PAULA PESSIN FÁBREGA

Avaliação de sobrecarga de ferro através de métodos não invasivos em pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica, excesso de peso e hiperferritinemia

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Dra. Cintia Cercato

**SÃO PAULO
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Fábrega, Paula Pessin

Avaliação de sobrecarga de ferro através de métodos não invasivos em pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica, excesso de peso e hiperferritinemia / Paula Pessin Fábrega. -- São Paulo, 2018.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Cintia Cercato.

Descritores: 1.Ferritina 2.Hepatopatia gordurosa não alcoólica 3.Obesidade 4.Siderose 5. Hepcidinas 6. Espectroscopia de ressonância magnética

USP/FM/DBD-250/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

*Obesidade é doença, ninguém é gordo
porque quer e não deve haver preconceito
contra isso.*

Prof. Dr. Alfredo Halpern

Dedico esta tese ao meu orientador, Prof. Dr. Alfredo Halpern (*in memoriam*), que com suas ideias sempre inovadoras e revolucionárias, foi fonte de aprendizado e inspiração para muitos médicos. Agradeço por esta experiência de tê-lo tido como orientador.

Dedico esta, bem como todas as minhas demais conquistas, aos meus amados pais, Walter e Eunice, a minha irmã Tânia, ao meu esposo Henrique e ao meu filho Gabriel. Eles de forma especial e carinhosa me deram força e coragem a cada obstáculo a ser ultrapassado.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Cintia Cercato e a minha coorientadora Dra. Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira, pelo apoio, inspiração, incentivo e amizade durante estes anos de convivência.

Ao Dr. Hilton Muniz Filho, pela paciência e didática excepcional em me introduzir no mundo fantástico da ressonância magnética.

À Aritânia Santos pela amizade e suporte técnico durante a fase de coleta das amostras sanguíneas.

As secretárias da Pós-Graduação, Maria Aparecida e Senária, pelas informações preciosas e apoio.

Às minhas queridas amigas da Pós-Graduação, Soraya Ribeiro Amorim, Andressa Heimbecher Soares, Priscila Priori e Claudia Brito, pela amizade e companheirismo durante todo o trajeto.

Aos queridos amigos do Tribunal Superior do Trabalho, pela cobertura na escala de plantão durante as viagens frequentes a São Paulo.

Ao meu tio Norival por me assessorar com tanto carinho, fazendo sempre me sentir em casa.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação.
Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2011.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas	
Lista de figuras	
Lista de quadros	
Lista de tabelas	
Lista de gráficos	
Resumo	
Abstract	

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Síndrome Dismetabólica Relacionada ao Depósito de Ferro (SDDF)	4
1.2	Metabolismo do Ferro e Hepcidina	5
1.3	Subunidades da Ferritina	12
1.4	Ressonância Magnética	14
1.5	Justificativa	18
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo Primário	20
2.2	Objetivos Secundários	20
3	MÉTODOS	21
3.1	Amostra	22
3.2	Critérios de Inclusão	23
3.3	Critérios de Exclusão	23
3.4	Avaliação Clínica	24
3.5	Avaliação Laboratorial	25
3.6	Estudo Molecular	26
3.6.1	Pesquisa de mutações para hemocromatose hereditária	26
3.6.2	Identificação das subunidades da ferritina através da expressão dos genes das cadeias leve e pesada da ferritina por reação em cadeia da polimerase em tempo real	27
3.6.2.1	Coleta do sangue e preparação de RNA	27
3.6.2.2	Extração do RNA total	28
3.6.2.3	Avaliação da qualidade, quantificação do RNA total	30
3.6.2.4	Avaliação da integridade das amostras do RNA total	31
3.6.2.5	Reação transcrição reversa e expressão dos genes alvos por qRT-PCR	32
3.7	Biópsia Hepática	33
3.8	Ressonância Magnética	35
3.8.1	Parâmetros da RM	35
3.8.2	Análise da imagem	36
3.9	Análise Estatística	37

4	RESULTADOS.....	39
4.1	Casuística.....	40
4.2	População do Estudo	41
4.3	Parâmetros Metabólicos e Inflamatórios de Acordo com os Níveis de Ferritina e Siderose	43
4.4	Análise das Subunidades de Ferritina	49
4.5	Avaliação dos Níveis de Hpcidina	53
4.6	Avaliação do Conteúdo de Ferro pela Ressonância Magnética	54
5	DISCUSSÃO	57
5.1	Papel da Hiperferritinemia na DHGNA	58
5.2	Subunidades da Ferritina	61
5.3	Hpcidina.....	62
5.4	Citocinas.....	63
5.5	Avaliação Histopatológica.....	64
5.6	Ressonância Magnética	66
6	CONCLUSÕES	71
7	ANEXOS	73
8	REFERÊNCIAS.....	80
	APÊNDICE.....	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DHGNA	- Doença hepática gordurosa não alcoólica
DIOS	- <i>Dysmetabolic iron overload syndrome</i>
DM 2	- Diabetes tipo 2
EHNA	- Esteato-hepatite não alcoólica
EROS	- Espécies reativas de oxigênio
FL	- Subunidade leve da ferritina
FN	- Ferritina normal
FP	- Subunidade pesada da ferritina
FPN1	- Ferroportinas
HC	- Hepatocelular
HC-FMUSP	- Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HF	- Hiperferritinemia
HFD	- Hiperferritinemia dismetabólica
HJV	- Hemojuvelina
IMC	- Índice de massa corporal
JAK2/STAT3	- Transdutor do sinal de quinase janus e ativador da transcrição
LIC	- Concentração hepática de ferro
MR	- <i>Magnetic resonance imaging</i>
NAFLD	- <i>Nonalcoholic fatty liver disease</i>
RI	- Resistência à insulina
RIN	- RNA <i>Integrity number</i>
RMI	- Ressonância magnética
SDDF	- Síndrome dismetabólica relacionada ao depósito de ferro
Sid -	- Siderose ausente
Sid +	- Siderose presente
SM	- Síndrome metabólica
SOC3	- Supressores dos níveis de sinalizadores de citocina 3
SRE	- Sistema retículo endotelial
ST	- Saturação de transferrina
TNF- α	- Fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Comportamento da hepcidina nos diferentes cenários	6
Figura 2 - Eletroferograma	31
Figura 3 - Medida de $R2^*$ e gordura no ROI e no fígado como um todo	36
Figura 4 - Fluxograma da seleção dos casos.....	41

