role of ultrasound in the diagnosis of hepatic steatosis in morbidly obese patients. *Obes Surg* 2004;14:635-7.
177. Fierbinteanu-Braticevici C, Dina I, Petrisor A, Tribus L, Negreanu L, Carstoiu C. Noninvasive investigations for non alcoholic fatty liver disease and liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2010;16:4784-91.
178. McPherson S, Jonsson JR, Cowin GJ, et al. Magnetic resonance imaging and spectroscopy accurately estimate the severity of steatosis provided the stage of fibrosis is considered. *J Hepatol* 2009;51:389-97.
179. Suzuki A, Lymp J, Sauver JS, Angulo P, Lindor K. Values and limitations of serum aminotransferases in clinical trials of nonalcoholic steatohepatitis. *Liver Int* 2006;26:1209-16.
180. Nomura K, Yano E, Shinozaki T, Tagawa K. Efficacy and effectiveness of liver screening program to detect fatty liver in the periodic health check-ups. *J Occup Health* 2004;46:423-8.
181. Gholam PM, Flancbaum L, Machan JT, Charney DA, Kotler DP. Nonalcoholic fatty liver disease in severely obese subjects. *Am J Gastroenterol* 2007;102:399-408.
182. Bugianesi E, Pagotto U, Manini R, et al. Plasma adiponectin in nonalcoholic fatty liver is related to hepatic insulin resistance and hepatic fat content, not to liver disease severity. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:3498-504.
183. Jarrar MH, Baranova A, Collantes R, et al. Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;27:412-21.
184. Shimada M, Kawahara H, Ozaki K, et al. Usefulness of a combined evaluation of the serum adiponectin level, HOMA-IR, and serum type IV collagen 7S level to predict the early stage of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2007;102:1931-8.
185. Wieckowska A, Feldstein AE. Diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease: invasive versus noninvasive. *Semin Liver Dis* 2008;28:386-95.
186. Pohl A, Behling C, Oliver D, Kilani M, Monson P, Hassanein T. Serum aminotransferase levels and platelet counts as predictors of degree of fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol* 2001;96:3142-6.
187. Nonalcoholic steatohepatitis clinical research network. *Hepatology* 2003;37:244.
188. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;41:1313-21.
189. Ratziu V, Bellentani S, Cortez-Pinto H, Day C, Marchesini G. A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. *J Hepatol* 2010;53:372-84.
190. Farrell GC, Chitturi S, Lau GK, Sollano JD. Guidelines for the assessment and management of non-alcoholic fatty liver disease in the Asia-Pacific region: executive summary. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22:775-7.

191. Fan JG, Jia JD, Li YM, et al. Guidelines for the diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: update 2010: (published in Chinese on Chinese Journal of Hepatology 2010; 18:163-166). *J Dig Dis* 2011;12:38-44.
192. Loria P, Adinolfi LE, Bellentani S, et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease. A decalogue from the Italian Association for the Study of the Liver (AISF) Expert Committee. *Dig Liver Dis* 2010;42:272-82.
193. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology* 2012;55:2005-23.
194. Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, et al. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2010;362:1675-85.
195. Reid AE. Nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2001;121:710-23.
196. Mottin CC, Moretto M, Padoin AV, et al. Histological behavior of hepatic steatosis in morbidly obese patients after weight loss induced by bariatric surgery. *Obes Surg* 2005;15:788-93.
197. Moretto M, Kupski C, da Silva VD, Padoin AV, Mottin CC. Effect of bariatric surgery on liver fibrosis. *Obes Surg* 2012;22:1044-9.
198. Mathurin P, Hollebecque A, Arnalsteen L, et al. Prospective study of the long-term effects of bariatric surgery on liver injury in patients without advanced disease. *Gastroenterology* 2009;137:532-40.
199. Kral JG, Thung SN, Biron S, et al. Effects of surgical treatment of the metabolic syndrome on liver fibrosis and cirrhosis. *Surgery* 2004;135:48-58.
200. Klein S, Mittendorfer B, Eagon JC, et al. Gastric bypass surgery improves metabolic and hepatic abnormalities associated with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2006;130:1564-72.
201. Mathurin P, Gonzalez F, Kerdraon O, et al. The evolution of severe steatosis after bariatric surgery is related to insulin resistance. *Gastroenterology* 2006;130:1617-24.
202. Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 1973;134:707-16.
203. Medina J, Moreno-Otero R. Pathophysiological basis for antioxidant therapy in chronic liver disease. *Drugs* 2005;65:2445-61.
204. Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 2010;48:749-62.
205. Singal AK, Jampana SC, Weinman SA. Antioxidants as therapeutic agents for liver disease. *Liver Int* 2011;31:1432-48.
206. Guimaraes EL, Franceschi MF, Grivicich I, et al. Relationship between oxidative stress levels and activation state on a hepatic stellate cell line. *Liver Int* 2006;26:477-85.
207. D'Autreaux B, Toledano MB. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:813-24.
208. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991;11:81-128.
209. Benzie IF. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *Int J Food Sci Nutr* 1996;47:233-61.



210. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001;120:1183-92.
211. MacDonald GA, Bridle KR, Ward PJ, et al. Lipid peroxidation in hepatic steatosis in humans is associated with hepatic fibrosis and occurs predominately in acinar zone 3. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:599-606.
212. Chalasani N, Deeg MA, Crabb DW. Systemic levels of lipid peroxidation and its metabolic and dietary correlates in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2004;99:1497-502.
213. Anania FA, Womack L, Jiang M, Saxena NK. Aldehydes potentiate alpha(2)(I) collagen gene activity by JNK in hepatic stellate cells. *Free Radic Biol Med* 2001;30:846-57.
214. George J, Pera N, Phung N, Leclercq I, Yun Hou J, Farrell G. Lipid peroxidation, stellate cell activation and hepatic fibrogenesis in a rat model of chronic steatohepatitis. *J Hepatol* 2003;39:756-64.
215. Casini A, Ceni E, Salzano R, et al. Neutrophil-derived superoxide anion induces lipid peroxidation and stimulates collagen synthesis in human hepatic stellate cells: role of nitric oxide. *Hepatology* 1997;25:361-7.
216. Bloch-Damti A, Bashan N. Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:1553-67.
217. Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:816-23.
218. Mates JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 2000;153:83-104.
219. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1995;64:97-112.
220. Bonekamp NA, Volkl A, Fahimi HD, Schrader M. Reactive oxygen species and peroxisomes: struggling for balance. *Biofactors* 2009;35:346-55.
221. Cankurtaran M, Kav T, Yavuz B, et al. Serum vitamin-E levels and its relation to clinical features in nonalcoholic fatty liver disease with elevated ALT levels. *Acta Gastroenterol Belg* 2006;69:5-11.
222. Koruk M, Taysi S, Savas MC, Yilmaz O, Akcay F, Karakok M. Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Clin Lab Sci* 2004;34:57-62.
223. Rolo AP, Teodoro JS, Palmeira CM. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med* 2012;52:59-69.
224. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2012;35 Suppl 1:S64-71.
225. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA* 2003;289:2560-72.
226. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med* 2006;23:469-80.
227. Yagi K. Assay for blood plasma or serum. *Methods Enzymol* 1984;105:328-31.
228. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978;52:302-10.

229. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972;247:3170-5.
230. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 1979;11:447-55.
231. Fabbrini E, Sullivan S, Klein S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology* 2010;51:679-89.
232. Bellentani S, Scaglioni F, Marino M, Bedogni G. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis* 2010;28:155-61.
233. Moretto M, Kupski C, Mottin CC, et al. Hepatic steatosis in patients undergoing bariatric surgery and its relationship to body mass index and comorbidities. *Obes Surg* 2003;13:622-4.
234. Yilmaz Y, Younossi ZM. Obesity-associated nonalcoholic Fatty liver disease. *Clin Liver Dis* 2014;18:19-31.
235. Liu CJ. Prevalence and risk factors for non-alcoholic fatty liver disease in Asian people who are not obese. *J Gastroenterol Hepatol* 2012;27:1555-60.
236. Jakobsen MU, Berentzen T, Sorensen TI, Overvad K. Abdominal obesity and fatty liver. *Epidemiol Rev* 2007;29:77-87.
237. Tran A, Gual P. Non-alcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2013;37:17-29.
238. Videla LA, Rodrigo R, Orellana M, et al. Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. *Clin Sci (Lond)* 2004;106:261-8.
239. Seki S, Kitada T, Yamada T, Sakaguchi H, Nakatani K, Wakasa K. In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases. *J Hepatol* 2002;37:56-62.
240. Pessayre D, Fromenty B. NASH: a mitochondrial disease. *J Hepatol* 2005;42:928-40.
241. Weltman MD, Farrell GC, Hall P, Ingelman-Sundberg M, Liddle C. Hepatic cytochrome P450 2E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1998;27:128-33.
242. Turrens JF. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep* 1997;17:3-8.
243. Lechleitner M, Koch T, Herold M, Dzien A, Hoppichler F. Tumour necrosis factor-alpha plasma level in patients with type 1 diabetes mellitus and its association with glycaemic control and cardiovascular risk factors. *J Intern Med* 2000;248:67-76.
244. Moor de Burgos A, Wartanowicz M, Ziemiński S. Blood vitamin and lipid levels in overweight and obese women. *Eur J Clin Nutr* 1992;46:803-8.
245. Madan K, Bhardwaj P, Thareja S, Gupta SD, Saraya A. Oxidant stress and antioxidant status among patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *J Clin Gastroenterol* 2006;40:930-5.
246. Matsuzawa N, Takamura T, Kurita S, et al. Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology* 2007;46:1392-403.
247. Nobili V, Pastore A, Gaeta LM, et al. Glutathione metabolism and antioxidant enzymes in patients affected by nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Chim Acta* 2005;355:105-11.

248. Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, Gonzalez FJ, Robertson GR. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest* 2000;105:1067-75.
249. Irie M, Sohda T, Iwata K, et al. Levels of the oxidative stress marker gamma-glutamyltranspeptidase at different stages of nonalcoholic fatty liver disease. *J Int Med Res* 2012;40:924-33.
250. Bonnefont-Rousselot D, Ratziu V, Giral P, Charlotte F, Beucler I, Poynard T. Blood oxidative stress markers are unreliable markers of hepatic steatosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;23:91-8.
251. Lazo M, Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: a global perspective. *Semin Liver Dis* 2008;28:339-50.
252. Emery MG, Fisher JM, Chien JY, et al. CYP2E1 activity before and after weight loss in morbidly obese subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2003;38:428-35.
253. Bell LN, Temm CJ, Saxena R, et al. Bariatric surgery-induced weight loss reduces hepatic lipid peroxidation levels and affects hepatic cytochrome P-450 protein content. *Ann Surg* 2010;251:1041-8.
254. Leclercq IA. Antioxidant defence mechanisms: new players in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis? *Clin Sci (Lond)* 2004;106:235-7.
255. Sreekumar R, Rosado B, Rasmussen D, Charlton M. Hepatic gene expression in histologically progressive nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003;38:244-51.
256. Santamaria E, Avila MA, Latasa MU, et al. Functional proteomics of nonalcoholic steatohepatitis: mitochondrial proteins as targets of S-adenosylmethionine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:3065-70.
257. Broide E, Klinowski E, Koukoulis G, et al. Superoxide dismutase activity in children with chronic liver diseases. *J Hepatol* 2000;32:188-92.
258. Laybutt DR, Kaneto H, Hasenkamp W, et al. Increased expression of antioxidant and antiapoptotic genes in islets that may contribute to beta-cell survival during chronic hyperglycemia. *Diabetes* 2002;51:413-23.
259. Kassab-Chekir A, Laradi S, Ferchichi S, et al. Oxidant, antioxidant status and metabolic data in patients with beta-thalassemia. *Clin Chim Acta* 2003;338:79-86.
260. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;414:813-20.
261. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004;114:1752-61.
262. Findeisen HM, Gizard F, Zhao Y, et al. Glutathione depletion prevents diet-induced obesity and enhances insulin sensitivity. *Obesity (Silver Spring)* 2011;19:2429-32.
263. Bashan N, Kovsan J, Kachko I, Ovadia H, Rudich A. Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. *Physiol Rev* 2009;89:27-71.
264. Pillon NJ, Croze ML, Vella RE, Soulere L, Lagarde M, Soulage CO. The lipid peroxidation by-product 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) induces insulin resistance in skeletal muscle through both carbonyl and oxidative stress. *Endocrinology* 2012;153:2099-111.
265. Ingram KH, Hill H, Moellering DR, et al. Skeletal muscle lipid peroxidation and insulin resistance in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:E1182-6.
266. Cairo G, Tacchini L, Pogliaghi G, Anzon E, Tomasi A, Bernelli-Zazzera A. Induction of ferritin synthesis by oxidative stress. Transcriptional and post-

