UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

FERNANDA VIDAL LOPES DE PAULA

Avaliação da vitamina D na doença hepática gordurosa não alcoólica.

Ribeirão Preto

2016

FERNANDA VIDAL LOPES DE PAULA

Avaliação da vitamina D na doença hepática gordurosa não alcoólica.

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós Graduação do
Departamento de Clínica Médica da
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto –
Universidade de São Paulo - para obtenção
do título de Mestre em Ciências Médicas

Área de Concentração: Investigação
Biomédica

Orientadora: Profa. Dra. Ana de Lourdes
Candolo Martinelli

Ribeirão Preto – SP

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

De Paula, Fernanda Vidal Lopes

Avaliação da vitamina D na doença hepática gordurosa não alcoólica, 2016.

79p.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.
Área de concentração: Clínica Médica/ Investigação Biomédica. Orientador: Ana de Lourdes Candolo Martinelli

1. Esteatose 2.NASH 3.Vitamina D 4.Síndrome Metabólica 5.Citocinas

DE PAULA, Fernanda Vidal Lopes

Título: Avaliação da vitamina D na doença hepática gordurosa não alcoólica

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Investigação Biomédica

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À minha amada avó, *Lúcia Rosa (in memoriam)*;

Aos meus pais, *Edilson e Carla*, com amor.

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora, *Prof. Dra. Ana de Lourdes Candolo Martinelli*, por toda dedicação, paciência e pelos ensinamentos que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional;

À *minha família*, em especial meu irmão *Alexandre*, meu tio-avô *Gercino* e minha tia-avó *Lilian*, por acreditarem em mim e estarem sempre ao meu lado;

Ao meu namorado, *Guilherme*, pelo companheirismo, compreensão, incentivo e amor.

Às minha amigas e companheiras do curso de pós-graduação, *Bruna e Nathália*, pela ajuda e incentivo e principalmente, pela grande amizade, que nos proporcionou momentos felizes e foram essenciais para tornar essa jornada mais alegre;

Aos técnicos do laboratório de Gastroenterologia do HCFMRP/USP, *Alice, Carlos e Marie* e à técnica do laboratório de Endocrinologia, *Marta*, pela atenção e carinho e por estarem sempre dispostos a ajudar;

À enfermeira *Izabel*, pela disposição e ajuda com as coletas;

Aos professores *Dra. Ingrid Dick de Paula, Dr. Francisco José Albuquerque de Paula e Dra. Leandra Naira Ramalho* por gentilmente terem contribuído na construção desse trabalho;

Ao prof. *Dr. Wilson Salgado e sua equipe* do Ambulatório de Cirurgia Bariátrica do HCFMRP, pelo apoio para que este estudo se realizasse;

Aos *pacientes* pela participação, essencial para o desenvolvimento da pesquisa;

Ao funcionário da secretaria da pós-graduação *Emerson*, por toda a ajuda e paciência;

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (*FMRP - USP*) pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

RESUMO

De Paula, F.V.L. **Avaliação da vitamina D na doença hepática gordurosa não alcoólica**, 2016. 77f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é definida pelo acúmulo excessivo de gordura nos hepatócitos sem ingestão significativa de álcool. Essa condição é associada à obesidade e a síndrome metabólica (SM) e é considerada um grave problema de saúde pública global. A DHGNA engloba a esteatose pura e a esteatohepatite, esta última caracterizada pela presença de inflamação e balonização dos hepatócitos, com ou sem formação de fibrose com potencial para evolução para formas mais graves como cirrose e carcinoma hepatocelular. Estudos atuais divergem sobre a relação entre a deficiência da vitamina D e a gravidade da DHGNA. O objetivo foi verificar se há associação entre níveis séricos de vitamina D, citocinas relacionadas ao processo inflamatório (IL-6, IL-10 e TNF- α), presença de componentes da SM e a prevalência e a gravidade da DHGNA. **Metodologia** Estudo transversal que incluiu 40 pacientes do sexo feminino, obesas (IMC>30kg/m²) e com idade superior a 18 anos submetidas a biópsia hepática e obtiveram diagnóstico de DHGNA. Foram coletados dados referentes a características clínicas, parâmetros antropométricos e de gordura corporal. Adicionalmente, foram avaliados parâmetros clínicos de SM e dados bioquímicos relacionados à lesão hepática além de dosagem de 25(OH)D e níveis séricos de citocinas. Um grupo controle com 37 indivíduos saudáveis do sexo feminino, não obesas (IMC<30kg/m²), com idade média de 41 anos, foi usado como controle de vitamina D sérica. **Resultados** Dos 40 pacientes incluídos, 25 tinham esteatose pura e 15 esteatohepatite. A prevalência de insuficiência de vitamina D foi de 70%. Os valores séricos de vitamina D não foram diferentes quando comparados ao grupo controle saudável e comparando-se esteatose e esteatohepatite. Níveis de vitamina D e de citocinas não apresentaram relação com os parâmetros histopatológicos de lesão hepática, exceto a presença de balonização que foi associada a maiores valores de vitamina D. Níveis séricos de vitamina D correlacionaram-se negativamente com o IMC. Níveis séricos de citocinas não foram associados com a gravidade da DHGNA. O escore NAS e o grau de balonização dos hepatócitos foram maiores em pacientes que apresentaram SM. **Conclusões** Apesar da alta prevalência de insuficiência de vitamina D, níveis séricos de vitamina D e citocinas não foram associados com presença ou gravidade da DHGNA em pacientes obesas do sexo feminino submetidas à cirurgia bariátrica.

Balonização dos hepatócitos foi o único parâmetro histopatológico de gravidade de lesão hepática associado com níveis séricos mais altos de vitamina D. SM foi associada a parâmetros de maior gravidade de lesão hepática.

Palavras Chave: Esteatose hepática, NASH, Vitamina D, Síndrome Metabólica, Citocinas.

ABSTRACT

DE PAULA, F.V.L. Vitamin D evaluation in non-alcoholic fatty liver disease

Dissertation (master degree). 77p. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is defined by excessive fat accumulation in hepatocytes without significant alcohol intake and is associated with obesity and metabolic syndrome. NAFLD is one of the most common causes of chronic liver disease and it is considered a global public health problem. NAFLD includes pure steatosis and steatohepatitis; the last been characterized by the presence of inflammation and hepatocytes ballooning with or without fibrosis and with potential to evolve to more severe forms as cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Current studies diverge on the relationship between vitamin D deficiency and the severity of NAFLD. The objective was to assess if there is an association between vitamin D serum levels, cytokines related to inflammation (IL-6, IL-10 and TNF- α) and presence of metabolic syndrome components and the prevalence and severity of NAFLD. **Methods** Cross-sectional study of 40 obese (BMI > 30kg/m²) female patients above 18 years who underwent hepatic biopsy during bariatric surgery to diagnose NAFLD and assess the degree of liver damage. Clinical data, anthropometric parameters and body fat were collected. In addition, clinical parameters of metabolic syndrome were evaluated and biochemical data relating to liver injury beyond 25(OH)D and serum cytokines. A control group with 37 healthy non obese females, mean age 41 was used as a controls for serum vitamin D. **Results** Among 40 NAFLD patients 25 had pure steatosis and 15 steatohepatitis. Prevalence of vitamin D insufficiency was 70%. No difference was observed in vitamin D levels comparing healthy control group and NAFLD or comparing steatosis and steatohepatitis. No relationship was observed between vitamin D or cytokine levels with histopathology parameters of liver injury. Higher levels of vitamin D were associated with cellular ballooning. Vitamin D levels negatively correlated with BMI. Serum cytokine levels were not associated with the severity of NAFLD. The NAS score and the ballooning degree were higher in patients with metabolic syndrome. **Conclusions** Despite high prevalence of vitamin D insufficiency, serum vitamin D and cytokines were not associated with the presence or severity of NAFLD in obese female patients undergoing bariatric surgery. Ballooning was the only histological parameter of liver damage associated with higher serum levels of vitamin D. Metabolic syndrome was associated with parameters of higher severity of NAFLD.

Keywords: Hepatic Steatosis, NASH, Vitamin D, Metabolic Syndrome, Cytokines.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Fatores de risco associados à DHGNA	02
Quadro 2. Causas comuns de esteatose hepática secundária	04
Quadro 3. Classificação clínica de acordo com o Índice de Massa Corporal	05
Quadro 4. Critérios para diagnóstico da síndrome metabólica segundo IDF, 2006.	06
Quadro 5. Critérios de indicação de cirurgia bariátrica	07
Quadro 6. Esquema de coleta de dados dos pacientes incluídos no estudo.	17
Quadro 7. Definição e escores com base nos achados de biópsia hepática.	21

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática do metabolismo da vitamina D. 09
- Figura 2. A e B-** Fotomicrografias de paciente com esteatohepatite apresentando esteatose em mais de 60% da amostra e infiltrado inflamatório misto periportal (H&E, 20 e 40x). **C e D-** Fotomicrografias de paciente com esteatohepatite apresentando esteatose em mais de 60% da amostra e septo fibroso (Tricrômico de Masson, 20 e 40x). 27
- Figura 3.** Fotomicrografias de paciente com esteatose hepática pura: esteatose moderada (34-66%), sem evidência de inflamação ou fibrose. (H&E, 20 e 40x). 28
- Figura 4.** Parâmetros histopatológicos de gravidade da lesão hepática nas três condições de vitamina D (normal, deficiente, insuficiente) nos pacientes incluídos no estudo. 33
- Figura 5.** Parâmetros histopatológicos de gravidade da lesão hepática nas condições de vitamina D normal e deficiente segundo a IOM nos pacientes incluídos no estudo. 34

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Distribuição dos valores séricos de vitamina D nos três grupos incluídos no estudo (controles saudáveis, esteatose pura e NASH). 30
- Gráfico 2.** Correlação entre os valores séricos de vitamina D e valores de IMC dos pacientes com esteatose pura e dos pacientes com NASH incluídos no estudo. 30
- Gráfico 3.** Distribuição dos valores de vitamina D dos pacientes incluídos no estudo de acordo com a presença ou ausência de balonização hepatocelular. 32
- Gráfico 4.** Grau de balonização hepatocelular nos pacientes incluídos no estudo de acordo com a presença ou ausência de síndrome metabólica (SM). 36
- Gráfico 5.** Escore NAS nos pacientes incluídos no estudo de acordo com a presença ou ausência de síndrome metabólica (SM). 36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características clínicas dos pacientes incluídos no estudo e divididos de acordo com os resultados da biópsia hepática em esteatose pura ou esteatohepatite (NASH).	23
Tabela 2. Exames bioquímicos de rotina dos pacientes incluídos no estudo e divididos de acordo com os resultados da biópsia hepática em esteatose pura e NASH.	24
Tabela 3. Avaliação antropométrica e gordura corporal dos pacientes incluídos no estudo e divididos de acordo com os resultados da biópsia hepática em esteatose pura e NASH.	25
Tabela 4. Níveis séricos de Vitamina D- 25(OH)D e de citocinas dos pacientes incluídos no estudo e divididos de acordo com os resultados da biópsia hepática em esteatose pura e NASH.	25
Tabela 5. Achados histopatológicos das biópsias de fígado dos pacientes incluídos no estudo.	26
Tabela 6. Variáveis analisadas entre grupo controle e grupos do estudo.	29
Tabela 7. Níveis séricos de 25(OH)D, IL-10, IL-6 e TNF- α nos pacientes incluídos no estudo e divididos de acordo com as características histopatológicas do fígado que indicam gravidade da lesão hepática.	31
Tabela 8. Frequência das características histopatológicas do fígado que indicam gravidade da lesão hepática nas condições de vitamina D normal Normal (≥ 30 ng/mL); Insuficiência (20-29,9ng/mL) e Deficiência (<20ng/mL).	35

LISTA DE SIGLAS:

HDL	High Density Lipoproteins
ABESO	<i>Associação Brasileira para Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica</i>
AGI	Ácidos Graxos livres
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
CA	Circunferência Abdominal
CC	Circunferência da Cintura
CQ	Circunferência do Quadril
DHGNA	Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica
EASL	<i>European Association for the Study of the Liver</i>
ERO's	Espécies Reativas de Oxigênio
GAMA-GT	Gama Glutamil Transferase
HSL	Hormone Sensitive Lipase
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IL-10	Interleucina 10
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de Massa Corporal
IOM	<i>Institute Of Medicine</i>
IRS-1	Substratos Receptores de Insulina
LDL	Low Density Lipoproteins
NAFLD	Non Alcoholic Fat Liver Disease
NAS	Non Alcoholic Fat Liver Disease Activity Score
NASH	Non-Alcoholic Steatohepatite
OMS	<i>Organização Mundial de Saúde</i>
PTH	Paratormônio
RCQ	Razão Cintura-Quadril
SBEM	<i>Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia</i>
SM	Síndrome Metabólica
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TG	Triglicerídeos
TNF-α	Tumoral Necrosis Factor
VDR	Vitamin D Receptor
VLDL	Very Low Density Protein

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA.....	01
1.2 OBESIDADE.....	05
1.3 VITAMINA D.....	08
2 JUSTIFICATIVA.....	12
3 HIPÓTESE.....	13
4 OBJETIVOS.....	14
5 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	15
5.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	15
5.2 SUJEITOS.....	17
5.3 AVALIAÇÃO NUTRICIONAL.....	18
5.4 DOSAGEM DE VITAMINA D SÉRICA	20
5.5 DOSAGENS DE CITOCINAS SÉRICAS.....	20
5.6 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	20
6 RESULTADOS	23
7 DISCUSSÃO	37
8 CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
APÊNDICES.....	55
ANEXOS.....	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA (DHGNA)

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) ou *nonalcoholic fatty liver disease* (NAFLD) é uma condição clínica caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura identificada em mais que 5% dos hepatócitos, em indivíduos sem histórico de ingestão de álcool relevante, admitindo-se consumo por dia ≥ 30 g para homens e ≥ 20 g para mulheres como significativo (CHALASANI, 2012; ELÍADES, 2015; EASL–EASD–EASO, 2016; PATEL, 2016).

A DHGNA pode se manifestar de duas formas com diferentes prognósticos; esteatose pura ou esteatohepatite, também conhecida como *nonalcoholic steatohepatitis* (NASH). Esta última caracteriza-se pela presença de inflamação e degeneração dos hepatócitos (balonização) com ou sem formação de fibrose e tem potencial para evoluir para cirrose e carcinoma hepatocelular (CHALASANI, 2012; ELÍADES, 2015; EASL–EASD–EASO, 2016).

1.1.2 Prevalência

A esteatose hepática não alcoólica e esteatohepatite são causas comuns de doença crônica do fígado e sua prevalência está aumentando em todo o mundo. A prevalência da doença varia bastante entre os estudos, o que pode ser justificada pelos diferentes métodos de diagnósticos utilizados e a população avaliada (SAYINER, 2016).

A prevalência estimada de NAFLD na população geral está entre 20-30%, enquanto em indivíduos com índice de massa corporal (IMC) $>30\text{kg/m}^2$, é 65-75%. A prevalência de NASH é de 2-3% na população geral, e de 15-20% quando IMC $> 30\text{ kg/m}^2$ (BUECHLER, 2011).

Concordando com esses dados, uma revisão feita por Vernon (2011) encontrou a média de 20% de prevalência de DHGNA na população de diferentes países. No Brasil, foi

verificada prevalência de 35,2% de DHGNA em pacientes de meia-idade (KARNIKOWSKI, 2007).

Estudos em pacientes submetidos à cirurgia bariátrica mostram prevalência de 87 a 95% de DHGNA, diagnosticados através de biópsia hepática (BITENCOURT, 2007; FEIJÓ, 2013; REHA, 2014).