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Perfil do ferro de acordo com a condição clínica	8
Quadro 2 - Estudos usando a técnica de relaxometria	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concordância entre avaliações histológicas	34
Tabela 2 - Dados clínicos, antropométricos, laboratoriais e histológicos	42
Tabela 3 - Características demográficas e laboratoriais da população estudada de acordo com os níveis de ferritina e depósito de ferro.....	44
Tabela 4 - Correlação da ferritina sérica com itens da análise histológica	49
Tabela 5 - Expressão das subunidades de ferritina	51
Tabela 6 - Parâmetros da RM medidos no ROI e no fígado inteiro.....	54
Tabela 7 - Valores de $R2^*$ e porcentagem de gordura no ROI, segundo o grau de siderose.....	55

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Mediana da ferritina	46
Gráfico 2 -	Curva ROC relacionando os valores de ferritina com siderose no sexo feminino	47
Gráfico 3 -	Curva ROC relacionando os valores de ferritina com siderose no sexo masculino	47
Gráfico 4 -	Distribuição do depósito de ferro hepático	48
Gráfico 5 -	Expressão de FP e siderose hepática	50
Gráfico 6 -	Expressão de FL e siderose hepática	50
Gráfico 7 -	Expressão de FL e Circunferência abdominal	52
Gráfico 8 -	Expressão de FL e Síndrome metabólica	52
Gráfico 9 -	Valores de hepcidina de acordo com os grupos de ferritina e siderose	53
Gráfico 10 -	Valor do ponto de corte da hepcidina (ng/mL)	54
Gráfico 11 -	Curva ROC avaliando o ponto de corte de R2*	56
Gráfico 12 -	Correlação entre os valores de R2* e ferritina	56

RESUMO

Fábrega PP. *Avaliação de sobrecarga de ferro através de métodos não invasivos em pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica, excesso de peso e hiperferritinemia* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Introdução: A hiperferritinemia (HF) pode refletir o estado inflamatório do paciente com doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e obesidade, porém em cerca de 33% reflete uma real sobrecarga de ferro hepática. A síndrome dismetabólica relacionada ao depósito de ferro (SDDF) é caracterizada por HF, saturação de transferrina normal, alterações metabólicas e um discreto depósito de ferro hepático. O método padrão ouro para o diagnóstico de sobrecarga de ferro é a biópsia hepática. Por se tratar de método invasivo, novos métodos se tornam necessários. Dentre eles a ressonância nuclear magnética (RM) é o mais disponível. **Pacientes e Métodos:** O presente estudo avaliou pacientes com HF, excesso de peso, e DHGNA comprovada por biópsia hepática. Os pacientes realizaram RM pela técnica de relaxometria (análise de gordura/ferro - máquina 3T), dosagem de marcadores inflamatórios (IL-6 e TNF- α), análise da expressão das subunidades da ferritina (FP - cadeia pesada e FL - cadeia leve) e dosagem de hepcidina. Os dados foram comparados com a biópsia hepática. Estes pacientes foram classificados segundo os níveis de ferritina e siderose. Foram classificados em ferritina normal (FN), hiperferritinemia dismetabólica (HFD) e SDDF. O grupo de FN foi caracterizado por ferritina < 200 ng/mL em mulheres e 300 ng/mL em homens, já os pacientes do grupo HFD têm níveis elevados de ferritina e ausência de siderose hepática. Os pacientes também foram avaliados considerando somente a siderose hepática. **Resultados:** Foram avaliados 152 pacientes com DHGNA comprovada pela biópsia hepática, sendo 67 incluídos no estudo. A frequência de SDDF e HFD foi de 37% e 16%, respectivamente. O nível de corte da ferritina sérica, a fim de identificar depósito de ferro, foi de 180.4 ng/mL para mulheres (sensibilidade de 76,9%, especificidade de 64,3%) e 350,7 ng/mL para homens (sensibilidade de 72,7% e especificidade de 75,5%). Os pacientes com SDDF E HFD não apresentaram piores características metabólicas e histológicas. Os níveis de hepcidina foram maiores nos grupos SDDF E HFD, se correlacionando com o conteúdo de ferro hepático quando > 30,2 ng/mL. Os marcadores inflamatórios (IL-6 e TNF- α) foram semelhantes entre os grupos. A expressão de FP e FL se comportaram de modo semelhante

entre os grupos. A FL se correlacionou com síndrome metabólica e circunferência abdominal, enquanto a FP se correlaciona com níveis maiores de esteatose. A RM foi capaz de identificar o conteúdo de ferro destes pacientes, sendo o ponto de corte de $R2^*$ $58,9s^{-1}$. A porcentagem de gordura, identificada pela RM, foi de 17% nos grupos HFD e SDDF e de 13% no grupo FN. **Conclusão:** 1) RM utilizando a técnica de relaxometria com correção da interferência de gordura se mostrou acurado na avaliação de discreto depósito de ferro em pacientes com SDDF; 2) HF pode refletir depósito de ferro hepático quando acima de 180,4 ng/mL para mulheres e 350,7 ng/mL para homens, não foi encontrada relação entre HF e características piores metabólicas ou histológicas; 3) FL se correlacionou com síndrome metabólica e circunferência abdominal, enquanto a FP se correlaciona com esteatose; 4) Hepcidina se correlacionou com siderose e ferritina sérica nos pacientes com DHGNA.

Descritores: ferritinas; hepatopatia gordurosa não alcoólica; obesidade; siderose; hepcidinas; espectroscopia de ressonância magnética.