- transcriptional regulation by expansion of the "free" iron pool. *J Biol Chem* 1995;270:700-3.
267. Orino K, Lehman L, Tsuji Y, Ayaki H, Torti SV, Torti FM. Ferritin and the response to oxidative stress. *Biochem J* 2001;357:241-7.
268. Sumida Y, Yoshikawa T, Okanoue T. Role of hepatic iron in non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res* 2009;39:213-22.
269. Younossi ZM, Gramlich T, Bacon BR, et al. Hepatic iron and nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 1999;30:847-50.
270. Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1999;30:1356-62.
271. Duseja A, Das R, Nanda M, Das A, Garewal G, Chawla Y. Nonalcoholic steatohepatitis in Asian Indians is neither associated with iron overload nor with HFE gene mutations. *World J Gastroenterol* 2005;11:393-5.
272. Chitturi S, Weltman M, Farrell GC, et al. HFE mutations, hepatic iron, and fibrosis: ethnic-specific association of NASH with C282Y but not with fibrotic severity. *Hepatology* 2002;36:142-9.
273. Rao SR. Inflammatory markers and bariatric surgery: a meta-analysis. *Inflamm Res* 2012;61:789-807.
274. Davi G, Guagnano MT, Ciabattoni G, et al. Platelet activation in obese women: role of inflammation and oxidant stress. *JAMA* 2002;288:2008-14.
275. Abramson JL, Hooper WC, Jones DP, et al. Association between novel oxidative stress markers and C-reactive protein among adults without clinical coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2005;178:115-21.
276. Bravo AA, Sheth SG, Chopra S. Liver biopsy. *N Engl J Med* 2001;344:495-500.
277. Merriman RB, Ferrell LD, Patti MG, et al. Correlation of paired liver biopsies in morbidly obese patients with suspected nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2006;44:874-80.
278. Teixeira AR, Bellodi-Privato M, Carvalheira JB, Pilla VF, Pareja JC, D'Albuquerque LA. The incapacity of the surgeon to identify NASH in bariatric surgery makes biopsy mandatory. *Obes Surg* 2009;19:1678-84.
279. Junior WS, Nonino-Borges CB. Clinical predictors of different grades of nonalcoholic fatty liver disease. *Obes Surg* 2012;22:248-52.
280. Prati D, Taioli E, Zanella A, et al. Updated definitions of healthy ranges for serum alanine aminotransferase levels. *Ann Intern Med* 2002;137:1-10.
281. Verma S, Jensen D, Hart J, Mohanty SR. Predictive value of ALT levels for non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and advanced fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Liver Int* 2013;33:1398-405.
282. Cao W, Zhao C, Shen C, Wang Y. Cytokeratin 18, alanine aminotransferase, platelets and triglycerides predict the presence of nonalcoholic steatohepatitis. *PLoS One* 2013;8:e82092.
283. Ratziu V, Giral P, Charlotte F, et al. Liver fibrosis in overweight patients. *Gastroenterology* 2000;118:1117-23.
284. Harnois F, Msika S, Sabate JM, et al. Prevalence and predictive factors of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in morbidly obese patients undergoing bariatric surgery. *Obes Surg* 2006;16:183-8.
285. Pagano G, Pacini G, Musso G, et al. Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: further evidence for an etiologic association. *Hepatology* 2002;35:367-72.

286. Sirota JC, McFann K, Targher G, Johnson RJ, Chonchol M, Jalal DI. Elevated serum uric acid levels are associated with non-alcoholic fatty liver disease independently of metabolic syndrome features in the United States: Liver ultrasound data from the National Health and Nutrition Examination Survey. *Metabolism* 2013;62:392-9.
287. Vos MB, Colvin R, Belt P, et al. Correlation of vitamin E, uric acid, and diet composition with histologic features of pediatric NAFLD. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012;54:90-6.
288. Marangella M. Uric acid elimination in the urine. Pathophysiological implications. *Contrib Nephrol* 2005;147:132-48.
289. Waring WS, Webb DJ, Maxwell SR. Systemic uric acid administration increases serum antioxidant capacity in healthy volunteers. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001;38:365-71.
290. Moncion A, Truong NT, Garrone A, Beaune P, Barouki R, De Waziers I. Identification of a 16-nucleotide sequence that mediates post-transcriptional regulation of rat CYP2E1 by insulin. *J Biol Chem* 2002;277:45904-10.
291. Papadia FS, Marinari GM, Camerini G, et al. Liver damage in severely obese patients: a clinical-biochemical-morphologic study on 1,000 liver biopsies. *Obes Surg* 2004;14:952-8.
292. Abrams GA, Kunde SS, Lazenby AJ, Clements RH. Portal fibrosis and hepatic steatosis in morbidly obese subjects: A spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2004;40:475-83.
293. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* 2003;37:917-23.
294. Fallo F, Dalla Pozza A, Sonino N, et al. Non-alcoholic fatty liver disease is associated with left ventricular diastolic dysfunction in essential hypertension. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2009;19:646-53.
295. Fallo F, Dalla Pozza A, Sonino N, et al. Nonalcoholic fatty liver disease, adiponectin and insulin resistance in dipper and nondipper essential hypertensive patients. *J Hypertens* 2008;26:2191-7.
296. Gomez-Amores L, Mate A, Revilla E, Santa-Maria C, Vazquez CM. Antioxidant activity of propionyl-L-carnitine in liver and heart of spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 2006;78:1945-52.
297. Ikuta T, Kanno K, Arihiro K, et al. Spontaneously hypertensive rats develop pronounced hepatic steatosis induced by choline-deficient diet: Evidence for hypertension as a potential enhancer in non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res* 2012;42:310-20.
298. Liew PL, Lee WJ, Wang W, et al. Fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and gallbladder disease in morbid obesity. *Obes Surg* 2008;18:847-53.
299. Shalhub S, Parsee A, Gallagher SF, et al. The importance of routine liver biopsy in diagnosing nonalcoholic steatohepatitis in bariatric patients. *Obes Surg* 2004;14:54-9.
300. Machado M, Marques-Vidal P, Cortez-Pinto H. Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery. *J Hepatol* 2006;45:600-6.