1.1.3 Causas e Fatores de risco

Atualmente, a DHGNA é considerada como uma manifestação hepática da síndrome metabólica (PATEL, 2016). A obesidade, resistência à insulina, hipertensão arterial e dislipidemia, que são associadas à síndrome metabólica, são considerados fatores de risco para o desenvolvimento da DHGNA (KALIA E GAGLIO, 2016).

Quadro 1. Fatores de risco associados à DHGNA

- Obesidade
- Diabetes Mellitus tipo 2
- Dislipidemia
- Síndrome Metabólica

Adaptado de: CHALASANI et al, 2012.

1.1.4 Patogênese e progressão da DHGNA

Apesar de a DHGNA ser fortemente associada com a obesidade, diabetes mellitus e síndrome metabólica, o processo de patogênese e progressão ainda não é completamente entendido (ELÍADES, 2013; NOUREDDING, 2015). Contudo, a teoria mais aceita atualmente é que o acúmulo de gordura nos hepatócitos e a DHGNA ocorrem na presença de hiperinsulinemia e resistência à insulina, que geralmente são fatores de risco. (ZIVKOVIC, 2007; NOUREDDING, 2015).

Existem três principais vias de aumento da deposição de triglicerídeos (TG) no fígado: o fluxo excessivo de ácidos graxos livres (AGL) do tecido adiposo para o fígado, o aumento da lipogênese hepática e a consumo excessivo de gordura na dieta (ZELBER-SAGI, 2011; NOUREDDING, 2015)

Com a resistência à insulina, as células de gordura (adipócitos) sofrem aumento da atividade da lipase hormônio sensível (HSL), o que leva ao aumento na lipólise, aumentando assim o fluxo de ácidos graxos livres para o fígado. Os AGL sofrem oxidação na mitocôndria, podendo ser incorporados em partículas VLDL para exportação ou em triglicerídeos (TG) que se acumulam nos hepatócitos (BROWNING E HORTON, 2004).

A hiperglicemia provoca aumento da captação da glicose pelo fígado (ZIVKOVIC, 2007). Com isso, há estímulo da lipogênese aumentando a conversão de glicose em AGL. Esse processo ocorre dentro do hepatócito, quando a enzima piruvato quinase hepática é estimulada resultando em glicólise. Ocorre então a entrada de piruvato (produto da quebra da glicose) na mitocôndria e sua conversão à citrato e posteriormente à acetil-coA, que é o substrato inicial da via de produção de AGL (lipogênese) (BROWNING E HORTON, 2004; NOUREDING, 2015).

Para o desenvolvimento da esteatohepatite são necessários vários processos (hits) para que ocorra a inflamação, lesão celular e fibrose (NOUREDING, 2015). Dentre esses mecanismos que contribuem para formação da NASH estão envolvidos estresse oxidativo (produção de espécies reativas de oxigênio- ERO's), alterações no metabolismo do ferro e liberação de citocinas do processo inflamatório, como interferon, TNF- α , interleucina-10 e IL-6 (ZIVKOVIC, 2007).

A interleucina-6 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) são citocinas pró-inflamatórias produzidas pelo tecido adiposo e que estão intimamente relacionadas à evolução da DHGNA. Estudos sugerem que altas concentrações dessas citocinas levam a um estado de inflamação crônica, que altera o mecanismo de sinalização por fosforilação dos substratos receptores de insulina (IRS-1), promovendo a manutenção da resistência à insulina, que é fundamental para a progressão da doença (TARANTINO, 2010; SEARS E PERRY, 2015; JAMALI, 2016).

A IL-6 promove a inibição da sinalização da insulina nos hepatócitos (SENN, 2002), além de ter sido associada com o grau de inflamação lobular (JAMALI, 2016). Por outro lado, a TNF-alfa foi associada ao grau de esteatose e grau de fibrose hepática (JAMALI, 2016).

A interleucina 10 (IL-10) atua como um mediador de ação anti-inflamatória e, ao contrário da IL-6 e TNF- α , tende a estar diminuída em pacientes com NASH (ZAHARAN, 2012; PAREDES-TURRUBIARTE, 2015). Isso ocorre por desregulação no balanço da produção de citocinas pró e anti-inflamatórias na DHGNA (ZAHARAN, 2012).

1.1.5 Diagnóstico

Para o diagnóstico da DHGNA é necessário a exclusão de causas secundárias de esteatose, como doença de Wilson, hepatite C, alguns erros inatos de metabolismo, consumo de álcool e determinados medicamentos. (CHALASANI, 2012; PATEL, 2016).

Quadro 2. Causas Comuns de Esteatose Hepática Secundária

Macrovesicular	Microvesicular
<ul style="list-style-type: none"> - Consumo excessivo de álcool - Hepatite C - doença de Wilson -Lipodistrofia -Ingestão excessiva de alimentos - Nutrição parenteral -Abetalipoproteinemia - Medicações (ex: corticosteroides) 	<ul style="list-style-type: none"> - Síndrome de Reye - Esteatose hepática aguda da gravidez - Síndrome HELLP (H: hemólise; EL: elevação das enzimas hepáticas LP: baixa contagem de plaquetas) -Erros inatos do metabolismo: Doença de Wolman; - Deficiência LCAT (lecitina-colesterol aciltransferase) - Medicações (ex: anti-retrovirais)

Adaptado de: CHALASANI et al, 2012.

A biópsia do fígado é o padrão ouro para caracterizar a lesão hepática na DHGNA possibilitando o diagnóstico de esteatose pura e NASH, além de avaliar o grau de lesão hepática. A doença é diagnosticada quando existe a presença de esteatose em mais que 5% dos hepatócitos de acordo com a análise histológica (BRUNT E TINIAKOS, 2010). Para o diagnóstico de NASH é necessário a presença conjunta de esteatose, balonização dos hepatócitos e inflamação lobular (KLEINER, 2005; EASL–EASD–EASO, 2016).

Devido às limitações do exame de biópsia hepática, pode-se utilizar métodos não invasivos de imagem (ultrassom e ressonância magnética do fígado) e níveis séricos de enzimas hepáticas como alanina aminotransferase (ALT/TGP) e aspartato aminotransferase (AST/TGO), porém a sensibilidade/especificidade dessas enzimas é baixa (CHALASANI, 2012).

Outra ferramenta disponível para auxiliar no diagnóstico e avaliar a gravidade da doença é o escore NAS (NAFLD Activity Score), que é definido pela soma das características histopatológicas da lesão hepática, incluindo grau de esteatose (0-3), inflamação lobular (0-3), balonização (0-2). Os valores da soma podem variar de 0 a 8. A somatória NAS ≥ 5 é associado ao diagnóstico de NASH e ≤ 3 não NASH (KLEINER, 2005; EASL–EASD–EASO, 2016).

1.2 OBESIDADE

1.2.1 Prevalência e classificação

A incidência da obesidade vem avançando ao longo dos anos. Segundo as estatísticas da Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2014, 39% dos adultos com idade superior a 18 anos estavam acima do peso e 13% eram obesos ($\text{IMC} \geq 30 \text{ kg / m}^2$), 11% dos homens e 15% das mulheres, sendo que a maior prevalência se concentra nos países da América. Assim, cerca de 2 bilhões de adultos em todo o mundo estão acima do peso e, destes, mais de meio bilhão são obesos (OMS, 2014).

Segundo a ABESO, 2010 e OMS, 2014; a obesidade é definida e classificada de acordo com o IMC (Quadro 3), composto pela variável peso e altura que são medidas de fácil aplicabilidade e que possuem pontos de cortes já definidos e com boa associação com riscos de morbimortalidade (ABESO, 2010; OMS, 2014).

Quadro 3. Classificação Clínica de acordo com o Índice de Massa Corporal.

	IMC
Baixo Peso	<18,5
Eutrofia	18,5-24,9
Sobrepeso	25-29,9
Obeso grau I	30,0-34,9
Obeso grau II	35,0-39,9
Obeso grau III	≥ 40

Adaptada de: ABESO, 2010.

A gordura abdominal é associada com aumento do risco cardiovascular independente da obesidade total. Por isso, é importante também a aferição da circunferência abdominal como um indicador de risco metabólico visto que demonstra, indiretamente, a quantidade de gordura visceral do indivíduo (ABESO, 2010). Os pontos de corte da circunferência da cintura são: para mulheres até 80 cm, sendo >80 cm considerado risco aumentado e >88 cm alto risco de complicações metabólicas e para homens até 94 cm, sendo >94 aumentado e >102 alto risco (OMS, 2000).

1.2.2 Obesidade, Síndrome Metabólica e DHGNA

A obesidade e a circunferência abdominal compõem o conjunto de fatores de risco cardiovasculares que definem a síndrome metabólica (Quadro 4), que inclui também alteração na glicemia plasmática, altos níveis de colesterol e de pressão arterial (IDF, 2006).

Quadro 4. Critérios para diagnóstico da síndrome metabólica segundo IDF, 2006.

<p>*Obesidade Central: (Circunferência abdominal > 94 cm em homens e >80 cm em mulheres)</p> <p><i>Associada a mais dois dos fatores abaixo:</i></p>	
Triglicerídeos aumentados	≥150mg/dL ou tratamento para dislipidemia
Glicemia Plasmática aumentada	≥100mg/dL ou diagnóstico de diabetes melitus.
HDL-colesterol diminuído	<40mg/dL em homens e <50 mg/dL em mulheres ou tratamento para dislipidemia
Pressão Arterial aumentada	Pressão sistólica ≥130 mmHg ou diastólica ≥85mmHg ou tratamento para hipertensão arterial

*Se o IMC>30, já é considerado obesidade central, não há necessidade da aferição da circunferência da cintura.

Atualmente, a DHGNA é considerada uma manifestação hepática da síndrome metabólica (SM) e, sendo assim, sua incidência aumenta à medida que a obesidade torna-se uma epidemia (PATEL, 2016; HANNAH E HARRISON, 2016). Apesar de a DHGNA ser comum em indivíduos com IMC elevado, aqueles que apresentam predomínio de gordura visceral (abdominal) tem maior tendência de desenvolver características da SM e DHGNA do que os que apresentam maior acúmulo de gordura subcutânea. Isso explica a importância da razão cintura-quadril em relação ao IMC na identificação desses pacientes (MORELI, 2013; PATEL, 2016). Portanto, o rastreamento de DHGNA em pacientes obesos é recomendado, visto que essa condição é considerada de risco (EASL–EASD–EASO, 2016).

Alguns estudos (BITENCOURT, 2007; FEIJÓ, 2013; REHA, 2014) mostraram, através biópsia hepática, alta prevalência de DHGNA em pacientes obesos submetidos à cirurgia bariátrica.

A cirurgia bariátrica pode ser considerada como medida terapêutica para redução de peso e complicações metabólicas. Além da perda de peso e consequente diminuição da resistência à insulina, ocorre redução na gordura do fígado e da progressão da DHGNA (SHUAI, 2015; EASL-EASD-EASO, 2016). Recentemente, um estudo de coorte Lassailly (2015) mostrou que a perda de peso associada à cirurgia bariátrica resultou em desaparecimento de NASH em 85% dos pacientes e diminuição da fibrose hepática em 34%.

Os critérios de indicação de cirurgia bariátrica, segundo o Ministério da Saúde, estão dispostos no Quadro 5.

Quadro 5. Critérios de indicação de cirurgia Bariátrica

1) IMC > 50 Kg/m² 2) IMC > 40 Kg/m², com ou sem comorbidades, sem sucesso no tratamento clínico (Atenção Básica e/ou na Atenção Ambulatorial Especializada) por no mínimo dois anos e que tenham seguido protocolos clínicos. 3) IMC > 35 kg/m² e com comorbidades (alto risco cardiovascular, diabetes mellitus e/ou hipertensão arterial sistêmica de difícil controle, apneia do sono, doenças articulares degenerativas) sem sucesso no tratamento clínico longitudinal realizado por no mínimo dois anos e que tenham seguido protocolos clínicos.

Fonte: Ministério da Saúde, BRASIL. PORTARIA Nº 425, 2013. IMC: Índice de Massa Corporal.

1.3 VITAMINA D

1.3.1 Metabolismo:

A vitamina D é uma vitamina lipossolúvel encontrada basicamente em duas formas: o colecalciferol (vitamina D3) e ergocalciferol (vitamina D2). Essas são obtidas através da ingestão de alimentos fonte como peixes (salmão, cavala e arenque), cogumelos e ovos ou por suplementação (LICHTENSTEIN, 2013; MAEDA, 2014). O colecalciferol, no entanto, também pode ser produzido através do 7-deidrocolesterol existente nas células da epiderme que, quando exposto à luz solar (raios UV-B), é convertido à pré-vitamina D3 e à vitamina D3 por reação de isomerização - Figura 1 (ELIADES E SPYROU, 2015).

O Guia prático de suplementação da vitamina D em população saudável e grupos de riscos para Europa Central (PLUDOWSKI, 2013) sugere que, para produção de vitamina D através da pele, é necessário a exposição ao sol cerca de 15 minutos em 18% da superfície corporal sem o uso de protetor solar. Por ser um fator de risco para o desenvolvimento de câncer de pele, é recomendada que não haja exposição excessiva ao sol, dando preferência aos horários entre 10:00 e 15:00 horas (HOLICK, 2008; PLUDOWSKI, 2013).

Para se tornar ativa e exercer seus efeitos no organismo, a vitamina D passa por dois processos de metabolização, Figura 1. No primeiro processo, as vitaminas vindas da dieta e as produzidas na pele chegam no fígado através da circulação, onde são metabolizadas pela enzima 25-hidroxilase (CYP2R1) à 25-hidroxivitamina D [25(OH)D], chamado de calcidiol, que é a forma mais encontrada na circulação (LICHTENSTEIN, 2013; ELÍADES, 2013; ELIADES E SPYROU, 2015). A segunda etapa ocorre nos rins, onde a [25(OH)D] passa por processo de hidroxilação pela enzima 1 α -hidroxilase (CYP27B1), transformando-se em 1,25-diidroxivitamina D [1,25 (OH)₂D] (WIERZBICKA, 2014; ELIADES E SPYROU, 2015), esta torna-se operante e com capacidade de se ligar aos receptores teciduais de vitamina D, chamados Vitamin D Receptor (VDR) (LICHTENSTEIN, 2013). Além desse mecanismo, o sistema imune também sintetiza vitamina D na forma ativa por meio da estimulação dos macrófagos por interferon-gama e lipopolissacarídeos (HAN, 2013).

Figura 1. Representação esquemática do metabolismo da vitamina D. **Adaptado de:** ELIADES E SPYROU, 2015. CYP2R1: enzima 25-hidroxilase e CYP27B1: enzima 1 α -hidroxilase.

A regulação da síntese da [1,25 (OH)₂D] é realizada pela atividade da 1 α -hidroxilase (CYP27B1), que é estimulada pelo hormônio da paratireoide (PTH) e suprimida pelo fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF23), sendo este responsável por promover a atividade da 24-hidroxilase, que exerce o catabolismo da vitamina, transformando em ácido calcitriólico excretado na bile (LICHTENSTEIN, 2013; ELIADES E SPYROU, 2015).

1.3.2 Funções da vitamina D

A principal função da vitamina D (1,25 (OH) 2D3) é controlar a homeostase óssea e facilitar a absorção de cálcio (VERSTUYF, 2010; ELÍADES, 2015). A vitamina D tem também propriedades anti-inflamatórias e anti-fibróticas e contribui para a regulação do sistema imune servindo como medida protetora contra infecções (HAN, Y-P et al., 2013; DONGIOVANI, P. et al, 2016).