ABSTRACT

Fábrega PP. *Iron Overload evaluation by non-invasive methods in patients with non-alcoholic fatty liver disease, overweight and hyperferritinemia* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

Introduction: Hyperferritinemia (HF) may reflect the inflammatory status of patients with NAFLD and obesity, but about 33 % reflects a real hepatic iron overload. The dysmetabolic iron overload syndrome (DIOS) definition is HF, normal transferrin saturation, and mild hepatic iron overload in a patient with metabolic disorders. The gold standard for diagnosis of iron overload is the liver biopsy. As it is an invasive method, new methods are necessary. Among them, magnetic resonance imaging (MRI) is the most available one. **Patients and Methods:** This study evaluated patients with HF, overweight and NAFLD. All patients were submitted to liver biopsy. MRI relaxometry (fat/iron analysis - 3T machine), measurement of inflammatory markers (TNF- α and IL-6), analysis of the expression of ferritin light and heavy chain subunits (FL and FP) and serum hepcidin were held. Data were correlated with liver biopsy. The patients were classified considering the ferritin levels and siderosis. They were classified in three groups: normal ferritin (NF), dysmetabolic hyperferritinemia (DHF) and DIOS. The NF group has serum ferritin (SF) below 200 ng/dL for women and 300 ng/dL for men, DHF must have SF above those values and negative siderosis, and DIOS have hyperferritinemia and positive siderosis. They are also classified considering only the iron status. **Results:** 152 biopsy-proven NAFLD patients were screened but only 67 were included in this study. DIOS and HFD frequency in our sample were 37% and 16%, respectively. The cut-off of ferritin levels were correlated with iron overload in liver biopsy was 180.4 ng/mL for women (sensitivity of 76.9% and specificity of 64.3%) and 350 ng/mL for men (sensitivity of 72.7% and specificity of 75.5%). Although, DHF and DIOS patients did not have worst metabolic or histological characteristics, hepcidin levels were higher in DHF and DIOS groups, correlating with hepatic siderosis when hepcidin is above 30,2 ng/mL. The inflammatory markers (IL-6 and TNF- α) were similar among the groups. The expression of FP and FL were similar in role sample. FL correlates with metabolic syndrome and abdominal circumference, while FP correlates with in higher fat scores. The MRI was able to identify mild iron overload. The R2* cut off level was 58,9 s⁻¹. The fat percentage in DIOS and HFD was of 17% each and in NF 13%.

Conclusion: 1) MRI using relaxometry method is accurate to evaluate mild iron overload in DIOS patients; 2) HF may reflect iron overload when above 180.4 ng/mL for women and 350.7 ng/mL for men, however, this study didn't find correlation between HF and insulin resistance and worst NAFLD histological characteristics; 3) FL correlates with metabolic syndrome and abdominal circumference while FP correlates with in higher fat scores 4) Hepcidin correlates with iron and serum ferritin in NAFLD patients.

Descriptors: ferritins, non-alcoholic fatty liver disease; obesity; siderosis; hepcidins; magnetic resonance spectroscopy.

1 INTRODUÇÃO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) tem uma grande associação com obesidade e síndrome metabólica (SM)^{1,2}. Muitos autores consideram a DHGNA como o componente hepático da SM^{1,3-5}. Atualmente é a hepatopatia crônica mais prevalente nos países ocidentais⁶ com uma prevalência global de 25,24%⁷.

A relevância clínica desta associação é o maior índice de progressão para esteatohepatite (EHNA) e cirrose em obesos. A prevalência de obesidade em indivíduos com EHNA é de 81,8%⁷.

Estudo prévio demonstrou uma prevalência de 100% de DHGNA em obesos grau 3 submetidos a cirurgia bariátrica, sendo que destes, 67% apresentavam EHNA e 5,5 % apresentavam cirrose⁸. Há alguns preditores clínicos e laboratoriais que indicam quais pacientes são mais suscetíveis a um pior prognóstico histológico. Entre os clínicos estão a presença de SM e diabetes tipo 2 (DM2) e entre os laboratoriais a hiperferritinemia (HF)^{5,9}.

Um estudo populacional avaliou a relação de HF, hiperinsulinemia e DHGNA e sugeriu que a presença de elevados níveis de ferritina em um paciente metabólico seria preditor de DHGNA ainda não diagnosticada¹⁰.

Kowdley *et al.*¹¹ analisaram 628 indivíduos com EHNA e identificou HF em 20% de sua amostra, correlacionando esta variável a fibrose avançada e um pior prognóstico histológico¹¹ esta correlação foi confirmada por uma

metanálise¹². Hagstrom *et al.*¹³ acompanharam 355 pacientes com DHGNA, 222 com hiperferritinemia e 133 com ferritina normal (FN), por cerca de 15 anos. Foi evidenciado um aumento da mortalidade no grupo com HF. A hiperferritinemia, isoladamente, é tida como marcador de mortalidade por todas as causas, segundo estudo populacional associado a uma metanálise¹⁴.

A ferritina é uma proteína encontrada em bactérias, fungos, plantas e animais. Esta proteína tem um arcabouço entremeado por canais pelos quais o ferro entra para ser oxidado antes de seu armazenamento¹⁵. É um indicador dos estoques de ferro corporal sendo sua variabilidade influenciada pela biodisponibilidade sérica deste metal. A hiperferritinemia é também relacionada ao aumento do estresse oxidativo, e este fato resulta no acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROS) contribuindo para o aumento de resistência à insulina (RI), aterosclerose e doença cardiovascular³. Vários autores têm demonstrado a associação entre hiperferritinemia, DM2, RI e síndrome metabólica^{3,4,6,16-24}.

A hiperferritinemia em pacientes com DHGNA tem seu fator desencadeante bem controverso. Seria somente o fator inflamatório próprio da doença e/ou reflexo de um depósito de ferro? Alguns trabalhos defendem que o depósito de ferro exerceria uma influência importante nos níveis de ferritina²⁵⁻²⁸. Assim, sabe-se que a sobrecarga de ferro no fígado leva ao aumento da RI na musculatura periférica e fígado provavelmente por aumentar o estresse oxidativo, acarretando no maior risco de desenvolvimento de DM2^{4,18,21}. Há cerca de 20 anos, foi descrita a síndrome dismetabólica relacionada a sobrecarga de ferro (SDDF)^{1,3,4,16-18,20,21,29-33}.