**ANEXOS**

## Anexo 1. Artigo

**Title:** Plasma lipid peroxidation is a predictor of nonalcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients with nonalcoholic fatty liver disease.

**Authors:** Lucas Spadari Maggioni<sup>1</sup>, Claudio Cora Mottin<sup>1</sup>, Henrique Sarubbi Fillmann<sup>2</sup>, Fabio Cangeri Di Naso<sup>2</sup>, Norma Possa Marroni<sup>2</sup>, Alexandre Vontobel Padoin<sup>1</sup>.

1. Centro da Obesidade e Síndrome Metabólica, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Av. Ipiranga, 6690/302, 90610-000, Porto Alegre, Brazil. e-mail: [lucasmaggioni@hotmail.com](mailto:lucasmaggioni@hotmail.com).

2. Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Laboratório de Hepatologia e Fisiologia Experimental. Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-903, Porto Alegre, Brazil.

**Corresponding author:** Lucas Spadari Maggioni. Av. Ipiranga, 6690/302, 90610-000, Porto Alegre, Brazil. Fone: 55 51 33205103. E-mail: [lucasmaggioni@hotmail.com](mailto:lucasmaggioni@hotmail.com).

**Abstract:** The pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is not completely elucidated. There is increasing evidence that oxidative stress is involved in this process. The objective of the present study was to evaluate the role of plasma markers of oxidative stress in morbidly obese patients with NAFLD. Forty-three morbidly obese patients were subjected to Roux-en-Y gastric bypass with a liver biopsy obtained during surgery. Plasma oxidative stress was measured by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and superoxide dismutase (SOD) assays. Histologic analysis showed nonalcoholic steatohepatitis (NASH) in 65.1% of patients and simple steatosis in 34.9%. The plasma TBARS levels were significantly greater in the patients with NASH when compared to those with simple steatosis [1.65 (1.43-1.82) nM/ml vs 1.12 (1.04-1.42) nM/ml; P=0.002]. There was a correlation of TBARS with NAS score ( $r_s = 0.470$ ; P = 0.001). Among the patients with NASH and simple steatosis, there was no difference in plasma antioxidant status measured by SOD. Our findings suggest that plasma lipid peroxidation is associated with the severity of NAFLD in the morbidly obese patients.

### Highlights

- Morbid obesity is a major risk factor for NAFLD.
- We evaluated plasma oxidative stress in morbidly obese patients with NAFLD.
- Plasma lipid peroxidation was elevated in patients with NASH.
- Plasma lipid peroxidation correlated with NAS score.
- There was no difference in antioxidant status of patients with NASH.

**Keywords:** oxidative stress; morbid obesity; lipid peroxidation; fatty liver.

**Abbreviations:** NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease; NASH, nonalcoholic steatohepatitis; BMI, body mass index; HIV, human immunodeficiency virus; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; GGT, gamma glutamyl transpeptidase; TGs, triglycerides; HOMA-IR, homeostasis model assessment – insulin resistance; CRP, C-reactive protein; MDA, malondialdehyde; SOD, superoxide dismutase; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; ROS, reactive oxygen species; CYP2E1, cytochrome p450 2E1.

## **Introduction**

Obesity is a major risk factor for the occurrence of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) [1]. With the increase in the prevalence of obesity in the population, there has been a concomitant increase in NAFLD, as high as 30% in the Western countries [2]. Among the morbidly obese, the prevalence is even greater, where it occurs in more than 90% of patients [3, 4].

Although NAFLD is an independent risk factor for cardiovascular disease and mortality, only the presence of NASH is associated with advanced liver disease [5]. However not all morbidly obese patients have NAFLD or NASH [6], conditions in which mechanisms implicated in their genesis are not well known.

The *two-hit* hypothesis is the most accepted model of NAFLD. The second *hit* could include oxidative stress and the release of proinflammatory cytokines [7]. Oxidative stress, in animal and human studies, has been demonstrated as a factor responsible for the progression of steatosis to NASH [8-11]. There are few studies that have evaluated this relation in the morbidly obese [9, 12].

Accordingly, the aim of our study was to evaluate the relation of plasma markers of oxidative stress with the severity of NAFLD in the morbidly obese.

## **Material and methods**

### Design



This was a prospective cross-sectional study in which the patients were divided into two groups according to the liver biopsy result: simple steatosis and NASH.

### Subjects

Were included in the study consecutive patients who were morbidly obese, subjected to gastric bypass at a tertiary hospital in Brazil. The inclusion criteria were BMI  $>40 \text{ kg/m}^2$  or  $> 35 \text{ kg/m}^2$  with comorbidities, age between 18 and 65 years and having a diagnosis of NAFLD according to liver biopsy. Patients were excluded if they had surgical treatment for obesity, chronic hepatitis B or C, positive serology for HIV, regular use of alcoholic beverages ( $> 140 \text{ g}$  alcohol per week for men and  $> 70\text{g}$  per week for women), associated autoimmune diseases, use of hepatotoxic drugs and liver biopsy under 8 portal triads.

All patients included had a liver biopsy using a 1-mm Trucut needle at the beginning of the surgical procedure. The liver specimens were embedded in paraffin and stained with hematoxylin and eosin, and Sirius red. The histologic findings were evaluated according to the classification of Kleiner *et al.* [13].

### Serum studies

The following serum studies were done after fasting in the preoperative period: aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), gamma glutamyl transpeptidase (GGT), total cholesterol and fractions, triglycerides (TGs), glucose and insulin to calculate HOMA – IR (homeostasis model assessment – insulin resistance:  $\text{fasting insulin } (\mu \text{IU/ml}) \times \text{fasting glucose (mM/ml)}/22.50$ ), C-reactive protein (CRP) and ferritin.

### Measurement of lipid peroxidation and antioxidants

Plasma lipid peroxidation was determined using the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) method described by Buege *et al.* [14], expressed as

malondialdehyde (MDA) equivalents. Antioxidant status was evaluated by measuring erythrocyte SOD activity as described by Misra and Fridovich [15].

#### Statistical analysis

The quantitative variables with symmetric distribution were compared between two groups by the Student t-test for independent samples and between three groups by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test to detect differences. The quantitative variables with asymmetric distribution were compared between two groups by the Mann-Whitney test among three groups by the Kruskal-Wallis test. If this test showed difference between groups, an ordering of the variable positions was performed and these positions compared between groups by Tukey's post hoc test. The quantitative variables were correlated by Pearson or Spearman correlation coefficients depending on their distribution. A 5% level of significance was used.