Nas últimas décadas, foi questionado o conceito de função parácrina / autócrina da vitamina D além do metabolismo do cálcio e ossos, visto que foi descoberta a presença de receptores de vitamina D (VDR) e da enzima 25 (OH) D3-1 α -hidroxilase em vários tecidos não clássicos (VERSTUYF, 2010).

1.3.3 Valores de referência

Para quantificar o estoque corporal de vitamina D, deve ser realizada a mensuração de níveis séricos de 25(OH)D, que é forma mais encontrada na circulação. É recomendada a dosagem em indivíduos que tenham risco de deficiência, como idosos, pacientes com osteoporose e obesos (MAEDA, 2014).

Na literatura existem duas classificações distintas de valores de referências, a primeira é da Sociedade de Endocrinologia Norte-Americana, Holick (2011), que considera níveis séricos ≤ 20 ng/mL como deficiência; 21-29,9 ng/mL insuficiência; ≥ 30 ng/mL desejável. A segunda é proposta pelo o Instituto de Medicina- *Institute of Medicine (IOM)* (ROSEN, 2012), que identifica ≥ 20 ng/ml como normal e < 20 ng/ml deficiência.

A Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia considera níveis ≥ 30 ng/ml como desejáveis, visando principalmente os benefícios ósseos (MAEDA, 2014).

Como a maior parte da síntese de vitamina D depende da exposição solar, espera-se que países de clima frio apresentem maior prevalência de hipovitaminose D. Apesar disso, a deficiência da vitamina D pode ser encontrada em países tropicais como o Brasil. Outros fatores, como estação do ano e fototipo de pele, também podem influenciar na produção da vitamina através da pele (CORREIA, 2014; MAEDA, 2014).

1.3.4 Vitamina D x DHGNA

Estudos recentes são controversos em relação ao papel da vitamina D na DHGNA. Alguns achados sugerem que a deficiência vitamina D pode contribuir para o desenvolvimento e progressão da doença (BHATT, 2013; ELÍADES, 2013; SEO, 2013; DASARATHY, 2014; KÜÇÜKAZMAN, 2014).

Apesar dos mecanismos que envolvem a associação entre a vitamina D e a DHGNA não serem completamente elucidados, sugere-se que as propriedades anti-inflamatórias e imuno-reguladoras da vitamina D possam exercer um papel importante na regulação do estresse oxidativo, produção de citocinas pró-inflamatórias e apoptose de hepatócitos (ELÍADES, 2013).

Dentre os possíveis fatores que explicam os benefícios da vitamina D e DHGNA, foi achado, no estudo de Barchetta (2012), que a expressão de receptores de vitamina D (VDR) em células específicas do fígado foi inversamente relacionada à gravidade da DHGNA, quando avaliados parâmetros histológicos (BARCHETTA, 2012; ELÍADES, 2015).

Outro possível mecanismo consiste na hipótese de que a vitamina D suprime a proliferação de células estreladas do fígado, que são produtoras de colágeno e responsável por sua deposição e consequente formação da fibrose hepática (POTTER, 2013; DING, 2013; ELÍADES, 2015).

Por outro lado, existem trabalhos que não encontraram associação da deficiência da vitamina D com a DHGNA (LI, 2013; CATENA, 2013; DIEZ RODRIGUEZ, 2014; BRIL, 2015; ANTY, 2016; SEZER, 2016). Além disso, em um estudo de Barchetta (2016), a suplementação de vitamina D não mostrou melhora na esteatose hepática ou enzimas hepáticas em pacientes com DHGNA.

2 JUSTIFICATIVA

A DHGNA é uma causa comum de doença crônica do fígado, que está se tornando um grave problema de saúde pública em todo o mundo (SAYINER, 2016), além de ser também considerada uma manifestação hepática da síndrome metabólica (PATEL, 2016).

A prevalência tem aumentado, em parte, pelo crescimento do número de adultos e crianças obesas, com síndrome metabólica ou diabetes melitus, que são fatores de risco para o desenvolvimento da DHGNA (KALIA E GAGLIO, 2016) que, por sua vez, são condições associadas à incidência aumentada de deficiência de vitamina D (ALEMZADEH, 2008).

Estudos atuais divergem sobre a relação entre a deficiência da vitamina D e a gravidade da DHGNA. Assim, fazem-se necessários estudos visando relacionar os níveis séricos de 25-hidroxivitamina D, a presença de componentes da síndrome metabólica, níveis séricos de citocinas, e a prevalência e gravidade da DHGNA.

3 HIPÓTESE

Níveis séricos de vitamina D estão diminuídos em pacientes obesos com diagnóstico de DHGNA, e relacionam-se com a gravidade da DHGNA e com marcadores inflamatórios e estão associados aos componentes da síndrome metabólica.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Verificar se há associação entre níveis séricos de vitamina D e a presença e a gravidade da DHGNA.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar níveis séricos de 25(OH)D entre indivíduos saudáveis, pacientes com esteatose pura e pacientes com esteatohepatite.
- Avaliar se há relação entre valores de vitamina D séricos e parâmetros do estado nutricional (Peso, IMC, CC, CA, %GC)
- Avaliar se há relação entre valores séricos de vitamina D e níveis séricos de citocinas (IL-6, TNF- α e IL-10).
- Avaliar se há associação entre valores de vitamina D séricos e a gravidade da lesão hepática.
- Avaliar os níveis séricos das citocinas relacionadas ao processo inflamatório (IL-6, TNF- α e IL-10) em pacientes com esteatose pura e pacientes com esteatohepatite.
- Avaliar se há associação entre valores de citocinas séricos e a gravidade da lesão hepática.
- Avaliar se há associação entre a presença de síndrome metabólica e a gravidade da lesão hepática

5 CASUÍSTICA E MÉTODOS

Estudo observacional, do tipo corte transversal, realizado com pacientes do ambulatório de Cirurgia Bariátrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP). Todos os participantes foram previamente convidados e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido- TCLE (APÊNDICE A).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição sob o Parecer 710.963/2014. (ANEXO A). No mesmo, também foi aprovado a criação de um biorrepositório denominado “Biorrepositório de amostras de pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica” composto por amostras de soro e fígado para fins de pesquisa e análises científicas vinculadas a esse projeto. Toda coleta e armazenamento de material foi precedida de um “termo de consentimento de guarda de material” (APÊNDICE B), assinado em duas vias, pelo pesquisador e pelo doador.

A coleta de dados foi realizada a partir da aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa, sendo iniciada em novembro de 2014 e finalizada em dezembro de 2015.

5.7 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Participaram da pesquisa pacientes do ambulatório de Cirurgia Bariátrica que foram submetidos à cirurgia bariátrica e como procedimento cirúrgico rotineiro realizaram biópsia hepática.

Os critérios de inclusão foram: mulheres acima de 18 anos, obesas, com indicação de cirurgia bariátrica e com diagnóstico de DHGNA através de biópsia hepática, que aceitaram participar da pesquisa. Foram excluídos portadores de doenças hepáticas agudas ou crônicas (exceto DHGNA), ingestão de álcool relevante, admitindo-se consumo ≥ 20 g/dia como significativo para mulheres (MANDAYAM, 2004; EASL, 2012), uso de suplementação de vitamina D ou cálcio, uso de anti-inflamatórios e outras doenças que podem interferir no metabolismo da vitamina D e cálcio (hipotireoidismo não tratado).

Segundo a agenda do ambulatório de Cirurgia Bariátrica, a cada semana eram internados de um a dois pacientes para realização do procedimento cirúrgico. Os pacientes que preencheram os critérios do estudo foram entrevistados pelo pesquisador no dia da internação, que ocorria dois dias antes da cirurgia, e convidados a participar do estudo; e aqueles que consentiram em colaborar, foram cientificados de todo procedimento a que seriam submetidos, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e responderam ao questionário protocolo da pesquisa (APÊNDICE C). O questionário era composto por perguntas referentes a dados pessoais (idade, escolaridade, tabagismo, etilismo e atividade física) e dados clínicos (comorbidades associadas e uso de medicamentos). Foram também coletados dados bioquímicos (glicemia, enzimas hepáticas ALT, AST e gama GT; TSH, albumina, ferro, ferritina, fosfatase alcalina, hemoglobina e plaquetas e lipidograma) do prontuário eletrônico.

No dia seguinte à internação, com o paciente em jejum de 10 horas, foram coletadas amostras de sangue de veia periférica para dosagem da vitamina D (25-hidroxivitamina D) e citocinas relacionadas ao processo inflamatórias (IL-6, TNF- α e IL-10) e feita avaliação nutricional, composta por antropometria e avaliação da composição corporal. Após a coleta, o pesquisador dirigia-se ao Laboratório de Gastroenterologia do HCRP/USP para separação e congelamento das amostras (6 eppendorfs com 300-500 μ L de soro) em freezer a -80°C.

Como procedimento de rotina da cirurgia, foi coletado um fragmento em cunha de tecido hepático. O mesmo era dividido em 2 fragmentos, sendo um deles conservado em formol a 10% e enviado para análise do Serviço de Patologia do HCFMRP-USP e o outro imediatamente colocado em frasco com nitrogênio líquido e posteriormente armazenado a -80°C para compor o “Biorrepositório de amostras de pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica”.

No Quadro 6 está representado o esquema de coleta de dados, detalhando os dias de abordagem ao paciente.

Quadro 6. Esquema de coleta de dados dos pacientes incluídos no estudo.

1° dia: Internação para cirurgia bariátrica	- Seleção e recrutamento dos pacientes que se encaixaram nos critérios do estudo; - Conscientização sobre os procedimentos da pesquisa e assinatura do TCLE; - Preenchimento do questionário de avaliação (dados pessoais e clínicos).
2° dia: Coleta(em jejum)	- Coleta de amostra de sangue para dosagem de citocinas inflamatórias e vitamina D; - Antropometria; - Avaliação da composição corporal.
3° dia: Cirurgia	- Coleta de fragmento hepático para análise histopatológica.

5.2 SUJEITOS

A amostra foi constituída de 40 pacientes diagnosticados com DHGNA e que foram separados, de acordo com o resultado da biópsia, em dois grupos: portadores de esteatose pura e portadores de esteatohepatite (NASH), estes últimos foram ainda estratificados de acordo com a gravidade da lesão hepática e de fibrose.

Foram selecionadas ainda 37 indivíduos do sexo feminino, com níveis séricos normais de ALT e AST, com $IMC < 30 \text{ kg/m}^2$ e da mesma faixa etária da população do presente trabalho para compor o grupo controle de vitamina D. Esses indivíduos foram selecionados a partir do estudo de Bastos, C. (2014), que foi composto por funcionários ou parentes de funcionários do HC-FMRP/USP, considerados assintomáticos e presumivelmente saudáveis (CS), que não tinham qualquer relacionamento pessoal ou profissional com o pesquisador, não usavam medicações para tratamento de qualquer doença crônica e relataram não terem contraído nenhuma doença no último mês antes da coleta de sangue.

5.3 AVALIAÇÃO NUTRICIONAL

A avaliação do estado nutricional incluiu a análise dos parâmetros antropométricos e de composição corporal.

5.3.1 Avaliação antropométrica

As medidas antropométricas foram realizadas pela pesquisadora em todos os indivíduos. O peso corporal, em kg, foi aferido em balança eletrônica Filizola® do tipo plataforma, com capacidade máxima de 300 kg e precisão de 0,1kg, e a estatura, em estadiômetro com precisão de 0,1 cm, estando o indivíduo com roupas leves, descalço, com braços estendidos ao longo do corpo e calcanhares juntos, tocando a haste vertical e posicionados no centro do equipamento. O IMC foi calculado a partir fórmula $\text{Peso}/\text{Estatura}^2$, resultando em um valor expresso em kg/m^2 (OMS, 2000). Os pacientes foram classificados, de acordo com o IMC, em Obesos grau II (entre 35-39,9 kg/m^2) e grau III ($\text{IMC} \geq 40$) (ABESO, 2010).

A aferição da circunferência da cintura (CC) foi realizada segundo o método da OMS e de Lohman, (1988) com auxílio de uma fita métrica não extensível, com o indivíduo em pé, na região mais estreita do abdômen ou no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca. Foram considerados valores limítrofes associados ao desenvolvimento de complicações metabólicas, relacionadas a risco cardiovascular, sendo $>80\text{cm}$ considerado elevado e $>88\text{cm}$ muito elevado para mulheres. (OMS, 2000)

A circunferência do abdômen (CA) foi aferida no local de máxima extensão da região do abdômen conforme recomendado (LOHMAN,1988).

A circunferência do quadril (CQ) foi medida na área de maior diâmetro para o calculado da razão cintura-quadril ($\text{RCQ} = \text{CC}/\text{CQ}$), que foi usado também como indicador de acúmulo de gordura abdominal, admitindo-se uma relação $>0,85$ para mulheres como sendo de alto risco para desenvolvimento de complicações metabólicas (OMS, 2000).

5.3.2 Avaliação da composição corporal

A avaliação da composição corporal foi realizada através do método de bioimpedância elétrica, que se baseia no princípio da condutividade elétrica para a estimativa dos compartimentos corporais, assumindo que os tecidos magros têm maior condutividade elétrica e menor impedância do que o tecido adiposo devido ao alto teor de água e eletrólitos (MAHAN E ESCOTT- STUMP, 2010).

Para realização do teste, foi utilizado o aparelho *Biodynamics 310®* e foram seguidas as recomendações pertinentes para que o estado hídrico do paciente não fosse influenciado, como, por exemplo, estar em jejum, evitar consumo de álcool e bebidas cafeinadas e não ter praticado atividade física intensa nas últimas 24 horas. Os indivíduos foram orientados a retirar todos os adereços metálicos, tais como correntes, brincos e outros.

As avaliações foram realizadas da seguinte forma: o paciente estava deitado no leito, em decúbito dorsal, e com as pernas bem afastadas. Após a limpeza da pele com um pedaço de algodão umedecido com álcool, foram colocados os eletrodos nos pontos anatômicos pré-definidos; no pé direito, sendo o eletrodo distal na base do dedo médio e o eletrodo proximal acima da linha da articulação do tornozelo, entre os maléolos medial e lateral; e na mão direita o eletrodo distal na base do dedo médio e o eletrodo proximal um pouco acima da linha da articulação do punho, coincidindo com o processo estiloide (REIS FILHO, 2011).

O cabo sensor foi então conectado no monitor e na extremidade dos eletrodos, sendo os clips vermelhos nos eletrodos proximais e os pretos nos distais. O aparelho foi ligado e após o preenchimento dos dados necessários (peso, idade, altura e sexo) foi realizado o teste.

5.4 DOSAGEM DE VITAMINA D SÉRICA

As dosagens da vitamina D foram realizadas no laboratório de Endocrinologia do HCFMRP-USP pelo método de QUIMIOLUMINESCÊNCIA, utilizando-se aparelho da marca Liaison e o kit *Liaison® 25 OH Vitamin D Total*, Diasorin®.

O ensaio *LIAISON® 25 OH Vitamin D* é um imunoensaio quimioluminescente competitivo (CLIA) direto para determinação quantitativa de 25OH vitamina D total no soro. Na primeira incubação a vitamina D é dissociada da sua proteína de ligação e liga-se ao anticorpo específico na fase sólida. Após 10 minutos, o material não ligado é removido com um ciclo de lavagem. Subsequentemente, os reagentes iniciadores são então adicionados e inicia-se uma reação quimioluminescente rápida. O sinal da luz é medido por um fotomultiplicador como unidades de luz relativas (RLU), sendo inversamente proporcional à concentração de 25 OH vitamina D presente nos calibradores, nos controles ou nas amostras.