1.1 Síndrome Dismetabólica Relacionada ao Depósito de Ferro (SDDF)

A SDDF relaciona HF, saturação de transferrina (ST) normal ou discretamente elevada com leve depósito de ferro hepático, em indivíduos com alterações metabólicas como obesidade, dislipidemia, resistência insulínica ou diabetes^{4,16,19,20,29,31-35}. Esta observação foi feita a partir de pacientes com depósito de ferro discreto identificado pela biópsia hepática e sem a presença de mutações do gene HFE que o justificassem. Posteriormente foi ressaltada a associação entre DHGNA e SDDF^{16,19,20,29,32,34}. Estudos indicam uma prevalência de SDDF em 33% dos pacientes com DHGNA, geralmente associada a síndrome metabólica^{3,34}.

Há a diferença entre SDDF e hiperferritinemia dismetabólica (HFD), pois na segunda não há depósito de ferro. A diferenciação é importante, pois pacientes com HFD não teriam o fator agravante do ferro e poderiam ter outro mecanismo de indução de resistência à insulina³⁶.

A patogênese da SDDF está relacionada a uma regulação alterada do transporte de ferro associado à esteatose, resistência insulínica e inflamação de baixo grau^{16,34}.

SDDF pode facilitar a evolução para DM tipo 2, progressão de doença cardiovascular, evolução natural da doença hepática e o aumento de hepatocarcinoma^{3,11}.

1.2 Metabolismo do Ferro e Hepcidina

O ferro é fundamental para o metabolismo celular. O seu controle deve ser rigoroso para que os níveis séricos deste mineral permaneçam adequados. O ferro é liberado na circulação via enterócitos, hepatócitos e macrófagos. Os enterócitos são responsáveis pela absorção de 1 mg a 2 mg ferro provenientes da dieta, e os macrófagos reciclam internamente de 20 mg a 25 mg de ferro (hemácias senescentes) devolvendo-o para a circulação¹.

O ferro é absorvido como Fe^{2+} pelos enterócitos do duodeno proximal, via transportador divalente de metal 1 (DMT1) e liberado pela membrana basolateral para a corrente sanguínea via ferroportinas (FPN1)^{1,18,37}. Antes de se ligar a transferrina, o ferro é oxidado em uma membrana contendo cobre e hefastina ferroxidase³⁸ e após a ligação é transportado na corrente sanguínea até os órgãos alvo. O ferro (Fe^{3+}) entra nas células alvo por meio de receptores de transferrina. O ferro é elemento essencial para produção de heme na medula óssea e de outras enzimas mitocondriais^{3,18}. Há ferroportinas nas células intestinais, hepatócitos e macrófagos, sempre como única via de saída de ferro das células¹⁸. A hepcidina age internalizando e degradando estas ferroportinas entéricas, resultando na redução da absorção intestinal do ferro e levando ao seu acúmulo nos macrófagos e fígado. Este ferro permanece na célula entérica, sendo eliminado durante a descamação¹. Os mecanismos fisiológicos e patológicos estão ilustrados na Figura 1.

Fonte: Modificado de Aigner *et al.*¹

Figura 1 - Comportamento da hepcidina nos diferentes cenários. Modelo demonstrativo das alterações do metabolismo do ferro ocorridas na doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). A: Regulação do ferro em condições fisiológicas. A quantidade de ferro absorvida via enterócitos duodenais é rigorosamente controlada pela hepcidina. Geralmente não há depósito de ferro hepático. B: Resume as alterações ocorridas no metabolismo de ferro em DHGNA sem depósito de ferro. Baixa expressão de FPN1 e HJV, mesmo na ausência de depósito de ferro. A hepcidina e expressão das FPN1 entérica são iguais aos controles. C: Alterações no metabolismo do ferro em DHGNA com depósito de ferro. O depósito de ferro na DHGNA está associado a um aumento importante de agentes inflamatórios como fator de necrose tumoral (TNF- α). O excesso de ferro progride devido ao efeito de inibição das ferroportinas exercido pelos agentes inflamatórios. Devido ao acúmulo de ferro há um estímulo a produção de hepcidina, que por sua vez diminui a absorção de ferro via enterócitos. Tf: transferrina DMT1: divalent metal transporter 1

O hepatócito tem um duplo papel no metabolismo do ferro, sendo o maior sítio de armazenamento e o principal secretor de hepcidina³⁹.

A hepcidina é o principal agente regulador da homeostase do ferro, agindo por um mecanismo hormônio símile^{1,40}. É produzida principalmente pelos hepatócitos, sendo também encontrada, em menor escala, em macrófagos, células da ilhota pancreática e tecido adiposo^{36,41}. A produção

hepática de hepcidina é influenciada por vários estímulos, alguns indutores e outros supressores. Os principais fatores estimulatórios são a própria deposição de ferro, inflamação hepática, inflamação do tecido adiposo (IL6 e TNF- α), LPS (lipopolissacarídeo) intestinal, hiperleptinemia e sinais de gliconeogênese³⁶. E entre os supressores estão a atividade eritropoiética, deficiência de ferro e hipóxia⁴¹. Os níveis séricos de hepcidina variam de 20 ng/mL a 200 ng/mL⁴². A SDDF cursa com níveis séricos elevados de hepcidina como será explicada a seguir.

A hemocromatose hereditária é causada por uma deficiência de hepcidina, resultando na maior absorção de ferro e consequente sobrecarga^{17,43}. Já em pacientes com SDDF, estudos mostram níveis elevados de hepcidina em relação aos controles saudáveis e com hemocromatose⁴¹. Nestes pacientes, a elevação da hepcidina é secundária ao excesso de ferro associado a um estado de resistência a hepcidina, resultando em uma absorção intestinal diminuída de ferro e aprisionamento do mesmo nos hepatócitos e macrófagos^{1,40,41,44}. No Quadro 1 está descrito o perfil de ferro em diferentes condições clínicas.