#### Ethics

The present study was submitted to and approved by institution Committee of Ethics in Research, protocol number 11/05594. Informed consent was obtained from all participants.

#### Results

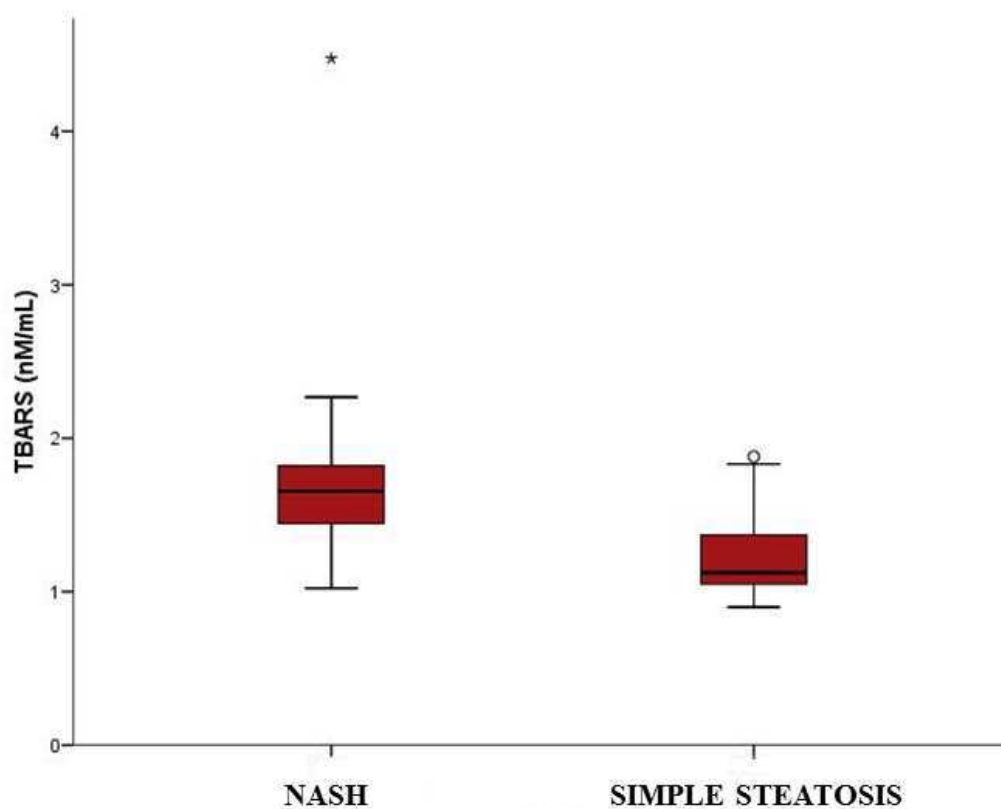
Forty-three patients with NAFLD were included, 15 patients (34.9%) showed simple steatosis and 28 patients (65.1%) showed NASH. Patients with NASH were mostly males and showed elevated AST and GGT levels, hypertriglyceridemia, and higher insulin resistance and serum ferritin (Table 1).

A higher plasma lipid peroxidation was found in the patients with steatohepatitis when compared to patients with simple steatosis, 1.65 (1.43 – 1.82) nM/ml versus 1.12 (1.04 – 1.41) nM/ml ( $P=0.002$ ) (Figure 1). There was a correlation between TBARS levels and NAS score ( $r_{sp}= 0.470$ ,  $P= 0.001$ ) (Figure 2).

**Table 1. Anthropometric and biochemical characteristics of patients**

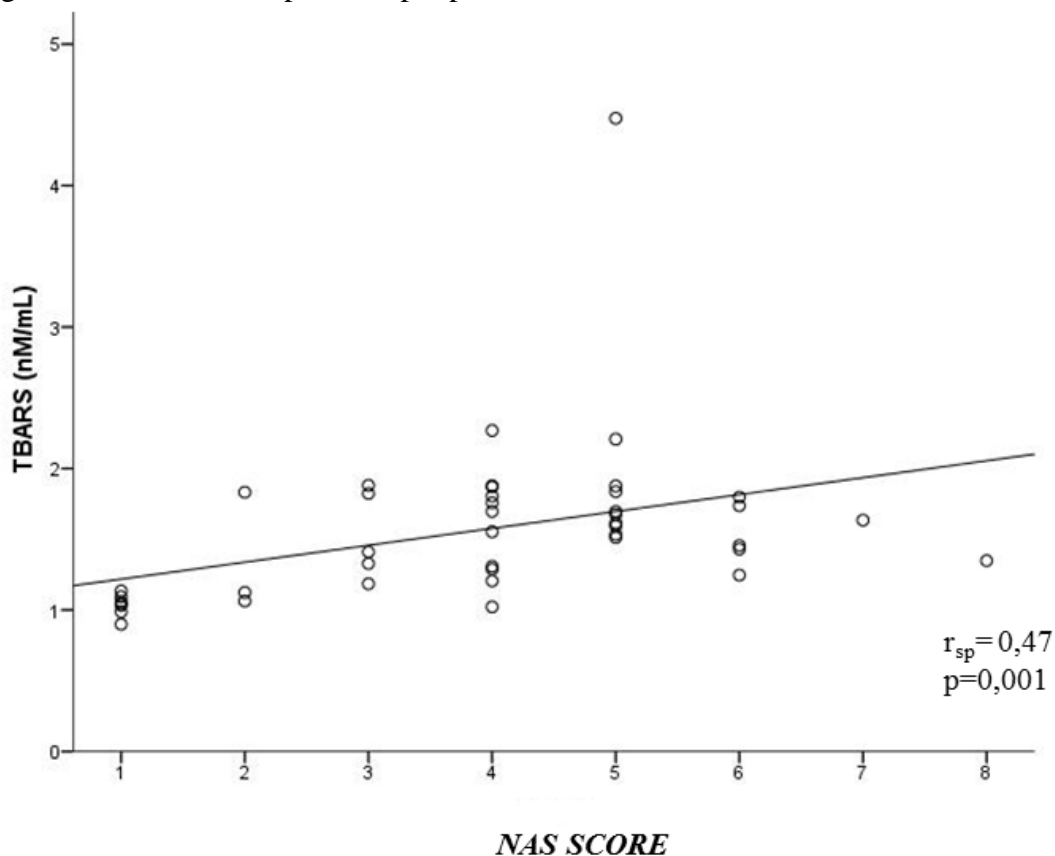
VARIABLE	STEATOSIS	STEATOHEPATITIS	P
N (%)	<b>15 (34.9%)</b>	<b>28 (65.1%)</b>	
Age (YEARS)	<b>34.4 ± 6.8</b>	<b>38.7 ± 9.1</b>	0.113
Gender (M/F)	<b>0 / 15</b>	<b>13 / 15</b>	0.001
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	<b>46.2 ± 8.37</b>	<b>45.13 ± 7.85</b>	0.676
Waist Circumference(cm)	<b>125.2 ± 20.39</b>	<b>130.93 ± 15.37</b>	0.311
AST (U/L)	<b>25.5 ± 10.2</b>	<b>35.2 ± 19.8</b>	0.084
ALT (U/L)	<b>25.6 ± 11.2</b>	<b>57.8 ± 48.1</b>	<b>0.002</b>
Cholesterol (mg/dl)	<b>178.87 ± 42.1</b>	<b>197.18 ± 42.32</b>	0.183
HDL (mg/dl)	<b>49.6 ± 10.3</b>	<b>45.1 ± 8.7</b>	0.147
LDL (mg/dl)	<b>101.2 ± 34.8</b>	<b>114.1 ± 42.4</b>	0.316
TGs (mg/dl)	<b>131.76 ± 61.64</b>	<b>203.21 ± 97.68</b>	<b>0.014</b>
HOMA-IR*	<b>3.25 (2.2 – 5.01)</b>	<b>7.04 (4.86 – 11.35)</b>	<b>0.001</b>
Ferritin (mg/dl)	<b>90.9 ± 83.3</b>	<b>359.0 ± 326.7</b>	<b>&lt;0.001</b>
C-reactive protein	<b>4.95 ± 9.1</b>	<b>1.6 ± 1.2</b>	0.188