Os resultados foram classificados como: ≤ 20 ng/mL deficiência, 21-29,9 ng/mL limítrofe/insuficiência e ≥ 30 ng/mL normal/ desejável (HOLICK, 2011) e de acordo com a classificação do *Institute of Medicine (IOM)* (ROSEN, 2012).

5.5 DOSAGENS DE CITOCINAS SÉRICAS

As dosagens das citocinas IL-6, TNF- α e IL-10 foram realizadas através do ensaio Luminex xMAP, e kit Multiplex da marca MerckMillipore®.

5.6 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Uma biópsia hepática em cunha foi colhida de cada paciente durante a cirurgia. O fragmento foi dividido em 2, sendo um deles congelado para compor o biorrepositório da pesquisa e o outro conservado em formol a 10% e enviados para análise e processamento rotineiro no Laboratório de Patologia do HCFMRP- USP, onde foram submetidos as seguintes colorações: hematoxilina-eosina, tricrômico de Masson, reticulina e Perl's. Posteriormente, todos os fragmentos foram revistos por um único patologista experiente, que definiu o diagnóstico da doença hepática e do grau de lesão hepática em esteatose pura ou NASH segundo os critérios de Brunt (1999).

Foi realizada avaliação histopatológica baseada na classificação padronizada por Kleiner (2005), que é recomendada para estudos clínicos por avaliar características histológicas como presença de esteatose, inflamação, balonização e fibrose e que inclui um sistema de escores de atividade para DHGNA, conhecido como escore NAS (NAFLD Activity Score). O escore NAS é definido pela soma dos graus de esteatose (0-3), inflamação lobular (0-3) e balonização (0-2). Os valores NAS ≥ 5 correlacionam-se ao diagnóstico de NASH e < 3 não NASH (Quadro 7).

Quadro 7. Definição e escores com base nos achados de biópsia hepática.

	DEFINIÇÃO	ESCORE
ESTEATOSE		
Grau	<5%	0 ()
	5-33%	1 ()
	>33-60%	2 ()
	>60%	3 ()
Localização	Zona 3	0 ()
	Zona 1	1 ()
	Azonal	2 ()
	Paracinar	3 ()
Esteatose Microvesicular	Ausente	0 ()
	Presente	1 ()
INFLAMAÇÃO		
Lobular	Nenhum	0 ()
	<2 campos por 200x	1 ()
	2-4 campos por 200x	2 ()
	>4 campos por 200x	3 ()
Microgranulomas	Ausente	0 ()
	Presente	1 ()
Grandes microgranulomas	Ausente	0 ()
	Presente	1 ()
Inflamação Portal	Nenhuma ou mínima	0 ()
	>mínima	1 ()
BALONIZAÇÃO		
	Nenhuma célula	0 ()
	Poucas células	1 ()
	Muitas células	2 ()
FIBROSE		
Estágio	Sem fibrose	0 ()
	Perisinusoidal ou periportal	1 ()
	Leve, zona 3, perisinusoidal	1 ^a ()
	Moderada, zona 3, perisinusoidal	1b ()
	Portal/Periportal	1c ()
	Perisinusoidal e Portal/Periportal	2 ()
	Fibrose em Ponte	3 ()

Adaptado de: NASH Clinical Research Network System (KLEINER, 2005)

5.7) ANÁLISE DOS DADOS

Os pacientes foram divididos em portadores de esteatose pura e NASH, os quais foram ainda estratificados de acordo com a gravidade da lesão hepática (histopatologia) e escore NAS. Esses grupos foram comparados quanto aos valores de vitamina D e citocinas, dados antropométricos e de composição corporal, exames bioquímicos e presença de síndrome metabólica. Além disso, os níveis séricos de vitamina D desses pacientes foram comparados a um grupo controle saudáveis.

Os dados foram analisados no programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences). Os resultados foram submetidos a um teste de normalidade para verificar a distribuição dos dados através do teste de Shapiro-Wilk, admitindo-se nível de significância de $p < 0,05$.

Os dados que apresentaram distribuição normal foram analisados por meio de testes paramétricos como teste t e ANOVA seguido do teste *post hoc* de Bonferroni para verificar a diferença entre os resultados. Os dados que rejeitaram a hipótese de normalidade ($p \leq 0,05$) foram analisados utilizados testes não-paramétricos, como Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, seguido de teste *post hoc* de Dunn. As variáveis foram apresentadas em médias e desvio-padrão

A associação entre variáveis contínuas com distribuição normal foi realizada pelo teste de correlação Pearson.

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Participaram no total 45 pacientes do sexo feminino com média de 42 anos. Dessas, 5 apresentaram biópsia normal e 40 (88,8%) tiveram diagnóstico de DHGNA e foram incluídas no estudo, sendo 62,5% classificadas como esteatose pura e 37,5% como NASH de acordo com a biópsia hepática. Na tabela 1 encontram-se as características gerais de acordo com os grupos do estudo.

Tabela 1. Características clínicas dos pacientes incluídos no estudo dividido de acordo com o diagnóstico histopatológico de esteatose pura ou esteatohepatite (NASH).

Variável	Esteatose Pura (n=25)	Esteatohepatite NASH (n=15)
Idade (anos)	40,96± 9,48	44,06±9,96
Comorbidades Associadas		
Hipertensão Arterial Sistêmica	56%	73,3%
Diabetes Melitus	4%	40%
Hipotireoidismo	12%	20%
Dislipidemia	12%	13,3%
Hipercolesterolemia	28%	40%
Hipertrigliceridemia	24%	33,3%
HDL<50mg/dL	92%	86,6%
Síndrome Metabólica**	60%	73,3%

Nota: Os valores são expressos em média ±desvio padrão e porcentagens. **A síndrome metabólica foi avaliada segundo os valores da IDF, 2006.

A prática de atividade física foi relatada por 92,5% das pacientes, sendo a caminhada e exercícios aeróbicos as mais citadas, 72,5% e 25%, respectivamente. A frequência média foi de quatro vezes por semana com duração média de 50 minutos.

Os medicamentos anti-diabéticos utilizados foram: a metformina, relatado uso por 7 pacientes (17,5%); glicazida (2,5%); glifage (2,5%) e insulina NPH (2,5%).

Os exames bioquímicos observados nos dois grupos (esteatose e NASH) estão mostrados na Tabela 2. Os resultados foram semelhantes entre os grupos, exceto pelos valores séricos de fosfatase alcalina que foram significativamente maiores no grupo NASH ($p=0,02$).

Tabela 2. Exames bioquímicos de rotina de acordo com os pacientes incluídos no estudo e divididos de acordo com os resultados da biópsia hepática em esteatose pura e NASH.

Exame Bioquímico	Valor de Referência	Esteatose Pura (n=25)	NASH (n=15)
Glicemia (mg/dL)	70-100	93,32±13,6	102,26±19,5
AST (U/L)	≤32	20,2±4,82	20,6±3,62
ALT(U/L)	≤31	22,5±7,58	24,5±6,75
GAMA GT (U/L)	11-50	28,5±15,8	33,5±19,6
Colesterol (mg/dL)	<200	174,8±35,8	191,93±26,4
LDL-c (mg/dL)	<130	109,64±33,7	124,66±26,09
Triglicerídeos (mg/dL)	<150	117,36±40,8	131,13±43,22
HDL-c (mg/dL)	>50	40±7,02	41±7,88
TSH (mU/L)	0,4-4,0	1,96±0,80	1,44±0,81
Ferritina (ng/mL)	6-159	126±82,8	176,4±132,8
Ferro (µg/dL)	50-170	71,04±25,3	68,4±20,6
Fosfatase Alcalina (U/L)*	65-300	174,5±32,4	196,2±26,77
Albumina (g/dL)	3,5-4,8	4,12±0,33	4,28±0,26
Hemoglobina (g/dL)	12-15,5	12,95±1,01	12,81±2,36
Plaquetas (µL)	150-450	305,7±89,74	275,1±72,6

Nota: Valores expressos em média ± desvio padrão. AST= Aspartato aminotransferase; ALT= Alanina aminotransferase; GAMA-GT= Gamaglutamiltransferase; LDL-c= lipoproteína de baixa densidade; HDL-c= lipoproteína de alta densidade; TSH= Hormônio estimulante da tireóide. * diferentes estatisticamente ($p<0,05$): Fosfatase Alcalina: Grupo esteatose pura x esteatohepatite ($p=0,02$)

Na avaliação antropométrica as pacientes tiveram média de peso de 111,9 Kg e o IMC de 43,7kg/m², sendo 30% obesos grau II e 70% obesos grau III. Na tabela 3 encontram-se os parâmetros da avaliação nutricional por grupo. Não houve diferença entre os grupos em relação às variáveis antropométricas.

Tabela 3. Avaliação antropométrica e gordura corporal dos pacientes incluídos no estudo e divididos de acordo com os resultados da biópsia hepática em esteatose pura e NASH.

Variável	Esteatose Pura (n=25)	NASH (n=15)
Peso (kg)	110,57±18,08	114,14±17,68
Altura (m)	1,59±0,08	1,60±0,06
IMC (kg/m ²)	43,36±4,18	44,4±5,80
Gordura Corporal (%)	45,25±3,14	46,1±2,09
Circunferência Abdominal (cm)	123,37±12,02	125,92±14,37
Circunferência Cintura (cm)	110,94±11,33	114,2±15,17
Circunferência Quadril (cm)	129,62±14,33	130±12,34
Relação Cintura Quadril	0,86±0,11	0,87±0,08

Nota: Os valores são expressos em média ±desvio padrão. IMC= Índice de Massa Corporal.

As médias das dosagens séricas de vitamina D, interleucinas-6 e IL-10 e fator de necrose tumoral alfa estão mostradas na tabela 4, Não se observou diferença significativa dos comparando-se os dois grupos (esteatose pura e NASH).

Tabela 4. Níveis séricos de Vitamina D- 25(OH)D e de citocinas dos pacientes incluídos no estudo e divididos de acordo com os resultados da biópsia hepática em esteatose pura e NASH.

	Esteatose Pura (n=25)	NASH (n=15)
Interleucina-10 (pg/mL)	1,42±0,89	1,86±2,23
Interleucina-6 (pg/mL)	1,81±0,92	1,51±0,72
TNF- α (pg/mL)	10,11±5,57	7,8±4,34
25(OH)D (ng/mL)	26,5±7,38	28,66±8,4

Nota: Os valores são expressos em média ±desvio padrão. TNF- α = Fator de necrose tumoral.

As características das biópsias segundo os critérios de Kleiner (2005) estão mostradas na tabela 5. A grande maioria dos pacientes apresentava esteatose grau 1 (82,5%). Fibrose hepática grau 1 foi observada em 90% dos casos.. Apenas 4 pacientes apresentaram graus 2 ou 3 de fibrose hepática. Inflamação lobular foi observada em 32,5% dos pacientes e balonização foi observada em 72,5%. NAS score < 3 foi observado em 62,5% dos casos.

Tabela 5. Achados histopatológicos das biópsias de fígado dos pacientes incluídos no estudo.

Características	Pacientes (n)	%
I) Esteatose	40	100%
LEVE (escore 1)	33	82,5%
MODERADA (escore 2)	5	12,5%
GRAVE (escore 3)	2	5%
II) Inflamação Lobular	13	32,5%
III) Balonização	29	72,5%
IV) Fibrose		
Grau 1	36	90%
Grau 2	1	2,5%
Grau 3	3	7,5%
NAS score		
NAS ≥ 5	5	12,5%
NAS= 3 e 4	10	25%
NAS < 3	25	62,5%

As Figuras 2 e 3 ilustram os achados de biopsia hepática de pacientes com esteatohepatite e esteatose, respectivamente.

Figura 2. A e B- Fotomicrografias de paciente com esteatohepatite apresentando esteatose em mais de 60% da amostra e infiltrado inflamatório misto periportal (H&E, 20 e 40x). C e D- Fotomicrografias de paciente com esteatohepatite apresentando esteatose em mais de 60% da amostra e septo fibroso (Tricrômico de Masson, 20 e 40x).

Figura 3. Fotomicrografias de paciente com esteatose hepática pura: esteatose moderada (34-66%), sem evidência de inflamação ou fibrose. (H&E, 20 e 40x).

6.2 ANÁLISES DA VITAMINA D

Em relação à vitamina D, dos 40 participantes, 17,5% apresentaram deficiência (valores $<20\text{ng/mL}$), 52,5% apresentaram valores entre 20-30 (insuficiência) e 30% valores ≥ 30 , considerado desejável.

Na tabela 6 encontram-se as médias dos valores de vitamina D nos grupos do estudo e grupo controle, além das dosagens das enzimas hepáticas TGO/TGP comparadas entre os 3 grupos. Conforme o esperado, os valores de IMC foram menores no grupo controle saudáveis. ($p=0,001$). Não houve diferença comparando-se idade dos 3 grupos (controles saudáveis, esteatose pura e NASH). Os valores de ALT foram significativamente menores nos controles saudáveis comparados aos grupos esteatose e NASH. Porém, não houve diferença comparando-se esteatose pura e NASH.

Tabela 6. Variáveis analisadas entre grupo controle e grupos do estudo.

Variável	Controle (n=37)	Esteatose Pura (n=25)	Esteatohepatite (NASH) (n=15)
Idade (anos)	41,64 $\pm$ 11,2	40,96 $\pm$ 9,48	44,06 $\pm$ 9,96
IMC* (kg/m ²)	23,64 $\pm$ 2,81	43,36 $\pm$ 4,18	44,4 $\pm$ 5,80
AST (U/L)	20 $\pm$ 6,64	22,5 $\pm$ 7,58	24,5 $\pm$ 6,75
ALT** (U/L)	18,2 $\pm$ 9,52	28,5 $\pm$ 15,8	33,5 $\pm$ 19,6
25(OH)D (ng/mL)	27,69 $\pm$ 12,49	26,5 $\pm$ 7,38	28,66 $\pm$ 8,4

Nota: Os valores são expressos em média $\pm$ desvio padrão. IMC= Índice de massa corporal; AST= Aspartato aminotransferase; ALT= Alanina aminotransferase; 25(OH)D= Vitamina D. * diferentes estatisticamente ($p<0,05$). *IMC: Grupo controle x demais grupos ($p=0,001$) **ALT: Grupo controle x Esteatose pura ($p=0,03$) e Grupo controle x NASH ($p=0,01$).

Não se observou diferença nos valores séricos de vitamina D comparando-se os três grupos estudados (controles, esteatose pura e NASH) (Gráfico 1).

Gráfico 1. Distribuição dos valores séricos de vitamina D nos três grupos incluídos no estudo (controles saudáveis, esteatose pura e NASH).

Foi analisada a associação entre a vitamina D e os parâmetros antropométricos (peso, IMC, circunferência da cintura, circunferência do quadril, circunferência abdominal, porcentagem de gordura abdominal), valores séricos de citocinas (IL-6, IL-10 e TNF- α) e escore NAS observado na biópsia hepática nos pacientes com esteatose pura e nos pacientes com NASH. Desses, o único parâmetro que apresentou correlação significativa foi o IMC (Gráfico 2), Observando-se correlação negativa, ou seja, quanto maior o IMC, menor os níveis de 25(OH)D ($r = -0,35$ $p=0,03$).

Gráfico 2. Correlação entre os valores séricos de vitamina D e valores de IMC dos pacientes com esteatose pura e dos pacientes com NASH incluídos no estudo.