Quadro 1 - Perfil do ferro de acordo com a condição clínica

Doença	Hepcidina	Ferritina	ST	Ferro sérico	Ferro SRE	Ferro HC
Hemocromatose	↓↓	↑↑↑	↑↑	↑↑	-	+++
Anemia de doença crônica	↑↑	↑↑	↓↓	↓↓	+++	-
DHGNA	↑	↑	↔↑	↔	+	+
Álcool	↓	↑↑	↑↑	↑↑	-	+
Hepatite por Vírus C	↓	↔↑	↔↑	↔↑	-	+
Obesidade Grau 3	↑	↑	↓	↓	n/a	n/a

HH: hemocromatose; ADC: Anemia de doença crônica; DHGNA: Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica; HCV: Hepatite C; ST: saturação de transferrina; Ferro SRE: depósito de ferro no sistema retículo endotelial/células de Kupffer; Ferro HC: depósito de ferro hepatocelular. ↓: reduzido; ↑: elevado ↔: sem alteração; +: presente; -: ausente; n/a: não se aplica¹⁸

Ruivard *et al.*⁴⁴ avaliaram a absorção de ferro em indivíduos magros, com sobrepeso e SDDF. Foi proposta uma teoria para a história natural da SDDF constituída por duas etapas. A primeira etapa seria deflagrada pelo aumento progressivo do peso, em uma fase de maior biodisponibilidade de ferro e gordura pela dieta, resultando em um acúmulo progressivo de ferro e gordura no fígado. Sugere-se que obesos com dieta rica em ferro e gordura teriam aumento na absorção intestinal de ferro. A segunda etapa seria caracterizada pelo aumento da hepcidina na tentativa de reduzir a absorção de ferro. A elevação da hepcidina ocorre em resposta tanto ao acúmulo de ferro quanto ao desenvolvimento de adiposidade visceral e consequente inflamação de baixo grau. Assim pacientes com excesso de peso teriam uma absorção entérica de ferro menor do que indivíduos magros, devido à elevação da hepcidina e este efeito seria ainda mais pronunciado em indivíduos com SDDF.

Foi observado que indivíduos com DHGNA possuem uma maior concentração de agentes pró-inflamatórios como TNF- α e citocinas inflamatórias, resultando em mau funcionamento de FPN1 e menor expressão de hemojuvelina (HJV) hepáticas¹. A HJV estimula a síntese de hepcidina frente ao excesso de ferro⁴⁵. Ela também age na sensibilidade intestinal ao ferro presente na dieta. Assim, a inflamação favorece o acúmulo de ferro hepático. Pacientes sem acúmulo de ferro hepático possuem dosagem de hepcidina dentro do valor da normalidade. Já em pacientes com SDDF há aumento da hepcidina com consequente internalização das ferroportinas intestinais visando menor absorção de ferro^{1,18}. Este cenário se assemelha a patogênese do diabetes tipo 2, em que o aumento da glicemia se relaciona a resistência à insulina^{36,46}.

Como já foi dito, a hepcidina é também produzida por monócitos/macrófagos e tem sua produção estimulada por LPS e outras bactérias via receptores *Toll Like* e, provavelmente também, via IL6/STAT3⁴². Este mecanismo age de forma autócrina na intenção de diminuir o aporte de ferro localmente durante uma invasão de patógenos. Comporta-se como uma proteína de fase aguda da inflamação^{1,42}.

Há correlação entres os níveis de ferritina e hepcidina em indivíduos com SDDF. Além do ferro em si, outros fatores como citocinas, em especial a interleucina 6 (IL6) e TNF- α estão envolvidos⁴⁷.

A IL6 é a citocina que mais estimula a expressão da hepcidina, superando o TNF- α ⁴⁸. O estudo in vitro mostrou que em situação de infamação aguda a IL-6 pode reduzir rapidamente o ferro no organismo⁴⁸.

A leptina é uma adipocina também relacionada ao estímulo da síntese de hepcidina, sendo encontrada uma correlação positiva entre os níveis de leptina e hepcidina em crianças obesas⁴⁹. A leptina ativa a via transdutor do sinal de quinase janus e ativador da transcrição (JAK2/STAT3), contribuindo diretamente para a elevação dos níveis séricos de hepcidina e consequentemente deposição de ferro em indivíduos com DHGNA^{36,50-52}. Um grande estudo com 1391 indivíduos avaliou os níveis de hepcidina com a presença dos componentes da síndrome metabólica. Foi evidenciado um aumento linear conforme a quantidade dos componentes da síndrome metabólica⁴⁹.

A glicose se mostrou um estimulador da secreção de hepcidina pelas células pancreáticas. A absorção de ferro vai diminuindo gradualmente enquanto a hepcidina se eleva^{18,53}. A deposição de ferro no pâncreas se limita as células beta, pois estas são ricas em receptores DMT 1, necessários para o transporte de zinco, e apresentam baixa expressão de ferroportinas, única via de saída do ferro^{54,55}.

Estudos em animais demonstraram que a ligação da hepcidina/ferroportinas é capaz de ativar a via JAK2/STAT3, levando a uma produção de supressores dos níveis de sinalizadores de citocina 3 (SOCS3). Este último induz esteatose hepática e componentes da síndrome metabólica, em especial a resistência à insulina^{49,56}. Esta elevação da hepcidina resultaria em um ciclo vicioso piorando a DHGNA via SOCS3⁵⁶. Outra observação, também em modelo animal, é a contribuição dos níveis elevados de hepcidina na comorbidade cardiovascular em indivíduos com síndrome metabólica⁵⁷.

A própria obesidade, sendo uma situação de inflamação crônica, cursa com aumento da hepcidina. Em obesos grau 3 pode se relacionar o aumento da hepcidina a anemia relacionada a obesidade^{1,36}. Tanto a deficiência de ferro quanto a sobrecarga são faces da mesma moeda no paciente obeso. As mesmas alterações fisiopatológicas podem determinar tanto a deficiência de ferro quanto a sobrecarga (SDDF). O paciente obeso, devido ao aumento do tecido adiposo, tem aumento de marcadores inflamatórios, como IL1, IL6 e TNF- α , resultando em aumento da hepcidina e redução da disponibilidade de ferro periférica, podendo resultar em anemia⁵⁸. Como mecanismo adicional é aventado que estas citocinas inflamatórias têm a capacidade de reduzir a produção de eritropoetina, reduzindo a produção de precursores dos eritrócitos⁵⁹. São os mesmos mecanismos relacionados a SDDF. A predisposição genética provavelmente é um fator importante⁵⁹.