\* Variable expressed as median (p25-p75). The other variables are expressed as mean ± SD.

**Figure 1. Relation of TBARS with the severity of NAFLD**

A greater antioxidant activity was not found in the group with steatosis alone:  $65.74 \pm 18.6$  USOD/mg protein versus  $57.86 \pm 16.05$  USOD/mg protein in the group with steatohepatitis ( $P=0.163$ ).

Figure 2. Correlation of plasma lipid peroxidation with NAS score



## Discussion

This study demonstrated that there is an association between plasma lipid peroxidation and the presence of NASH in morbidly obese patients with NAFLD and that plasma level of TBARS correlate with the NAS score. To the best of our knowledge, this is the first study to evaluate this association.

Olusi in 2002 demonstrated greater lipid peroxidation in the morbidly obese compared to healthy controls, suggesting that oxidative stress could be involved in the genesis of the diseases associated with excess weight [16]. There are three possible causes of this phenomenon. There is a high consumption of oxygen in the myocardium of the obese, with greater production of reactive oxygen species (ROS), caused by an

increase in mitochondrial respiration [17]. There is progressive and cumulative cellular damage, secondary to the large body mass, probably hypoxic, releasing a series of cytokines which can lead to the generation of ROS and consequent lipid peroxidation [18]. Finally, there is the hyperlipidemic diet of these patients, which alters mitochondrial oxygen metabolism [19].

Madan *et al.* [20] reported that patients with NAFLD showed greater plasma lipid peroxidation than did patients with chronic viral hepatitis and healthy controls. Similar findings were obtained by Yesilova *et al.* [21], who found high levels of MDA in patients with NAFLD. These findings suggested that the presence of high plasma concentrations of products of lipid peroxidation is a unique phenomenon and not merely a product of inflammation, since patients with chronic viral hepatitis, who had lower TBARS levels, showed a higher degree of necroinflammation.

In 2004, Videla *et al.* [9] demonstrated in morbidly obese patients that the parameters of oxidative stress in hepatic tissue was increased in patients with NAFLD when compared to controls without hepatic steatosis, and there were no differences between the groups with and without NASH. There was, however, a significant increase in CYP2E1 activity in the patients with steatohepatitis.

Oliveira *et al.* [12] were the only group to demonstrate that the morbidly obese patients with NASH showed increased oxidative stress in hepatic tissue when compared to obese individuals with steatosis alone.

It has been questioned whether plasma levels of oxidative stress markers are related to hepatic alterations [22]. Our study, besides showing an association between plasma lipid peroxidation and the presence of NASH in the morbidly obese, detected a correlation of plasma TBARS levels with hepatic events associated with NASH, such as

hepatocellular ballooning and necroinflammation, activity components in the NAS score.

We did not find any difference in the plasma antioxidant status, measured by SOD activity, in the morbidly obese patients with or without NASH. There are reports in the literature demonstrating that the decrease in antioxidants such as coenzyme Q10, SOD, catalase and glutathione S-transferase correlates with the severity of the hepatic disease [9, 23, 24]. Meanwhile, other authors have reported similar findings as ours, such as Madan *et al.* [20] and Videla *et al.* [9] Theoretically, we would expect a reduction in SOD activity in patients with NASH, but the fact that we did not find this association should be explained by an overexpression of antioxidant defenses, demonstrated in a murine model of NASH [25]. In a state of chronic oxidative stress, SOD levels are high in a compensatory manner [26, 27], and besides, during cellular injury, there is a release of large amounts of SOD [28], which would explain our findings.

In our study, we found that serum levels of ALT, GGT, TGs, HOMA-IR and ferritin were associated with the occurrence of NASH in morbidly obese patients. These findings are contrary to the report of Teixeira *et al.* [29], who did not find any predictive factor of NASH in the morbidly obese; in their study there was only a 13% incidence of NASH, bringing into question the histologic criteria utilized.

The marked difference in insulin resistance found between morbidly obese patients with and without NASH could be associated with overexpression of CYP2E1 caused by insulin resistance, contributing to the generation of ROS and consequent liver damage in patients with NAFLD [30, 31].

Ferritin can serve as a protector against damage caused by ROS, demonstrated by studies that found an increase in their concentration in an experimental model

of induced hepatic oxidative stress [32, 33]. There is also evidence that iron is a potent catalyst of oxidative stress and that it can act synergistically with other promoters of lipid peroxidation [34]. The relation of ferritin levels with the presence of NASH appears to be due to the oxidative stress found in these patients.