7.3 Análises dos parâmetros histopatológicos

Para avaliar a associação entre a gravidade da doença e os níveis séricos de vitamina D, citocinas e de síndrome metabólica; os pacientes foram divididos de acordo com as características histopatológicas de lesão hepática (grau de esteatose; presença de inflamação, presença de balonização e valores NAS score) e ausência e presença de SM (Tabela 7).

Tabela 7. Níveis séricos de 25(OH)D, IL-10, IL-6 e TNF- α nos pacientes incluídos no estudo avaliados de acordo com as características histopatológicas do fígado que indicam gravidade da lesão hepática.

ESTEATOSE				
	Vitamina D (ng/mL)	IL-10 (pg/mL)	IL-6(pg/mL)	TNF-α (pg/mL)
Esteatose grau 1 (n=33)	27,79 $\pm$ 7,59	1,62 $\pm$ 1,68	1,72 $\pm$ 0,89	8,84 $\pm$ 4,66
Esteatose grau 2 e 3 (n=7)	25 $\pm$ 8,65	1,44 $\pm$ 0,56	1,63 $\pm$ 0,67	11,15 $\pm$ 7,47
INFLAMAÇÃO LOBULAR				
	Vitamina D (ng/mL)	IL-10 (pg/mL)	IL-6(pg/mL)	TNF-α (pg/mL)
Ausência de Inflamação (n=27)	25,87 $\pm$ 7,52	1,81 $\pm$ 1,84	1,77 $\pm$ 0,84	9,43 $\pm$ 5,35
Inflamação (n=13)	30,30 $\pm$ 7,61	1,14 $\pm$ 0,39	1,56 $\pm$ 0,89	8,85 $\pm$ 5,09
BALONIZAÇÃO CELULAR				
	Vitamina D* (ng/mL)	IL-10 (pg/mL)	IL-6(pg/mL)	TNF-α (pg/mL)
Ausência de Balonização (n=11)	23,9 $\pm$ 3,47	1,43 $\pm$ 1,29	2,02 $\pm$ 1,13	9,06 $\pm$ 5,38
Balonização (n=29)	28,5 $\pm$ 8,56	1,65 $\pm$ 1,64	1,58 $\pm$ 0,70	9,31 $\pm$ 5,24
NAS SCORE				
	Vitamina D (ng/mL)	IL-10 (pg/mL)	IL-6(pg/mL)	TNF-α (pg/mL)
Escore NAS<3 (n=25)	26,3 $\pm$ 7,4	1,51 $\pm$ 1,04	1,62 $\pm$ 0,74	10,26 $\pm$ 5,59
Escore NAS$\geq$5 (n=5)	33,2 $\pm$ 6,8	3,02 $\pm$ 3,5	1,76 $\pm$ 0,59	8,13 $\pm$ 3,68
SÍNDROME METABÓLICA				
	Vitamina D (ng/mL)	IL-10 (pg/mL)	IL-6(pg/mL)*	TNF-α (pg/mL)
Ausência SM (n=14)	28,5 $\pm$ 8,8	1,6 $\pm$ 1,15	2,1 $\pm$ 1,02	11,1 $\pm$ 3,5
Presença de SM (n=26)	26,6 $\pm$ 7,1	1,5 $\pm$ 1,7	1,4 $\pm$ 0,68	8,2 $\pm$ 5,7

Nota: Os valores são expressos em média $\pm$ desvio padrão. * diferentes estatisticamente ($p < 0,05$).

Não se observou associação entre os valores séricos de vitamina D e de interleucinas e os parâmetros histopatológicos a exceção da balonização e níveis séricos de vitamina D. Valores de vitamina D foram significativamente maiores em pacientes com balonização de hepatócitos comparados com aqueles sem balonização.(Gráfico 3).

Gráfico 3. Distribuição dos valores de vitamina D dos pacientes incluídos no estudo de acordo com a presença ou ausência de balonização hepatocelular.

Além disso, quando avaliados em relação à condição de SM, não tiveram diferença nos níveis séricos de vitamina D e interleucinas exceto a IL-6. Pacientes que não tiveram diagnóstico de SM apresentaram níveis séricos mais elevados de IL-6 do que pacientes com SM ($p=0,04$).

Os pacientes foram divididos de acordo com a classificação de níveis séricos de vitamina D segundo a Sociedade de Endocrinologia Norte-Americana em normal, insuficiente e deficiente; e foram analisados os parâmetros de gravidade nas três condições (**Figura 4**).

Figura 4. Parâmetros histopatológicos de gravidade da lesão hepática nas três condições de vitamina D (normal, deficiente, insuficiente) nos pacientes incluídos no estudo. As colunas representam a média do grau de esteatose (A), Inflamação (B), Balonização de hepatócitos (C) e Estágio de Fibrose (D). Os níveis de vitamina D foram considerados: Normal ($\geq 30\text{ng/mL}$); Insuficiência ($20\text{-}29,9\text{ng/mL}$) e Deficiência ($<20\text{ng/mL}$). Os valores p representam as comparações entre os três grupos, pelo teste de Kruskal Wallis.

Os pacientes foram divididos de acordo com a classificação de níveis séricos de vitamina D segundo o Instituto de Medicina (IOM) em normal e deficiente; e foram analisados os parâmetros de gravidade nas duas condições (**Figura 5**).

Figura 5. Parâmetros histopatológicos de gravidade da lesão hepática nas condições de vitamina D normal e deficiente segundo a IOM nos pacientes incluídos no estudo. As colunas representam a média do grau de esteatose (A), Inflamação (B), Balonização de hepatócitos (C) e Estágio de Fibrose (D). Os níveis de vitamina D foram classificados de acordo com os critérios da IOM, 2012: Normal ($\geq 20\text{ng/mL}$) e Deficiência ($< 20\text{ng/mL}$). Os valores p representam as comparações entre os dois grupos, pelo teste de Mann-Whitney.

Na tabela 8 encontra-se a frequência da ocorrência das características histopatológicas do fígado concomitantemente com as condições de vitamina D normal, insuficiente e deficiente.

Tabela 8. Frequência das características histopatológicas do fígado que indicam gravidade da lesão hepática nas condições de vitamina D normal Normal ($\geq 30\text{ng/mL}$); Insuficiência ($20\text{-}29,9\text{ng/mL}$) e Deficiência ($<20\text{ng/mL}$).

ESTEATOSE			
	Grau 1	Grau 2	Grau 3
Deficiência	10%	7,5%	0%
Insuficiência	47,5%	2,5%	2,5%
Normal	25%	2,5%	2,5%
INFLAMAÇÃO			
	Sem inflamação	Grau 1	Grau 2
Deficiência	16,67%	2,78%	0%
Insuficiência	42,67%	5,56%	0%
Normal	16,67%	11,1%	5,56%
BALONIZAÇÃO			
	Sem balonização	Grau 1	Grau 2
Deficiência	5,0%	10%	2,5%
Insuficiência	20,0%	22,5%	10%
Normal	2,5%	15%	12,5%
FIBROSE			
	Grau 1	Grau 2	Grau 3
Deficiência	15%	2,5%	0%
Insuficiência	52,5%	0%	0%
Normal	22,5%	0%	7,5%

As características histopatológicas que indicam gravidade da doença (esteatose, inflamação, balonização, fibrose e NAS score) foram comparados entre pacientes com e sem síndrome metabólica (SM). Os pacientes com SM apresentaram maior grau de balonização ($p=0,03$) e escore NAS mais elevados ($p=0,01$) (**Gráfico 4 e 5**).

Gráfico 4. Grau de balonização hepatocelular nos pacientes incluídos no estudo de acordo com a presença ou ausência de síndrome metabólica (SM).

Gráfico 5. Escore NAS nos pacientes incluídos no estudo de acordo com a presença ou ausência de síndrome metabólica (SM).

7 DISCUSSÃO

Diante da alta prevalência da doença hepática gordurosa não alcoólica em pacientes obesos e sua controvérsia em relação à deficiência de vitamina D, esse estudo teve como objetivo principal avaliar a relação entre níveis séricos de 25(OH)D em mulheres com diagnóstico de DHGNA através de biópsia hepática realizada durante cirurgia bariátrica as quais foram submetidas para tratamento da obesidade.

O diagnóstico da doença hepática foi feito através de biópsia do fígado, que é o padrão ouro e permite distinguir as formas mais graves da doença e por outro lado implicou em limitações; como o tamanho da amostra, devido ao tempo limitado de coleta, número de cirurgias realizadas nesse período e critérios de exclusão. Outra limitação foi a não avaliação da exposição solar e do padrão alimentar desses pacientes, em parte, por esses estarem submetidos a restrições calóricas no período pré-cirúrgico que antecedeu a coleta, o que poderia não retratar a alimentação de forma adequada e haveria alta possibilidade de sub-relatos.

A incidência de DHGNA em mulheres obesas nesse estudo foi de 88,8%. Os trabalhos de Bittencourt (2007); Feijó (2013); Reha (2014); Morita (2015); também encontraram alta prevalência da doença em pacientes obesos mórbidos submetidos à cirurgia bariátrica, 88,7%; 95%; 87,6% e 84%, respectivamente. Esse resultado reforça a obesidade como um fator de risco para a ocorrência da DHGNA, destacando a importância do rastreamento dessa condição nesse grupo de pacientes que implicaria em medidas que visam melhora do quadro.

A forma mais grave da doença, esteatohepatite, foi encontrada em 37,5% dos pacientes com DHGNA. Essa porcentagem é considerada baixa quando comparada a outros estudos semelhantes. Feijó (2013) encontrou 66,7% e Morita (2015), 62% dos pacientes obesos com critérios para diagnóstico de NASH. Ademais, Junior e Nonino (2012), em um trabalho realizado com 259 pacientes submetidos à biópsia hepática durante cirurgia bariátrica em Ribeirão Preto, encontraram prevalência de 89,1% de pacientes com critérios para NASH.

Uma possível explicação para a baixa prevalência da doença em um estágio mais avançado seria a imposição de uma meta de perda de peso (10%) antes da cirurgia, uma vez que os pacientes foram submetidos a dietas restritas (acompanhados por nutricionistas) e estimulados à prática de atividade física, o que pode ter resultado na melhora nos parâmetros metabólicos da doença hepática e também bioquímicos, como as enzimas hepáticas, cuja

média estava dentro dos valores normais de referência (SEVASTIANOVA, 2012; GRONBAEK, 2012; THOMA, 2012). Em uma revisão recente, Hanna e Harrison (2016) constataram que a redução de até 5% do peso corporal é associada com melhora da esteatose, 5 a 7% com a diminuição da inflamação hepática e que 7 a 10% com a resolução da DHGNA/NASH.

No estudo de Lee (2015), pacientes obesos com diagnóstico de DHGNA através dos níveis de enzimas hepáticas aumentados foram submetidos à dieta restritiva (hipocalórica) com orientação nutricional e a perda de peso foi associada à diminuição nos níveis de enzimas hepáticas ALT e AST, além da melhora na pressão sistólica e circunferência da cintura. Já Hanna e Harrison (2016) discutem que a restrição calórica e a perda de peso têm efeitos positivos sobre a resistência à insulina em pacientes obesos, o que poderia justificar a melhora no quadro da DHGNA visto que a RI é fator chave para o desenvolvimento da doença.

Em relação aos exames bioquímicos, o nível de TGP/ALT foi significativamente maior nos pacientes com DHGNA quando comparada ao grupo controle saudável. Por outro lado, os valores das enzimas hepáticas (ALT e AST) nos grupos esteatose pura e NASH não apresentaram diferenças significativas e não foram, portanto, relacionados com a forma mais grave da doença. No estudo de Junior e Nonino (2012), os níveis de ALT e AST foram preditores de formas mais graves de NASH. Essa diferença pode ter ocorrido pela baixa quantidade de pacientes com formas mais avançadas de NASH na amostra do presente estudo. Por outro lado, está de acordo com o estudo de Feijó (2013), em que ALT, glicemia de jejum e gama-GT não foram relacionadas com NASH após a realização de uma análise ajustada.

A dosagem de níveis séricos de enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT/TGP) e aspartato aminotransferase (AST/TGO) pode ser utilizada na avaliação do paciente com DHGNA, porém sua sensibilidade e especificidade são baixas para o diagnóstico (CHALASANI, 2012). Valores normais dessas enzimas não excluem a possibilidade de doença e a necessidade da realização da biópsia que é essencial para diferenciar esteatose pura de esteatohepatite (FRACANZANI, 2008; EASL–EASD–EASO, 2016).

Os níveis de fosfatase alcalina foram maiores no grupo NASH quando comparado ao grupo esteatose pura, porém, estava acima dos valores de referência em ambos os grupos. Esse resultado está em concordância com Kopec e Burns (2011); Cazzo (2014) e Leghi (2015) que relataram níveis de fosfatase alcalina aumentados na DHGNA.

Quanto à avaliação do estado nutricional, apesar das médias dos parâmetros antropométricos no grupo NASH serem maiores que as do grupo esteatose pura, não houve diferenças significativas entre os grupos em relação ao peso, circunferências abdominal, cintura e quadril e percentual de gordura corporal e IMC. Achados semelhantes foram encontrados no estudo de Feijó (2013), em que não foi encontrada associação entre IMC, RCQ e CC mais elevados e a esteatohepatite; e Morita (2015) que não encontrou relação entre o IMC e a gravidade de doença hepática. Entretanto, Morita (2015) observou maiores valores de CC na esteatohepatite e Salgado Junior e Nonino (2012) observaram peso e o IMC mais elevados nas formas mais avançadas da DHGNA.

Quando avaliados em relação à vitamina D, os parâmetros antropométricos não apresentaram correlação, exceto pelo IMC, que teve correlação negativa com os valores séricos de vitamina D, ou seja, quanto maior o IMC, menores os níveis de 25(OH)D. Kuçukazman (2014); Oliai (2015) e Anty (2016) também encontraram resultados semelhantes. Dasarathy (2015) encontrou, além do IMC, correlação negativa também com o peso e massa gordurosa abdominal em pacientes com DHGNA, o que não foi encontrado em nosso trabalho. Esses resultados sugerem que indivíduos com IMC mais elevados estão em maior risco de apresentarem deficiência de vitamina D. Uma provável explicação para a associação entre níveis séricos baixos de vitamina D e a obesidade (IMC elevado) é a diminuição da biodisponibilidade da vitamina D3 devido à sua deposição em estoques de gordura corporal (WORTSMAN, 2000; TARGHER, 2007). Além disso, Targher (2007) sugere que pode haver modificação no metabolismo da vitamina D devido à esteatose hepática, já que a vitamina D3 é convertida em 25(OH)D no fígado.

Os níveis de 25(OH)D séricos foram avaliados nos 40 participantes, 17,5% apresentaram deficiência (valores <20pg/mL), 52,5% apresentaram valores entre 20-30 (insuficiência) e 30% valores >30, considerado desejável. Em um estudo com 239 pacientes obesos diagnosticados com DHGNA através de biópsia hepática, Bril (2015) obteve 47,3% de deficiência, 30,9% de insuficiência e 21,7% valores normais. A alta prevalência de insuficiência de vitamina D encontrada nessa população pode ser explicada pelo fato da obesidade ser um fator de risco para a deficiência da vitamina D (SCHMIDT, 2015).

O nível de vitamina D entre os pacientes do estudo (com diagnóstico de DHGNA) e indivíduos do grupo controle não foram diferentes. Assim como não teve diferença entre o grupo esteatose e esteatohepatite. Esse achado está de acordo com os estudos de Katz (2010);

Li (2013); Catena (2013); Diez Rodriguez (2014); Bril (2015) e Sezer (2016) que também não encontraram relações entre níveis séricos de vitamina D e a DHGNA.