Apesar dos mecanismos de depósito de ferro descritos, alguns pacientes com características clínicas semelhantes acumulam ferro e outros não. Fatores genéticos, como as mutações da β globulina e do gene $\alpha 1$ anti tripsina, e alimentares podem determinar a predisposição ao depósito⁵⁹.

Os hábitos dietéticos podem influenciar o acúmulo de ferro. Estudos sugerem que alguns nutrientes podem perpetuar o depósito de ferro nos indivíduos com SDDF. Dietas ricas em gordura e ferro, resultam em aumento dos receptores de transferrina e elevam a hepcidina, com consequente redução das FPN1 hepáticas e adipocitárias^{54,60}. Coelhos submetidos a dieta rica em gordura apresentaram aumento da fagocitose de eritrócitos pelas

células de Kupffer hepáticas. Em humanos foram identificados agregados de eritrócitos em áreas do fígado de indivíduos com DHGNA. A dieta rica em gordura pode elevar a eritrofagocitose e ser mais um mecanismo de SDDF.

A hepcidina é uma peça fundamental no estudo dos pacientes com excesso de ferro.

1.3 Subunidades da Ferritina

A biodisponibilidade do ferro é o principal desencadeante da *up regulation* da ferritina, porém este aumento também pode ser resultante de situações marcadas por aumento do estresse oxidativo, infecção ou inflamação²⁹.

Existem dois tipos de subunidades da ferritina: pesada (FP) e leve (FL). Estas subunidades foram descritas em 1983, pela análise de DNA e RNA de fígado de roedores e baço humano¹⁵. O arcabouço proteico da ferritina é composto por 5×10^6 Da e consiste nas isoformas pesadas com 21 000 Da e leves com 19 000 Da^{15,61,62}.

A proporção das subunidades da ferritina varia em cada órgão dependendo da disponibilidade de ferro^{15,61,63,64}. O predomínio da subunidade pesada determina uma característica de captar e liberar ferro com mais rapidez, sendo favorável nos ambientes inflamatórios em que a presença de ferro livre aumentaria a quantidade de EROS, exercendo um efeito deletério. A remoção rápida deste metal exerceria um efeito anti-inflamatório^{15,61,63-65}. Por outro lado, órgãos com predomínio da subunidade leve têm uma maior capacidade de armazenamento de ferro, porém maior

lentidão de liberação, sendo este tipo mais expresso em órgãos como fígado e baço^{15,61,63,64}. Ambas as subunidades são capazes de reduzir a formação de EROS, a grande diferença é a rapidez que captar e liberar o ferro⁶⁴.

Diferentes fatores são responsáveis pela regulação da expressão das subunidades de ferritina, sendo os mais relevantes: ferro, EROS e citocinas⁶⁴. Em situações em que o estresse oxidativo e a inflamação sejam os deflagradores do aumento da ferritina, há um aumento de ambas as subunidades, porém com predomínio da subunidade pesada⁶⁶. Esta subunidade permite um tráfego mais dinâmico de ferro do que a FL, pois a FP é capaz de acumular e liberar o ferro com mais rapidez. Esta característica confere um efeito antioxidante, exercendo um mecanismo de defesa do organismo⁶⁴.

Um estudo avaliou o efeito do TNF- α na expressão das subunidades de ferritina em células musculares⁶⁷. A exposição ao TNF- α resultou em estímulo da subunidade pesada, independentemente da concentração de ferro. A estimulação de uma subunidade capaz de sequestrar com mais rapidez o ferro seria benéfico para indisponibilizar o metal para organismos invasores e amenizar a lesão tecidual por radicais livres^{67,68}. Outro estudo avaliou a distribuição das subunidades de ferritina em macrófagos e eritrócitos da medula óssea de pacientes enfermos (tuberculose, AIDS, malária ou câncer) e foi observada uma maior expressão da subunidade pesada nos macrófagos e uma maior razão FP/FL nos eritrócitos, esta característica de diminuir a disponibilidade de ferro, quando cronicamente estimulada, pode contribuir para a anemia de doença crônica devido ao retenção de ferro nos macrófagos⁶⁵.

Em situações em que haja maior disponibilidade e depósito de ferro, como por exemplo, a infusão de ferro, há um predomínio da FL⁶².

A principal causa genética de hiperferritinemia, ligada a uma mutação da FL, é a síndrome catarata hiperferritinemia hereditária (HHCS). A HHCS consiste em hiperferritinemia acompanhada do desenvolvimento precoce de catarata por deposição de FL no cristalino⁶⁹. HHCS ocorre em uma frequência de 1:200000 habitantes e é causada por uma mutação no elemento responsivo ao ferro da FL, resultando em uma produção de FL, não regulada pelas reservas de ferro. Exceto pela formação de catarata, estes pacientes geralmente são assintomáticos⁷⁰.

Não há trabalhos avaliando as subunidades de ferritina em portadores de DHGNA.

1.4 Ressonância Magnética

A ressonância magnética (RM) é considerada o melhor método não invasivo para se quantificar o nível de ferro hepático, visando confirmação diagnóstica e seguimento de medidas de depleção de ferro com uma alta sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos^{71,72}. Alguns autores a consideram melhor que a biópsia hepática para seguimento de depósito de ferro hepático em indivíduos realizando quelagem de ferro⁷³. Estas informações são baseadas predominantemente em estudos com indivíduos portadores de hemocromatose e doenças hematológicas acumuladoras de ferro^{71,74}. Poucos estudos avaliaram a RM em situações de DHGNA onde pode haver sobrecarga leve de ferro.

A característica superparamagnética deste íon leva a distorção local dos campos magnéticos com relaxamento dos spins, resultando em diminuição do tempo de relaxamento longitudinal (T1) e transverso (T2). Este efeito resulta em uma perda de intensidade de sinal do órgão afetado proporcionalmente ao depósito de ferro^{71,72}. Diferentemente da gordura, o ferro não é medido diretamente, necessitando de correlação direta com a concentração férrica, no intuito de criar uma curva de calibração, relacionada aos tempos de relaxamento supracitados. Existem ainda outros fatores que podem prejudicar a análise da concentração de ferro, como o ruído na imagem e infiltração gordurosa⁷⁵.