## Conclusions

We conclude from our study that plasma lipid peroxidation is associated with the severity of NAFLD in morbidly obese patients, with no difference in antioxidant status based on SOD activity.

## References

- [1] Fabbrini, E.; Sullivan, S.; Klein, S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology* **51**:679-689; 2010.
- [2] Bellentani, S.; Scaglioni, F.; Marino, M.; Bedogni, G. Epidemiology of non- alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis* **28**:155-161; 2010.
- [3] Mottin, C. C.; Moretto, M.; Padoin, A. V.; Kupski, C.; Swarowsky, A. M.; Glock, L.; Duval, V.; da Silva, J. B. Histological behavior of hepatic steatosis in morbidly obese patients after weight loss induced by bariatric surgery. *Obes Surg* **15**:788-793; 2005.
- [4] Moretto, M.; Kupski, C.; Mottin, C. C.; Repetto, G.; Garcia Toneto, M.; Rizzolli, J.; Berleze, D.; de Souza Brito, C. L.; Casagrande, D.; Colossi, F. Hepatic steatosis in patients undergoing bariatric surgery and its relationship to body mass index and co-morbidities. *Obes Surg* **13**:622-624; 2003.
- [5] Yilmaz, Y.; Younossi, Z. M. Obesity-associated nonalcoholic Fatty liver disease. *Clin Liver Dis* **18**:19-31; 2014.
- [6] Liu, C. J. Prevalence and risk factors for non-alcoholic fatty liver disease in Asian people who are not obese. *J Gastroenterol Hepatol* **27**:1555-1560; 2012.
- [7] Day, C. P.; James, O. F. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* **114**:842-845; 1998.

- [8] Sanyal, A. J.; Campbell-Sargent, C.; Mirshahi, F.; Rizzo, W. B.; Contos, M. J.; Sterling, R. K.; Luketic, V. A.; Shiffman, M. L.; Clore, J. N. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* **120**:1183-1192; 2001.
- [9] Videla, L. A.; Rodrigo, R.; Orellana, M.; Fernandez, V.; Tapia, G.; Quinones, L.; Varela, N.; Contreras, J.; Lazarte, R.; Csendes, A.; Rojas, J.; Maluenda, F.; Burdiles, P.; Diaz, J. C.; Smok, G.; Thielemann, L.; Poniachik, J. Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. *Clin Sci (Lond)* **106**:261-268; 2004.
- [10] Seki, S.; Kitada, T.; Yamada, T.; Sakaguchi, H.; Nakatani, K.; Wakasa, K. In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases. *J Hepatol* **37**:56-62; 2002.
- [11] Pessayre, D.; Fromenty, B. NASH: a mitochondrial disease. *J Hepatol* **42**:928-940; 2005.
- [12] Oliveira, C. P.; Faintuch, J.; Rascovski, A.; Furuya, C. K., Jr.; Bastos Mdo, S.; Matsuda, M.; Della Nina, B. I.; Yahnosi, K.; Abdala, D. S.; Vezozzo, D. C.; Alves, V. A.; Zilberstein, B.; Garrido, A. B., Jr.; Halpern, A.; Carrilho, F. J.; Gama-Rodrigues, J. J. Lipid peroxidation in bariatric candidates with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) -- preliminary findings. *Obes Surg* **15**:502-505; 2005.
- [13] Kleiner, D. E.; Brunt, E. M.; Van Natta, M.; Behling, C.; Contos, M. J.; Cummings, O. W.; Ferrell, L. D.; Liu, Y. C.; Torbenson, M. S.; Unalp-Arida, A.; Yeh, M.; McCullough, A. J.; Sanyal, A. J. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **41**:1313-1321; 2005.
- [14] Buege, J. A.; Aust, S. D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* **52**:302-310; 1978.
- [15] Misra, H. P.; Fridovich, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* **247**:3170-3175; 1972.
- [16] Olusi, S. O. Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotective enzymes in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* **26**:1159-1164; 2002.
- [17] Turrens, J. F. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain.



*Biosci Rep* **17**:3-8; 1997.

- [18] Lechleitner, M.; Koch, T.; Herold, M.; Dzien, A.; Hoppichler, F. Tumour necrosis factor-alpha plasma level in patients with type 1 diabetes mellitus and its association with glycaemic control and cardiovascular risk factors. *J Intern Med* **248**:67-76; 2000.
- [19] Moor de Burgos, A.; Wartanowicz, M.; Ziemiński, S. Blood vitamin and lipid levels in overweight and obese women. *Eur J Clin Nutr* **46**:803-808; 1992.
- [20] Madan, K.; Bhardwaj, P.; Thareja, S.; Gupta, S. D.; Saraya, A. Oxidant stress and antioxidant status among patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *J Clin Gastroenterol* **40**:930-935; 2006.
- [21] Yesilova, Z.; Yaman, H.; Oktenli, C.; Ozcan, A.; Uygun, A.; Cakir, E.; Sanisoglu, S. Y.; Erdil, A.; Ates, Y.; Aslan, M.; Musabak, U.; Erbil, M. K.; Karaeren, N.; Dagalp, K. Systemic markers of lipid peroxidation and antioxidants in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Gastroenterol* **100**:850-855; 2005.
- [22] Bonnefont-Rousselot, D.; Ratziu, V.; Giral, P.; Charlotte, F.; Beucler, I.; Poynard, T. Blood oxidative stress markers are unreliable markers of hepatic steatosis. *Aliment Pharmacol Ther* **23**:91-98; 2006.
- [23] Leclercq, I. A. Antioxidant defence mechanisms: new players in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis? *Clin Sci (Lond)* **106**:235-237; 2004.
- [24] Sreekumar, R.; Rosado, B.; Rasmussen, D.; Charlton, M. Hepatic gene expression in histologically progressive nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **38**:244-251; 2003.
- [25] Santamaria, E.; Avila, M. A.; Latasa, M. U.; Rubio, A.; Martin-Duce, A.; Lu, S. C.; Mato, J. M.; Corrales, F. J. Functional proteomics of nonalcoholic steatohepatitis: mitochondrial proteins as targets of S-adenosylmethionine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:3065-3070; 2003.
- [26] Broide, E.; Klinowski, E.; Koukoulis, G.; Hadzic, N.; Portmann, B.; Baker, A.; Scapa, E.; Mieli-Vergani, G. Superoxide dismutase activity in children with chronic liver diseases. *J Hepatol* **32**:188-192; 2000.
- [27] Laybutt, D. R.; Kaneto, H.; Hasenkamp, W.; Grey, S.; Jonas, J. C.; Sgroi, D. C.; Groff, A.; Ferran, C.; Bonner-Weir, S.; Sharma, A.; Weir, G. C. Increased

expression of antioxidant and antiapoptotic genes in islets that may contribute to beta-cell survival during chronic hyperglycemia. *Diabetes* **51**:413-423; 2002.