Em relação às características histopatológicas que indicam gravidade da lesão hepática (esteatose, inflamação lobular, balonização celular e escore NAS), os níveis séricos de vitamina D foram significativamente maiores nos pacientes que apresentaram balonização celular. Apesar de não ser significativo estatisticamente, médias de 25(OH)D foram maiores nos pacientes com inflamação e com o escore NAS mais elevados. Além disso, quando os pacientes foram divididos de acordo com a vitamina D, houve uma tendência de pacientes com valores normais da vitamina ($\geq 30\text{ng/dL}$) apresentar maior grau de fibrose ($p=0,06$). Nossos achados mostram possível relação entre valores mais altos de vitamina D e parâmetros de gravidade da doença hepática. Devemos ressaltar que o pequeno número de pacientes no estudo não permite conclusão definitiva desse achado. Estudos com maiores números de pacientes são necessários.

Anty (2016) avaliou lesões hepáticas de obesos através de biopsia; a balonização e inflamação não tiveram correlação com a vitamina D. Por outro lado, níveis de vitamina D foram menores em pacientes com fibrose mais avançada comparada ao grupo sem fibrose; essa observação não foi mantida quando aplicado a análise de regressão logística, em que a vitamina D não foi associada independentemente à gravidade da fibrose. No presente estudo não foi possível avaliar os níveis séricos de vitamina D e a presença de fibrose avançada, visto que a população estudada apresentou predominantemente fibrose de grau 1.

Bril (2015) não encontrou associação entre os parâmetros de gravidade da lesão hepática e os níveis de vitamina D em pacientes com NASH, concluindo que a deficiência da vitamina D não tem um papel importante no desenvolvimento da NASH, como também que a esteatohepatite não afeta a hidroxilação hepática da vitamina D, pelo menos em pacientes sem cirrose (BRIL, 2015).

Achados diferentes foram relatados por Barchetta (2012); Jablowski (2013); Bhatt (2013); Kuçukazman (2014) e Chung (2016) que associaram a deficiência de vitamina D com a DHGNA. A limitação desses trabalhos foi a utilização da ultrassonografia no diagnóstico da dos diferentes graus da lesão hepática, que pode implicar em erros significativos (BRIL, 2015).

Targher (2007) observou valores menores de vitamina D sérica em pacientes com DHGNA diagnosticados por biópsia hepática quando comparados a controles saudáveis com o mesmo peso e idade; ainda correlacionou a vitamina D negativamente com a progressão da doença hepática. Apesar disso, não se pode afirmar que o agravamento da doença hepática se deveu à deficiência da vitamina, visto que os pacientes com graus mais avançados de NASH e de fibrose apresentavam maior prevalência de síndrome metabólica, o que poderia influenciar na piora da doença hepática (BRIL, 2015). Além disso, o período da coleta foi realizado durante o inverno, o que pode ter influenciado nos níveis de vitamina D dessa população.

Dasarathy (2014) quantificou vitamina D plasmática em 148 pacientes com DHGNA confirmadas através de biópsia e concluiu que baixos níveis de vitamina D associados ao aumento do peso corporal foram relacionados à gravidade da doença hepática. Em relação à histopatologia, somente a balonização celular foi relacionada à vitamina D baixa.

Apesar de encontrarem associação da deficiência da vitamina D com a DHGNA e sua gravidade, esses tipos de estudos não podem estabelecer relação causal ou o direcionamento dessa associação. Para isso, são necessários testes de intervenções randomizados (FAGOONEE E PELLICANO, 2014).

Recentemente um estudo randomizado, duplo-cego, controlado por placebo avaliou o tratamento oral com colecalciferol (2000 UI / dia) ou placebo em 65 pacientes com diabetes melitos e DHGNA, e concluiu que a suplementação de vitamina D de alta dose oral ao longo de 24 semanas não melhorou a esteatose hepática ou parâmetros metabólicos e cardiovasculares (BARCHETTA, 2016).

Outro exemplo de teste clínico randomizado foi o de Shafiri (2014), que investigou os efeitos da suplementação de vitamina D nas aminotransferases séricas, resistência à insulina, estresse oxidativo e marcadores inflamatórios em pacientes com DHGNA. Os pacientes receberam 50,000 UI de vitamina D3 ou placebo a cada 14 dias durante 4 meses. Nos pacientes que receberam o suplemento houve diminuição de malondialdeído sérico, que é um marcador de estresse oxidativo. Porém, outras variáveis, como as aminotransferases, TNF- α , e grau de esteatose hepática não mostraram diferenças significativas.

Como um fator chave no desenvolvimento da DHGNA, a resistência à insulina mostrou melhora no teste clínico placebo-controle de Nagpal (2009) que suplementou uma dose de 120,000UI de vitamina D3 quinzenalmente, sendo 3 dias de suplementação em

homens obesos com resistência à insulina e observou melhora na resistência à insulina pós prandial.

Nakano (2011) avaliou os efeitos da fototerapia na progressão de NASH em ratos. A fototerapia mostrou aumento nos níveis de vitamina D3 circulantes e consequente diminuição da apoptose de hepatócitos, inflamação, fibrose, e a resistência à insulina/leptina em ratos com NASH induzido por dieta. No entanto, a fototerapia não conseguiu melhorar a obesidade e esteatose, sugerindo que a fototerapia pode possuir atividade anti-inflamatória/fibrótica, mas não anti-obesidade/esteatose.

A síndrome metabólica é composta por um conjunto de fatores de risco cardiovasculares, entre eles, a obesidade e a circunferência abdominal aumentada (IDF, 2006), que foram características da população total do presente estudo, e que, segundo Cotrim (2016), tem sido a causa do aumento da frequência de DHGNA no Brasil. Portanto para tentar estabelecer associação entre a SM e a gravidade da DHGNA, dados referentes à síndrome e parâmetros histopatológicos foram comparados entre o grupo esteatose e esteatohepatite.

Os parâmetros que compõem os critérios utilizados para diagnóstico da SM (glicemia de jejum, triglicerídeos, circunferência da cintura e HAS) não tiveram diferença significativa entre os grupos. Diferente disso, Yang (2016) encontrou associação linear entre maiores valores de componentes da SM e a gravidade de DHGNA. Esse achado pode não ter sido confirmado no presente estudo porque poucos pacientes apresentaram formas mais avançadas da doença. Além disso, outra diferença é que no atual estudo a população foi composta por obesos mórbidos, com alta prevalência de SM em ambos os grupos.

Por outro lado, pacientes com síndrome metabólica apresentaram maior grau de balonização e escore NAS mais elevados, sugerindo que há relação da SM e a gravidade da lesão hepática. A síndrome metabólica e a DHGNA possuem forte associação, visto que a resistência à insulina tem um papel fundamental no desenvolvimento e pode ser o mecanismo potencial de ligação das duas condições (KANWAR E KOWDLEY, 2016).

As citocinas relacionadas ao processo inflamatório desempenham papel importante na fisiopatologia da DHGNA. O fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e a interleucina-6 são consideradas pró-inflamatórias e são associadas com a resistência à insulina, manutenção do estado inflamatório e evolução da doença hepática (TARANTINO, 2010; SEARS E PERRY, 2015; JAMALI, 2016). Em contrapartida, a interleucina-10 é correlacionada positivamente

com a melhora da sensibilidade à insulina, sugerindo que sua ação anti-inflamatória poderia ser um fator protetor contra a RI (STRACZKOWSKI, 2005).

Paredes-Turrubiarte e colaboradores (2015) examinaram os níveis séricos de TNF-alfa e IL-10 em 102 obesos com diferentes graus de DHGNA detectada através de ultrassom abdominal. Comparando com obesos sem esteatose, encontrou aumento do TNF-alfa e diminuição de IL-10 em obesos com DHGNA. Ressalta-se a limitação da utilização de métodos de imagem para se avaliar o grau da lesão hepática.

No presente estudo, foram feitas as dosagens séricas das citocinas IL-10, IL-6 e TNF- α . Os níveis dessas citocinas não foram diferentes entre os grupos esteatose e esteatohepatite e não foram associadas aos parâmetros de gravidade da lesão hepática. Por outro lado, não foi possível a comparação com um grupo controle de obesos sem DHGNA. Devido à alta prevalência de esteatose nessa população, existe grande dificuldade de atingir um número significativo de obesos sem a doença para realização desse tipo de comparação.

Jamali (2016) associou valores séricos de TNF-alfa com esteatose moderada (>33%) e a IL-6 com inflamação lobular avançada em 54 pacientes com DHGNA confirmada através de biópsia hepática. Porém, diferente do presente estudo, a população não foi composta por pacientes obesos, o que poderia explicar a diferença entre os achados. Além disso, em um recente trabalho com um número bastante expressivo de pacientes, Salgado Junior e Nonino (2015), não encontraram relações entre os níveis séricos dessas citocinas com a gravidade da doença em 259 pacientes obesos com diagnóstico de DHGNA por biópsia hepática.

Jorge (2016) avaliou a expressão de TNF-alfa e a IL-6 no tecido adiposo branco em 21 pacientes obesos graus III com DHGNA e associaram níveis elevados dessas citocinas com a gravidade da doença (NASH). Porém, essa amostra foi considerada pequena, sendo que outros trabalhos com a mesma metodologia seriam importantes para confirmar esses achados.

A interleucina-6 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) são citocinas pró-inflamatórias liberadas pelo tecido adiposo e hepatócitos (JAMALI,2016). Por isso, nos pacientes com NASH, os níveis de RNA mensageiro para esta citocinas estão aumentadas nos tecidos hepáticos e adiposo, sugerindo que a quantificação dessas citocinas nesses tecidos seria um método mais adequado para análise do perfil inflamatório do paciente com DHGNA(MIELE, 2006). Miele (2006) ainda ressalta que níveis circulantes de receptores solúveis de TNF podem ser um melhor marcador do que níveis séricos de TNF porque eles permanecem elevados por mais tempo.

Em resumo, níveis séricos de vitamina D não foram associados com presença ou maior gravidade da DHGNA em pacientes obesas do sexo feminino submetidas à cirurgia bariátrica. Balonização dos hepatócitos foi o único parâmetro associado com níveis séricos mais altos de vitamina D. Ressalta-se que o pequeno número de pacientes estudados não permite uma conclusão definitiva desse achado e outros estudos são necessários para melhor avaliação. Ademais, níveis séricos das citocinas pro-inflamatórias IL-6 e TNF- α não foram associados com a gravidade da DHGNA e a citocina anti-inflamatória IL-10 não foi associada à forma mais leve da doença, sugerindo-se que a dosagem sérica não é o mais adequado para avaliar a associação das citocinas e a gravidade da doença na população do estudo.

8 CONCLUSÃO

- Pacientes obesos com DHGNA tiveram alta prevalência de insuficiência de vitamina D (70%), porém os valores não foram diferentes quando comparados ao grupo controle saudável e não houve diferença nos níveis séricos de vitamina D comparando-se esteatose e esteatohepatite.

- Os níveis séricos de vitamina D e citocinas séricas não apresentaram relações com os parâmetros histopatológicos de gravidade de lesão hepática, exceto a presença de balonização que foi associada a valores maiores de vitamina D.

- Os níveis séricos de vitamina D correlacionaram-se negativamente com o IMC.

- Os níveis séricos de citocinas pro-inflamatórias (IL6 e TNF-alfa) e anti-inflamatorias (IL-10) não foram associadas com a gravidade da DHGNA.

- O escore NAS e o grau de balonização dos hepatócitos foram maiores em pacientes que apresentaram SM, sugerindo-se que a mesma possa estar associada com a gravidade da doença hepática.

REFERÊNCIAS

ABESO, Associação Brasileira para o estudo da obesidade e síndrome metabólica. **Diretrizes brasileiras de obesidade** 2010.

ALEMZADEH, R. et al. Hypovitaminosis D in obese children and adolescents: relationship with adiposity, insulin sensitivity, ethnicity, and season. **Metabolism**, v. 57, n. 2, p. 183-91, 2008.

ANTY, R. et al. Severe Vitamin D Deficiency Is Not Associated with Liver Damage in Morbidly Obese Patients. **Obesity Surgery**, 2016.

BARCHETTA, I. et al. Liver vitamin D receptor, CYP2R1, and CYP27A1 expression: relationship with liver histology and vitamin D3 levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis or hepatitis C virus. **Hepatology**, v. 56, n. 6, p. 2180-7, 2012.

BARCHETTA, I. et al. No effects of oral vitamin D supplementation on non-alcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **BMC Medicine**, v. 14, n. 1, p. 92, 2016.

BASTOS, Clara Maia. **Estudo da doença óssea metabólica em pacientes com doença inflamatória intestinal**. Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Ribeirão Preto, 2014.

BHATT, S. P. et al. Independent associations of low 25 hydroxy vitamin D and high parathyroid hormonal levels with nonalcoholic fatty liver disease in Asian Indians residing in north India. **Atherosclerosis**, v. 230, n. 1, p. 157-63, 2013.

BITENCOURT, A. G. et al. [Nonalcoholic fatty liver disease: clinical and histological characteristics in obese who underwent bariatric surgery]. **Acta Gastroenterológica Latinoamericana**, v. 37, n. 4, p. 224-30, 2007.

BRIL, F. et al. Relationship of vitamin D with insulin resistance and disease severity in non-alcoholic steatohepatitis. **Journal of Hepatology**, v. 62, n. 2, p. 405-11, 2015.

BROWNING, J. D.; HORTON, J. D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 2, p. 147-52, 2004.

BRUNT, E. M. et al. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. **American Journal of Gastroenterology**, v. 94, n. 9, p. 2467-74, 1999.

BRUNT, E. M.; TINIAKOS, D. G. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 42, p. 5286-96, 2010.

BUECHLER, C.; WANNINGER, J.; NEUMEIER, M. Adiponectin, a key adipokine in obesity related liver diseases. **World Journal of Gastroenterology**, v. 17, n. 23, p. 2801-11, 2011.

CATENA, C. et al. Non-alcoholic fatty liver disease is not associated with vitamin D deficiency in essential hypertension. **High Blood Pressure Cardiovascular Prevention**, v. 20, n. 1, p. 33-7, 2013.

CAZZO, E. et al. Nonalcoholic fatty liver disease in morbidly obese subjects: correlation among histopathologic findings, biochemical features, and ultrasound evaluation. **Obesity Surgery**, v. 24, n. 4, p. 666-8, 2014.

CHALASANI, N. 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**, v. 142, n. 7, p. 1592-609, 2012.

CHUNG, G. E. et al. The serum vitamin D level is inversely correlated with nonalcoholic fatty liver disease. **Clinical and Molecular Hepatology**, v. 22, n. 1, p. 146-51, 2016.

CORREIA, A. et al. Ethnic aspects of vitamin D deficiency. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 58, n. 5, p. 540-4, 2014.

COTRIM, H. P. et al. NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE BRAZILIAN SOCIETY OF HEPATOLOGY CONSENSUS. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 53, n. 2, p. 118-22, Apr-Jun 2016.

DASARATHY, J. et al. Hypovitaminosis D is associated with increased whole body fat mass and greater severity of non-alcoholic fatty liver disease. **Liver International**, v. 34, n. 6, p. 118-27, Jul 2014.

DIEZ RODRIGUEZ, R. et al. Vitamin D levels and bone turnover markers are not related to non-alcoholic fatty liver disease in severely obese patients. **Nutricion Hospitalaria**, v. 30, n. 6, p. 1256-62, 2014.