Existem algumas formas de se mensurar e quantificar depósito de ferro hepático pela ressonância magnética, sendo os métodos mais consolidados os de intensidade de sinal (SIR) e a relaxometria, esta última tanto por T2 quanto por T2* ⁷⁶⁻⁸⁰.

A técnica SIR foi desenvolvida na Universidade de Rennes, com a principal publicação feita em 2004⁷⁴. Esta técnica consiste na aquisição de 5 sequências obtidas a cada apneia, com tempos de eco progressivamente mais longos. A análise é feita através da mensuração da razão entre a média de sinal do lobo hepático direito com a musculatura paravertebral. A análise é feita por um algoritmo disponível gratuitamente na internet (https://imageded.univ-rennes1.fr/en/mrquantif/online_quantif.php), sendo que o mesmo seleciona uma das sequências e retorna um resultado de concentração de ferro no fígado⁷⁴. Dentre as limitações do método estão o grande desvio padrão do resultado na quantificação, a influência da esteatose na análise (superestimando levemente

a sobrecarga de ferro), musculatura paravertebral gordurosa ou muito irregular, e a impossibilidade de mensurar os estoques de ferro quando encontram-se acima de 320 $\mu\text{mol/g}$ ^{75,78,80}.

A relaxometria tem ganhado muito espaço nos últimos anos, podendo ser obtida tanto por valores de relaxamento T2/R2 ou T2*/R2*. Este método consiste na aquisição de uma sequência com múltiplos tempos de eco⁷⁷⁻⁸⁰. O cálculo deste parâmetro é feito de maneira simples, através da mensuração do decaimento do sinal do fígado nestes tempos de eco, que obedece uma função logarítmica exponencial, obtendo-se assim o valor de R2 ou R2* ($R2^* = 1000/T2^*$)^{80,81}. A relaxometria por T2 foi utilizada principalmente nos trabalhos de pesquisadores australianos, sendo obtidos valores acurados em todos os níveis clínicos de depósito de ferro nos pacientes⁸⁰. A técnica está disponível comercialmente através da empresa RessonanceHealth® através da técnica Ferriscan®. Uma das limitações do método é o grande tempo de aquisição da imagem, que geralmente dura de 15 a 20 minutos, sendo que estas ainda têm de ser enviadas para a empresa que irá calcular o acúmulo de ferro⁸⁰, com cobrança por cada paciente.

A relaxometria por T2* tem se mostrado uma iniciativa mais prática. Ela pode ser obtida em apenas uma apneia de 15 segundos e os valores obtidos são bastante comparáveis ao Ferriscan®⁷⁹. As principais limitações do método são: a) a presença da esteatose hepática, que pode superestimar a quantidade de ferro, sendo necessária a correção dos valores de ferro para a quantidade de gordura hepática^{77,78}; depósitos acentuados de ferro no fígado, sendo necessárias técnicas matemáticas (técnica de truncagem ou correção do nível

de ruído) ou mesmo de aquisição de imagem (redução do tempo de eco) para avaliação do depósito de ferro; c) a dificuldade do estabelecimento de um valor considerado normal para populações heterogêneas, dificultando o diagnóstico de sobrecarga leve de ferro em alguns pacientes.

Esta técnica pode ser realizada em aparelhos de 1,5 T e 3 T. É esperado que os scanners 3 T apresentem melhor sensibilidade e acurácia, facilitando o diagnóstico de SDDF com discretos depósitos de ferro^{82,83}. Destaca-se, no entanto, que máquinas 3 T tenham maiores limitações para depósitos de ferro mais acentuados, pois os artefatos de susceptibilidade são maiores nos mesmos. Existem alguns estudos validando as máquinas 1,5 T para cálculo de ferro hepático, porém foram avaliados pacientes com grandes depósitos de ferro, como talassêmicos e politransfundidos^{79,84-86}.

Recentemente um estudo validou o uso da técnica de relaxometria, utilizando aparelhos de 3 T, em pacientes com diferentes doenças causadoras de depósito de ferro, incluindo pacientes com SDDF. A técnica se mostrou acurada na detecção de depósitos de ferro com concentração hepática de ferro (LIC) < 130 $\mu\text{mol/g}$, sendo que depósitos de ferro mais acentuados tiveram melhor avaliação pela técnica de intensidade de sinal⁸². O $R2^*$ teve uma boa correlação com o LIC identificado pela dosagem química do ferro. Valores de $R2^*$ de 77 s^{-1} se correlacionaram a LIC de 32 $\mu\text{mol/g}$, utilizando a fórmula:

$$\text{LIC}_{R2^*}(\mu\text{mol/g}) = 0,314 R2^* - 0,96^{82}$$

1.5 Justificativa

A sobrecarga de ferro no paciente com DHGNA é um fator de pior evolução clínica e histológica. A dosagem de ferritina sérica é insuficiente para identificar se há acúmulo de ferro no hepatócito, pois pode apenas refletir o processo inflamatório e estresse oxidativo associado ao acúmulo de gordura hepática. A biópsia hepática é o padrão ouro para a determinação de acúmulo de ferro, no entanto é invasiva e de maior risco. A utilização de métodos não invasivos para determinar sobrecarga de ferro nesse grupo de pacientes será de grande importância clínica na identificação precoce de pacientes com SDDF, que sabidamente apresentam maior risco de evolução para EHNA e cirrose.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Primário

Avaliar a capacidade da ressonância magnética em quantificar o depósito de ferro hepático em indivíduos com doença hepática gordurosa não alcoólica utilizando como padrão ouro a biópsia hepática.

2.2 Objetivos Secundários

- a) Correlacionar os níveis de ferritina com parâmetros metabólicos, inflamatórios e histológicos em pacientes com DHGNA.
- b) Identificar o padrão de distribuição das subunidades de ferritina no sangue periférico em indivíduos com e sem sobrecarga de ferro hepático.
- c) Determinar os níveis de hepcidina sérica de acordo com a presença de siderose.