[28] Kassab-Chekir, A.; Laradi, S.; Ferchichi, S.; Haj Khelil, A.; Feki, M.; Amri, F.; Selmi, H.; Bejaoui, M.; Miled, A. Oxidant, antioxidant status and metabolic data in patients with beta-thalassemia. *Clin Chim Acta* **338**:79-86; 2003.

[29] Teixeira, A. R.; Bellodi-Privato, M.; Carvalheira, J. B.; Pilla, V. F.; Pareja, J. C.; D'Albuquerque, L. A. The incapacity of the surgeon to identify NASH in bariatric surgery makes biopsy mandatory. *Obes Surg* **19**:1678-1684; 2009.

[30] Moncion, A.; Truong, N. T.; Garrone, A.; Beaune, P.; Barouki, R.; De Waziers, I. Identification of a 16-nucleotide sequence that mediates post-transcriptional regulation of rat CYP2E1 by insulin. *J Biol Chem* **277**:45904-45910; 2002.

[31] Rolo, A. P.; Teodoro, J. S.; Palmeira, C. M. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med* **52**:59-69; 2012.

[32] Cairo, G.; Tacchini, L.; Pogliaghi, G.; Anzon, E.; Tomasi, A.; Bernelli-Zazzera, A. Induction of ferritin synthesis by oxidative stress. Transcriptional and post-transcriptional regulation by expansion of the "free" iron pool. *J Biol Chem* **270**:700-703; 1995.

[33] Orino, K.; Lehman, L.; Tsuji, Y.; Ayaki, H.; Torti, S. V.; Torti, F. M. Ferritin and the response to oxidative stress. *Biochem J* **357**:241-247; 2001.

[34] Sumida, Y.; Yoshikawa, T.; Okanoue, T. Role of hepatic iron in non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res* **39**:213-222; 2009.

**Anexo 2. Aprovação do CEP**

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

OF. CEP- 830/12

Porto Alegre, 24 de setembro de 2012.

Senhor Pesquisador,

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 11/05594 intitulado **"Avaliação do estresse oxidativo em obesos mórbidos, seu comportamento após o emagrecimento e sua relação com a doença hepática gordurosa não alcoólica"**.

Salientamos que seu estudo pode ser iniciado a partir desta data.

Os relatórios parciais e final deverão ser encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Rodolfo Herberto Schneider  
Coordenador do CEP-PUCRS

Ilmo. Sr.  
Dr. Cláudio Corá Mottin  
HSL  
Nesta Universidade

**PUCRS**

**Campus Central**  
Av. Ipiranga, 6690 - 3º andar - CEP: 90610-000  
Sala 314 - Fone Fax: (51) 3320-3345  
E-mail: [cep@pucrs.br](mailto:cep@pucrs.br)  
[www.pucrs.br/prppg/cep](http://www.pucrs.br/prppg/cep)

### **Anexo 3. Consentimento Livre e Esclarecido**

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO**

**VENHO ATRAVÉS DESTE CONVIDAR PARA PARTICIPAR DO ESTUDO DA AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM OBESOS MÓRBIDOS E SUA RELAÇÃO COM A DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA.**

#### **I- Justificativa e objetivos da pesquisa**

Este estudo tem como objetivo principal avaliar a relação do estresse oxidativo (reações que produzem substâncias que danificam todos os componentes celulares) com a evolução da doença hepática gordurosa não alcoólica (infiltração de gordura no fígado e suas implicações) em pacientes obesos mórbidos submetidos ao bypass gástrico (cirurgia para obesidade).

#### **II- Procedimentos a serem utilizados**

Será realizado coleta de 5 ml de sangue de veia periférica antes da realização da cirurgia e um ano após a mesma. Os demais exames analisados (sangue e biópsia hepática) fazem parte da rotina de assistência dos pacientes submetidos à cirurgia da obesidade.

#### **III- Desconfortos ou riscos esperados**

A coleta de sangue de veia periférica poderá causar dor e hematoma no local da punção, facilmente resolvida com medidas locais.

#### **IV e V- Benefícios que se pode obter e procedimentos alternativos que possam ser vantajosos**

Conhecer os mecanismos envolvidos na doença hepática gordurosa do paciente obeso e proporcionar conhecimentos para prevenção da doença e futuras terapêuticas.

#### **VI- Garantia de resposta a qualquer pergunta**

#### **VII- Liberdade de abandonar a pesquisa sem prejuízo para si**

#### **VIII- Garantia de privacidade**

Ressaltamos que a concordância em participar desse estudo não implica em alterações na realização da cirurgia, e o fato de não querer participar também não mudará nada na maneira que será conduzido o atendimento neste hospital.

Eu, \_\_\_\_\_ fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada. Recebi informações a respeito dos exames que serão realizados e esclareci as minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim

eu desejar. O Dr. Lucas Spadari Maggioni certificou-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais, bem como não trará riscos minha pessoa e terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, face a estas informações.

**IX- Compromisso com a informação atualizada do estudo**

**X- Disponibilidade de tratamento médico e indenização em caso de danos**

Os pesquisadores, Dr. Claudio Corá Mottin e Dr. Lucas Spadari Maggioni serão responsáveis em caso de dano.

Caso tiver novas perguntas sobre este estudo, posso chamar o Dr. Lucas Spadari Maggioni no telefone (51) 33205002 OU (51) 97072681. O telefone do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS é (51) 33203345. Para qualquer pergunta sobre os meus direitos como participante deste estudo ou se penso que fui prejudicado pela minha participação, posso entrar em contato com o Dr. Claudio Corá Mottin (51) 33395796. Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

\_\_\_\_\_

Assinatura do paciente Nome  
Data

\_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador Nome Data

Este formulário foi lido para \_\_\_\_\_ em  
\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ pelo \_\_\_\_\_ enquanto eu estava  
presente.

\_\_\_\_\_

Assinatura da testemunha Nome Data