DING, N. et al. A vitamin D receptor/SMAD genomic circuit gates hepatic fibrotic response. **Cell**, v. 153, n. 3, p. 601-13, 2013.

DONGIOVANNI, P. et al. Nutritional therapy for nonalcoholic fatty liver disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 29, p. 1-11, Mar 2016.

EASL clinical practical guidelines: management of alcoholic liver disease. **Journal of Hepatology**, v. 57, n. 2, p. 399-420, 2012.

EASL–EASD–EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. **Diabetologia**, v. 59, n. 6, p. 1121-1140, 2016.

ELIADES, M.; SPYROU, E. Vitamin D: a new player in non-alcoholic fatty liver disease? **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 6, p. 1718-27, Feb 14 2015.

ELIADES, M. et al. Meta-analysis: vitamin D and non-alcoholic fatty liver disease. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 38, n. 3, p. 246-54, Aug 2013.

FAGOONEE, S.; PELLICANO, R. Vitamin D and NAFLD: the need for interventional trials. In: (Ed.). **Minerva Medica**. Italy, v.105, 2014.

FATTAHI, M. R. et al. The Prevalence of Metabolic Syndrome In Non-alcoholic Fatty Liver Disease; A Population-Based Study. **Middle East Journal of Digestive Disease**, v. 8, n. 2, p. 131-7, Apr 2016.

FEIJO, S. G. et al. The spectrum of non alcoholic fatty liver disease in morbidly obese patients: prevalence and associate risk factors. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 28, n. 11, p. 788-93, Nov 2013.

FRACANZANI, A. L. et al. Risk of severe liver disease in nonalcoholic fatty liver disease with normal aminotransferase levels: a role for insulin resistance and diabetes. **Hepatology**, v. 48, n. 3, p. 792-8, Sep 2008.

GRONBAEK, H. et al. Effect of a 10-week weight loss camp on fatty liver disease and insulin sensitivity in obese Danish children. **Journal of Pediatric Gastroenterology Nutrition**, v. 54, n. 2, p. 223-8, Feb 2012.

HAN, Y. P. et al. Vitamin D in liver diseases: from mechanisms to clinical trials. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 28 Suppl 1, p. 49-55, Aug 2013.

HANNAH, W. N., JR.; HARRISON, S. A. Effect of Weight Loss, Diet, Exercise, and Bariatric Surgery on Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Clinical Liver Disease**, v. 20, n. 2, p. 339-50, May 2016.

HOLICK, M. F. Vitamin D: a D-Lightful health perspective. **Nutrition Reviews**, v. 66, n. 10 Suppl 2, p. S182-94, Oct 2008.

IDF, International Diabetes Federation. **The IDF consensus worldwide de definition of the metabolic syndrome**, 2006.

JABLONSKI, K. L. et al. Low 25-hydroxyvitamin D level is independently associated with non-alcoholic fatty liver disease. **Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 23, n. 8, p. 792-8, Aug 2013.

JAMALI, R. et al. Serum adipokines might predict liver histology findings in non-alcoholic fatty liver disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 21, p. 5096-103, Jun 7 2016.

JORGE, A. S. et al. Body mass index and the visceral adipose tissue expression of IL-6 and TNF-alpha are associated with the morphological severity of non-alcoholic fatty liver disease in individuals with class III obesity. **Obesity Research & Clinical Practice**, Apr 12 2016.

KALIA, H. S.; GAGLIO, P. J. The Prevalence and Pathobiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Patients of Different Races or Ethnicities. **Clinical Liver Disease**, v. 20, n. 2, p. 215-24, May 2016.

KANWAR, P.; KOWDLEY, K. V. The Metabolic Syndrome and Its Influence on Nonalcoholic Steatohepatitis. **Clinical Liver Disease**, v. 20, n. 2, p. 225-43, 2016.

KARNIKOWSKI, M. et al. Non-alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome in Brazilian middle-aged and older adults. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 125, n. 6, p. 333-7, Nov 1 2007.

KATZ, K. et al. Suspected nonalcoholic Fatty liver disease is not associated with vitamin d status in adolescents after adjustment for obesity. **Journal of Obesity**, 2010.

KLEINER, D. E. et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 41, n. 6, p. 1313-21, 2005.

KOPEC, K. L.; BURNS, D. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Review of the Spectrum of Disease, Diagnosis, and Therapy. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 26, n. 5, p. 565-576, 2011.

KÜÇÜKAZMAN, M. et al. The association of vitamin D deficiency with non-alcoholic fatty liver disease. In: (Ed.). **Clinics** (Sao Paulo), v.69, p.542-6., 2014.

LASSAILLY, G. et al. Bariatric Surgery Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis in Morbidly Obese Patients. **Gastroenterology**, v. 149, n. 2, p. 379-88; quiz e15-6, Aug 2015.

LEE, S. M. et al. Vitamin D deficiency in non-alcoholic fatty liver disease: The chicken or the egg? **Clinical Nutrition**, Nov 11 2015.

LEGHI, G. E.; DOMENICI, F. A.; VANNUCCHI, H. INFLUENCE OF OXIDATIVE STRESS AND OBESITY IN PATIENTS WITH NONALCOHOLIC STEATOHEPATITIS. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 52, n. 3, p. 228-33, Jul-Sep 2015.

LI, L. et al. No significant association between vitamin D and nonalcoholic fatty liver disease in a Chinese population. **Digestive Disease and Science**, v. 58, n. 8, p. 2376-82, Aug 2013.

LICHTENSTEIN, A. et al. Vitamin D: non-skeletal actions and rational use. **Revista de Associação Médica Brasileira**, v. 59, n. 5, p. 495-506, Sep-Oct 2013.

LOHMAN, T. G.; ROCHE, A. F.; MARTORELL, R. **Anthropometric Standarization Reference Manual**. Illinois: 1988.

MAEDA, S. S. et al. Recomendações da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM) para o diagnóstico e tratamento da hipovitaminose D. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 58, p. 411-433, 2014.

MANDAYAM, S.; JAMAL, M. M.; MORGAN, T. R. Epidemiology of alcoholic liver disease. **Semin Liver Disease**, v. 24, n. 3, p. 217-32, Aug 2004.

MIELE, L. et al. Noninvasive assessment of fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and non-alcoholic steatohepatitis (NASH). **Translational Research**, v. 149, n. 3, p. 114-125, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL. **Regulamento técnico, normas e critérios para a Assistência de Alta Complexidade ao Indivíduo com Obesidade**. PORTARIA Nº 425, 2013.

MORITA, S. et al. Prevalence of Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Steatohepatitis Risk Factors in Patients Undergoing Bariatric Surgery. **Obesity Surgery**, v. 25, n. 12, p. 2335-43, Dec 2015.

NAGPAL, J.; PANDE, J. N.; BHARTIA, A. A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of the short-term effect of vitamin D3 supplementation on insulin sensitivity in apparently healthy, middle-aged, centrally obese men. **Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association** v. 26, n. 1, p. 19-27, 2009.

NAKANO, T. et al. Impact of artificial sunlight therapy on the progress of non-alcoholic fatty liver disease in rats. **Journal of Hepatology**, v. 55, n. 2, p. 415-25, Aug 2011.

NOUREDDIN, M.; MATO, J. M.; LU, S. C. Nonalcoholic fatty liver disease: update on pathogenesis, diagnosis, treatment and the role of S-adenosylmethionine. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 240, n. 6, p. 809-20, Jun 2015.

OLIAI ARAGHI, S. et al. BMI and Body Fat Mass Is Inversely Associated with Vitamin D Levels in Older Individuals. **The journal of nutrition, health & aging**, v. 19, n. 10, p. 980-5, Dec 2015.

OMS, Organização Mundial de Saúde. **Obesity: Preventing and managing the global epidemic**. Geneva, Swetzerland, 2000.

OMS. Organização Mundial de Saúde. **World Health Statistics, 2015**.

PAREDES-TURRUBIARTE, G. et al. Severity of non-alcoholic fatty liver disease is associated with high systemic levels of tumor necrosis factor alpha and low serum interleukin 10 in morbidly obese patients. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 16, n. 2, p. 193-202, 2016.

PATEL, V.; SANYAL, A. J.; STERLING, R. Clinical Presentation and Patient Evaluation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Clinics in Liver Disease**, v. 20, n. 2, p. 277-92, May 2016.

PLUDOWSKI, P. et al. Practical guidelines for the supplementation of vitamin D and the treatment of deficits in Central Europe - recommended vitamin D intakes in the general population and groups at risk of vitamin D deficiency. In: (Ed.). **Endokrynol Polska**. Poland, v.64, 2013.

POTTER, J. J. et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 and its nuclear receptor repress human alpha1 (I) collagen expression and type I collagen formation. **Liver International**, v. 33, n. 5, p. 677-86, May 2013.

REHA, J. L.; LEE, S.; HOFMANN, L. J. Prevalence and predictors of nonalcoholic steatohepatitis in obese patients undergoing bariatric surgery: a Department of Defense experience. **The American Surgeon**, v. 80, n. 6, p. 595-9, Jun 2014.

REIS FILHO AD, R. F., OLIVEIRA MPP, FETT CA, ZAVALA AA,; CF, C.-R. Comparação entre diferentes aparelhos de bioimpedância para avaliação do percentual de gordura. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, 2011.

ROSEN, C. J. et al. IOM committee members respond to Endocrine Society vitamin D guideline. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 97, n. 4, p. 1146-52, 2012.

SALGADO JUNIOR, W.; NONINO-BORGES, C. B. Clinical predictors of different grades of nonalcoholic fatty liver disease. **Obesity Surgery**, v. 22, n. 2, p. 248-52, Feb 2012.

SAYINER, M. et al. Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis in the United States and the Rest of the World. **Clinics in Liver Disease**, v. 20, n. 2, p. 205-14, 2016.

SCHMIDT, A. Relação entre a deficiência de vitamina D e obesidade: Uma revisão atual. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, v.9, n 53, p.207-212, 2015

SEARS, B.; PERRY, M. The role of fatty acids in insulin resistance. In: (Ed.). **Lipids in health and disease**. London, v.14, 2015.

SENN, J. J. et al. Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. **Diabetes**, v. 51, n. 12, p. 3391-9, 2002.

SEO, J. A. et al. Low vitamin D status is associated with nonalcoholic Fatty liver disease independent of visceral obesity in Korean adults. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e75197, 2013.

SEVASTIANOVA, K. et al. Effect of short-term carbohydrate overfeeding and long-term weight loss on liver fat in overweight humans. **The American journal of clinical nutrition**, v. 96, n. 4, p. 727-34, Oct 2012.

SEZER, O. B. et al. Low 25-hydroxyvitamin D level is not an independent risk factor for hepatosteatosis in obese children. **Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM**, v. 29, n. 7, p. 783-8, Jul 1 2016.

SHARIFI, N. et al. Does vitamin D improve liver enzymes, oxidative stress, and inflammatory biomarkers in adults with non-alcoholic fatty liver disease? A randomized clinical trial. **Endocrine**, v. 47, n. 1, p. 70-80, Sep 2014.

SHUAI, X. et al. Bariatric surgery for metabolic syndrome in obesity. **Metabolic syndrome and related disorders** v. 13, n. 4, p. 149-60, May 2015.

STRACZKOWSKI, M. et al. Plasma interleukin-10 concentration is positively related to insulin sensitivity in young healthy individuals. **Diabetes Care**, v. 28, n. 8, p. 2036-7, Aug 2005.

MAHAN e SCOTT-STUMP .**KRAUSE: Alimentos, nutrição e dietoterapia.** 12 edição. São Paulo: Elsevier, 2010.

TARANTINO, G.; SAVASTANO, S.; COLAO, A. Hepatic steatosis, low-grade chronic inflammation and hormone/growth factor/adipokine imbalance. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 38, p. 4773-83, Oct 14 2010.

TARGHER, G. et al. Associations between serum 25-hydroxyvitamin D3 concentrations and liver histology in patients with non-alcoholic fatty liver disease. **Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD**, v. 17, n. 7, p. 517-24, Sep 2007.

THOMA, C.; DAY, C. P.; TRENELL, M. I. Lifestyle interventions for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease in adults: a systematic review. **Journal of Hepatology**, v. 56, n. 1, p. 255-66, Jan 2012.

VERNON, G.; BARANOVA, A.; YOUNOSSI, Z. M. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 34, n. 3, p. 274-85, Aug 2011.

VERSTUYF, A. et al. Vitamin D: a pleiotropic hormone. **Kidney International**, v. 78, n. 2, p. 140-5, Jul 2010.

WIERZBICKA, J.; PIOTROWSKA, A.; ZMIJEWSKI, M. A. The renaissance of vitamin D. **Acta biochimica Polonica**, v. 61, n. 4, p. 679-86, 2014.

WORTSMAN, J. et al. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, n. 3, p. 690-693, 2000.

YANG, K. C. et al. Association of Non-alcoholic Fatty Liver Disease with Metabolic Syndrome Independently of Central Obesity and Insulin Resistance. **Scientific reports**, v. 6, p. 27034, 2016.

ZAHRAN, W. E. et al. Efficacy of Tumor Necrosis Factor and Interleukin-10 Analysis in the Follow-up of Nonalcoholic Fatty Liver Disease Progression. In: (Ed.). **Indian journal of clinical biochemistry : IJCB India**, v.28, p.141-6, 2013.

ZELBER-SAGI, S.; RATZIU, V.; OREN, R. Nutrition and physical activity in NAFLD: an overview of the epidemiological evidence. **World Journal of Gastroenterology**, v. 17, n. 29, p. 3377-89, Aug 7 2011.

ZIVKOVIC, A. M.; GERMAN, J. B.; SANYAL, A. J. Comparative review of diets for the metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease. **The American journal of clinical nutrition**, v. 86, n. 2, p. 285-300, Aug 2007.

APÊNDICES

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO- HCFMRPUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome da pesquisa: “Avaliação da vitamina D na doença hepática gordurosa não alcoólica”

O Sr (a) está sendo convidado (a) para participar de um estudo cujo objetivo é avaliar a medida de vitamina D, no sangue de indivíduos com doença gordurosa não alcoólica do fígado. Essa doença caracteriza-se por depósito de gordura no fígado, podendo ocorrer ou não inflamação e fibrose (cicatrizes).

Em nosso estudo, iremos verificar se pacientes portadores de doença gordurosa não alcoólica do fígado apresentam deficiência de vitamina D e, se essa deficiência tem associação com o estado nutricional, com a extensão (grau) da doença no fígado e com as defesas do organismo do paciente, que será avaliada por meio de dosagens de proteínas no sangue (citocinas), as quais são liberadas quando ocorre inflamação.

Por que é importante estudar os níveis de vitamina D e doença gordurosa não alcoólica do fígado?

Nos dias atuais, a doença gordurosa não alcoólica do fígado é a maior causa de doença crônica do fígado no Brasil e no mundo. Estudar possíveis mecanismos envolvidos nessa doença poderá ajudar no melhor entendimento da mesma e, assim, colaborar no desenvolvimento de tratamentos mais eficientes.

O que é preciso fazer para participar do estudo?

Sr.(a) precisará:

- Responder um questionário com seus dados pessoais (idade, sexo, escolaridade, tabagismo, uso de bebida alcoólica, atividade física, doenças concomitantes, uso de medicamentos) e um questionário alimentar (tipo de alimentos que ingere diariamente e quantidade).
- Autorizar a análise das medidas como peso corporal, altura e medida da circunferência da cintura e abdominal, bem como análise da composição de gordura e músculos do corpo

(exame chamado Bioimpedância) todos já realizados durante seu acompanhamento neste hospital.

- Autorizar a consulta ao prontuário médico para coleta de dados clínicos (outras doenças e uso de medicamentos), resultados de exames de sangue (enzimas do fígado, albumina, bilirrubinas, glicemia, insulina, lipidograma, ferritina e hemograma) já coletados durante seu seguimento no hospital.
- Autorizar a análise dos resultados da biópsia do fígado já realizada durante seu acompanhamento neste hospital. Portanto, **não será necessária nova biópsia para participar do estudo.**
- Autorizar a coleta de uma amostra de sangue. Essa amostra de sangue será colhida de uma veia do braço, com retirada de 30 ml (cerca de 2 colheres de sopa), com o mesmo tipo de agulha que é utilizada na coleta de rotina do Hospital. Esse sangue será utilizado para avaliar as medidas de vitamina D e de substâncias relacionadas a defesas do organismo (citocinas).

Se o senhor (a) concordar armazenaremos amostras de soro, plasma e material genético a partir do sangue já colhido e um pequeno fragmento de fígado (cerca de 5 mm da biópsia de fígado já realizada) que constituirão o biorrepositório desse estudo. Para a autorização do armazenamento dessas amostras será apresentado ao Sr (a) um termo de consentimento de guarda de material, o qual deve ser assinado em duas vias. O Sr (a) ficará com uma via e a outra será arquivada nesse centro de pesquisa.

Direito a confidencialidade

As informações obtidas nesse estudo serão tratadas de forma anônima e somente os investigadores terão acesso a esses dados, que serão mantidos de forma estritamente confidencial, garantindo a confidencialidade, sigilo e privacidade do paciente.

E quem não quiser participar?

Sua participação não é obrigatória. O Sr.(a) é livre para decidir se deseja ou não participar da pesquisa, podendo retirar seu consentimento a qualquer momento. A recusa em participar do estudo não prejudicará, em nada, o acompanhamento ou o tratamento que o Sr.(a) já recebe nesse Hospital.

Riscos

O risco de participação é mínimo. A coleta de sangue pode resultar em dor no local da punção ou manchas roxas. Entretanto, a coleta será realizada por profissional treinado em tal procedimento.

As informações obtidas nesse estudo serão tratadas de forma anônima e somente os investigadores terão acesso a esses dados, que serão mantidos de forma estritamente confidencial,

garantindo a confidencialidade, sigilo e privacidade do paciente. A possibilidade de quebra de sigilo é mínima.

Benefícios

Não há benefício direto ao participante. Sua participação será importante para que possamos pesquisar possíveis mecanismos envolvidos na doença (verificar se há relação da mesma com a vitamina D).

Acesso aos resultados

É garantido o direito de acesso aos resultados pelo Sr (a) em todas as etapas do projeto.

Despesas e compensações

Não há despesas pessoais em qualquer fase do estudo incluindo exames e consultas. Os procedimentos referentes ao estudo serão realizados durante consultas médicas previamente agendadas nesse Hospital. Também não haverá compensação financeira relacionada a sua participação.

Forma de acompanhamento, assistência e indenização.

Sua participação nesta pesquisa não irá alterar seu acompanhamento ou o tratamento que o Sr.(a) já recebe nesse Hospital.

Os pesquisadores se comprometem a tratar no complexo HC-FMRPUSP quaisquer danos à saúde decorrentes direta ou indiretamente da pesquisa.

Fica assegurado ao Sr (a) demandar por indenização por eventuais danos a saúde decorrente da pesquisa conforme as leis do país. A aceitação em participação em participar do estudo não implica renúncia a esse direito.

Garantia de esclarecimentos

Em qualquer etapa do estudo, o(a) Sr (a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimentos de eventuais dúvidas. Os pesquisadores envolvidos são: Fernanda Vidal (nutricionista e pesquisadora responsável); telefone (16) 98155-5447, Dra. Ana LC Martinelli (16-36022454); Dra Ingrid Dick de Paula (16) 3602-2448. Se o Sr (a) tiver alguma dúvida ou consideração sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP no telefone (16) 3602-2228.

Caso concorde em participar da pesquisa e após esclarecimentos ou dúvidas, 2 vias do termo serão assinadas pelo senhor e pelo pesquisador e todas as páginas serão rubricadas. O Sr (a) ficará com uma via e a outra será arquivada nesse centro de pesquisa.

Nome do Paciente – letra de forma

_____/_____/_____
(Assinatura do Paciente) dia mês ano

Nome da Testemunha, se necessário

_____/_____/_____
(Assinatura de Testemunha, se necessário) dia mês ano

_____/_____/_____
Nome do Pesquisador dia mês ano

(Assinatura do Pesquisador)

Pesquisadores Responsáveis:

Fernanda Vidal L. de Paula; Telefone de contato: (16) 98155-5447

Prof. Dr. Ana de Lourdes Candolo Martinelli; Telefone de contato: (16) 3602-2454

Dra Ingrid Dick de Paula; Telefone de contato: (16) 3602-2448

APÊNDICE B- TERMO DE GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO- HCFMRPUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO PARA GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Responsável pelo Biorrepositório denominado “**Biorrepositório de amostras de pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica**”: Prof. Dra. Ana de Lourdes Candolo Martinelli.

O senhor (a) está sendo convidado a autorizar a guarda de amostras de sangue e biópsia de fígado para fins de pesquisa e análise científica. Sua participação é voluntária, desse modo o Sr (a) tem liberdade de aceitar ou não que sua amostra seja guardada, sem risco de qualquer penalização ou prejuízo no atendimento que lhe for prestado. O (A) Sr.(a) também tem o direito de retirar seu consentimento a qualquer momento.

A biópsia de fígado será realizada no momento da cirurgia que está programada para o tratamento da sua doença de base. A retirada desse pequeno fragmento de seu fígado já é realizada como rotina na cirurgia em questão, não necessitando de uma nova biópsia para ter uma amostra armazenada nesta pesquisa. A coleta de sangue será realizada por um profissional capacitado e será feita de uma veia do braço, do mesmo modo que é realizada na rotina do Hospital. As amostras serão guardadas no laboratório de Gastroenterologia do HCFMRP-USP.

A equipe de pesquisa se compromete com a identificação das amostras e dos dados coletados de modo que possam ser garantidos o sigilo e a confidencialidade dos doadores. As amostras serão identificadas por números.

O (a) senhor (a) deve fornecer todos os seus dados para que possa ser localizado pelos pesquisadores. O Sr (a) tem o direito de solicitar as informações de seu interesse relacionadas a pesquisa.

Caso o senhor(a) concorde com a armazenagem das amostras e após os esclarecimentos ou dúvidas, este termo de consentimento de guarda deverá ser rubricado e assinado em duas vias tanto pelo Sr (a) quanto pelo pesquisador que obtém o TCLE, sendo que uma das vias ficará com o senhor (a).

_____ Telefone: _____

Nome do Paciente – letra de forma

_____ ____ / ____ / ____
 (Assinatura do Paciente) dia Mês Ano

_____ Telefone: _____

Nome do Pesquisador

_____ ____ / ____ / ____
 (Assinatura do Pesquisador) dia Mês ano

APÊNDICE C – PROTOCOLO DE PESQUISA

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO- HCFMRPUSP

“Avaliação da vitamina D na doença hepática gordurosa não alcoólica”

PROTOCOLO DE PESQUISA

Nome do voluntário : _____

Data de Nascimento: ____/____/____ Idade: ____ Estado Civil: _____

Escolaridade:

() Ensino fundamental incompleto () Ensino fundamental completo

() Ensino médio incompleto () Ensino médio completo

() Ensino superior incompleto () Ensino superior completo

Diagnóstico Clínico: _____

Comorbidades Associadas: _____

Medicamentos em uso: _____

Atividade Física: ☐ Não ☐ Sim Freq. _____

Tabagismo: ☐ Não ☐ Sim ☐ Ex Qtde. _____

Consumo de bebidas alcoólicas: ☐ Não ☐ Sim ☐ Ex Freq. _____

Uso de suplementos nos últimos 6 meses: _____

DADOS BIOQUÍMICOS (Prontuário eletrônico)

Glicemia:	ALT/TGP:
Ferro	AST/TGO:
Ferritina:	Gama GT:
Colesterol total:	Albumina:
LDL:	TSH:
HDL:	Hemoglobina:
Triglicerídeos:	Fosfatase Alcalina

AValiação Nutricional:

Peso:	Circunferência Abdominal:
Estatura:	Circunferência Cintura:
IMC:	Circunferência Quadril:
	% gordura corporal (bioimpedância):
	MG:
	MM:

ANEXOS

ANEXO A- Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da vitamina D na doença hepática gordurosa não alcoólica

Pesquisador: FERNANDA VIDAL LOPES DE PAULA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 30201314.4.0000.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 710.963

Data da Relatoria: 25/06/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa de mestrado de Fernanda Vidal Lopes de Paula do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP sob orientação da Profa. Dra. Ana de Lourdes Candolo Martinelli.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral: verificar se há deficiência de vitamina D em pacientes com DHGNA e sua associação com gravidade da lesão hepática.

Objetivos Específicos:

- Comparar os níveis de vitamina D séricos entre pacientes com esteatose pura e pacientes com esteatohepatite.
- Avaliar se há relação entre valores de vitamina D séricos e a gravidade da lesão hepática.
- Avaliar se há relação entre valores de vitamina D séricos e parâmetros do estado nutricional.
- Avaliar se há relação entre valores de vitamina D séricos e parâmetros da síndrome metabólica.
- Avaliar se há relação entre valores séricos de vitamina D e de citocinas relacionadas ao processo inflamatório (IL-6 e TNF-).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: O risco de participação desse projeto são mínimos, entretanto existe a possibilidade de quebra de sigilo e confidencialidade dos dados, porém serão realizadas todas as medidas

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO			
Bairro: MONTE ALEGRE		CEP: 14.048-900	
UF: SP	Município: RIBEIRÃO PRETO		
Telefone: (16)3602-2228	Fax: (16)3633-1144	E-mail: cep@hcrp.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DE
RIBEIRÃO PRETO DA USP -

Continuação do Parecer: 7.10.963

necessárias para garantir o sigilo e privacidade dos participantes, tratando as informações de forma anônima e restringindo o acesso aos investigadores. Além disso, a coleta de sangue pode resultar em dor no local da punção ou manchas roxas que desaparecem em alguns dias. Benefícios: os benefícios associados à participação dos pacientes no projeto dizem respeito à contribuição dos mesmos para melhorar a compreensão da associação entre a vitamina D e a doença hepática gordurosa não alcoólica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo transversal que será realizado com pacientes com DHGNA que comparecerem ao ambulatório de gastrocirurgia e que serão submetidos à cirurgia bariátrica e concordarem em participar da pesquisa. A amostra será constituída de 30 pacientes do sexo feminino com indicação de cirurgia bariátrica. Os participantes serão estratificados em esteatose pura ou NASH, diferentes graus de lesão hepática (inflamação e balonização) e grau de fibrose hepática avaliados por meio de biópsia hepática realizada no momento da cirurgia bariátrica e pelo escore NAS. A inclusão dos voluntários obedecerá aos seguintes critérios: mulheres, idade entre 30 e 55 anos e com diagnóstico de DHGNA e que irão realizar cirurgia bariátrica. Serão excluídos pacientes portadores de doenças virais, indivíduos com ingestão significativa (>20g/dia) de álcool, aqueles em uso de suplementação de vitamina D ou cálcio. Além disso, os voluntários em uso de anti-inflamatórios deverão suspender a medicação por um período de 15 dias antes da realização dos exames laboratoriais. Será aplicado um protocolo de avaliação a cada participante, que será completado por meio de questões dirigidas ao paciente. Este protocolo será composto por dados pessoais (idade, sexo, escolaridade, tabagismo, etilismo e atividade física) e dados clínicos (comorbidades associadas e uso de medicamentos) e dados de consumo alimentar. Além dessas informações, serão coletados dados antropométricos (incluindo composição corporal) e bioquímicos (enzimas hepáticas ALT, AST e gama GT; albumina, bilirrubinas, glicemia, insulina basal e lipidograma, ferritina e hemograma completo) que já são realizados como rotina no ambulatório e serão portanto coletadas do prontuário. Será coletada amostra de sangue para dosagem da vitamina D (25-hidroxivitamina D), citocinas inflamatórias (IL-6, TNF-) e determinação dos polimorfismos no gene HFE (C282Y e H63D). Os fragmentos de biópsia hepática serão conservados em formol a 10% para análise de rotina pelo serviço de patologia do HCFMRP-USP. O fragmento conservado em formol é processado rotineiramente no Laboratório de Patologia do HCFMRP-USP. Subsequentemente, será revisto por um único patologista que fará a avaliação do diagnóstico da doença hepática, do grau de lesão hepática e do grau de fibrose do fígado. Todas as avaliações serão realizadas próximo à

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: oep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 710.963

data da cirurgia não excedendo a quatro semanas antes. A pesquisa não alterará de forma significativa o protocolo de diagnóstico dos pacientes, pois a coleta de sangue para dosagens laboratoriais serão realizadas apenas uma vez, sendo complementares aquelas que já fazem parte da rotina do ambulatório. Além disso, serão analisados os resultados da biópsia hepática que já é realizada de rotina no momento da cirurgia. Ressalta-se que o projeto de pesquisa não influenciará em mudanças na coleta de fragmento de fígado. A avaliação do estado nutricional incluirá a análise dos parâmetros antropométricos, composição corporal e consumo alimentar.

Justificativa: A DHGNA está rapidamente se tornando um problema de saúde pública em todo o mundo, sendo uma das mais comuns doenças do fígado. A prevalência tem aumentado, em parte, pelo crescimento do número de adultos e crianças obesas, com síndrome metabólica ou diabetes, que são fatores de risco para o desenvolvimento da DHGNA¹² que, por sua vez, são doenças que também apresentam incidência aumentada de deficiência de vitamina D¹³.

Diversos estudos atuais sugerem relação entre a deficiência da vitamina D e DHGNA. Por este motivo, faz-se necessária a investigação, por meio de estudos controlados, visando relacionar os níveis séricos de 25-hidroxivitamina D, componentes da síndrome metabólica, existência de polimorfismos no gene HFE, níveis séricos de citocinas, e a prevalência e gravidade da DHGNA.

Considerações sobre os Temos de apresentação obrigatória:

Os novos documentos apresentados foram:

- 1) Projeto de Pesquisa versão 2 de 24/06/2014;
- 2) TCLE versão 2.0 de 23/06/2014;
- 3) Carta de solicitação ao CEP de criação do biorrepositório intulado "Biorrepositório de amostras de pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica";
- 4) TCLE para guarda de material biológico versão 1.0 - 23/06/2014;
- 5) Carta solicitando adendo a pesquisa referente a inclusão da determinação dos polimorfismos no gene HFE (C282Y E H63D) dos sujeitos de pesquisa envolvidos neste projeto, conforme descrito no item "Metodologia" da versão atualizada do projeto de pesquisa. Esta avaliação torna-se relevante, uma vez que essas mutações no gene HFE podem estar associadas à sobrecarga de ferro no fígado e assim, influenciar na progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica.

Recomendações:

Não há.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
 UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 710.963

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012 o CEP considera aprovados os seguintes documentos:

- 1) Projeto de Pesquisa versão 2 de 24/06/2014;
- 2) TCLE versão 2.0 de 23/06/2014;
- 3) Criação de um biorrepositório denominado "Biorrepositório de amostras de pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica";
- 4) TCLE para guarda de material biológico versão 1.0 - 23/06/2014.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

RIBEIRÃO PRETO, 07 de Julho de 2014

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
 (Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
 UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br