3 MÉTODOS

3.1 Amostra

Foram selecionados pacientes provenientes do ambulatório de DHGNA da disciplina de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) que realizaram biópsia hepática para investigação de EHNA. No serviço é indicada biópsia nos pacientes com DHGNA identificada por ultrassonografia associada às seguintes situações:

- Pacientes com suspeita de EHNA.
- Diagnóstico diferencial de outras hepatopatias.
- Elevação persistente de enzimas hepáticas (TGO, TGP e gama GT) por mais de 3 meses.

Estas indicações são baseadas no consenso de DHGNA da Sociedade Brasileira de Hepatologia.

Após a biópsia, os pacientes foram convidados para participar do estudo, sendo aplicado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A).

3.2 Critérios de Inclusão

- Idade superior a 18 anos de ambos os gêneros.
- Realização da biópsia hepática há menos de 6 meses.

3.3 Critérios de Exclusão

- Presença de processos infecciosos ou doenças agudas no momento da coleta dos marcadores inflamatórios.
- Diabetes tipo 2 descompensado ($A1C > 7,5\%$).
- Ingestão de álcool ($>100g$ etanol/semana)⁸⁷.
- Hepatopatia crônica: esquistossomose, hepatites virais e positividade dos autoanticorpos hepáticos.
- Alterações nos exames de: cobre sérico, ceruloplasmina, e alfa 1-antitripsina.
- Hemocromatose hereditária: mutação C282Y positiva (em homo ou heterozigose) e mutação H63D homozigose. Não foram excluídos pacientes heterozigotos para H63D.
- Anemias hemolíticas ou transplante de medula.
- Transfusão sanguínea ou doação de sangue nos últimos 6 meses.
- Uso de medicamentos hepatotóxicos por mais de 6 meses.
- Sepses, choque, carcinomatose ou quadro terminal.
- Intoxicação exógena por agentes oxidantes.
- Gravidez e lactação.
- Contraindicações a realização da ressonância magnética.

3.4 Avaliação Clínica

Informações demográficas como idade, sexo, histórico médico e uso de medicações foram coletadas durante as entrevistas de seleção (Anexo B). O exame físico (peso, altura, nível pressórico, circunferência abdominal e de pescoço) foi realizado nesta mesma consulta médica, sendo os dados coletados por um único pesquisador. O índice de massa corpórea foi calculado pela fórmula de Quetelet [IMC= peso em kg/(altura em m)²]. Os pacientes foram classificados quanto ao grau de adiposidade. A circunferência abdominal (CA) foi medida na meia distância entre a crista ilíaca e a última costela e a circunferência de pescoço foi medida da base do pescoço no nível do limite inferior da cartilagem cricotireoidea. Foi avaliada a presença de comorbidades (hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus, dislipidemia, dentre outras). A resistência à insulina foi avaliada através do *Homeostasis Model Assessment* (HOMA) utilizando a seguinte fórmula: (insulina de jejum [μ U/mL] X glicose de jejum [mmol/L]/22,5).

Para o diagnóstico de SM foram utilizados os critérios de NCEP ATP III. Presença de pelo menos três dos seguintes critérios: CA >102 cm para homens e >88 cm para mulheres; diabetes tipo 2 ou glicemia de jejum > 110 mg/dL; HDL < 40 mg/dL para homens e <50 para mulheres; triglicérides > 150 mg/dL e pressão arterial $\geq$ 130/85 mmHg⁸⁸.

Os pacientes foram questionados sobre o consumo de bebida alcoólica, sendo a quantidade de etanol calculada conforme Apêndice A⁸⁷.

3.5 Avaliação Laboratorial

A avaliação laboratorial complementar consistiu de dosagens de ferritina, ferro sérico, saturação de transferrina, glicemia, insulina, hemoglobina glicada, colesterol total e frações, triglicérides, transaminases, Gamaglutamiltransferase (gama GT), TNF- α e interleucina 6 (IL-6).

A hepcidina sérica foi dosada pelo ensaio ELISA Hpcidin-25 – EIA 5782 (DRG International Inc USA). Todas as amostras foram dosadas em duplicata. Sensibilidade analítica: 0,153 ng/mL, reprodutibilidade intraensaio: CV: 5,3% a 5,7% e sensibilidade entre ensaios: CV 9,5% a 14,35%. As amostras foram coletadas após o jejum noturno de pelo menos 8 horas. Foram seguidas as orientações do fabricante. Valores de referência: 1,49-41,46 ng/mL.

As dosagens de TNF- α foram realizadas pelo Kit TNF- α Quantikine HS Elisa (R&D Systems, Mineapolis, MN) código HSTA00E, em duplicata. Sensibilidade analítica 0,022 pg/mL, reprodutibilidade intraensaio: 1,9% a 2,2% e reprodutibilidade entre os ensaios: 6,2% a 6,7%. Foram seguidas as orientações contidas no manual fornecido pelo fabricante. Valores de referência: TNF- α : 0,753-166 pg/mL.

As dosagens de IL-6 foram realizadas utilizando o kit IL-6 Quantikine HS Elisa (R&D Systems, Mineapolis, MN), código HS600B, em duplicata. Sensibilidade analítica: 0,039 pg/mL, reprodutibilidade intraensaio: 6,9% a 7,8% e reprodutibilidade entre os ensaios: 6,5% a 9,6%. Foram seguidas as orientações contidas no manual fornecido pelo fabricante. Valores de referência: IL-6: 0,447-9,96 pg/mL.

Foi considerado hiperferritinemia valores superiores a 200 ng/mL em mulheres e 300 ng/mL em homens^{16,29}.

A exclusão de outras causas de hepatopatias é realizada na rotina do ambulatório de Gastroenterologia que inclui: dosagens de ceruloplasmina, cobre sérico, anticorpos anti-citosol hepático, anti-célula parietal, anti-mitocôndria, anti-microsoma de fígado e rim (Anti LKM-1), alfa 1 anti-tripsina, alfafetoproteína e sorologias para hepatites virais (A, B e C) e avaliação suplementar como: fosfatase alcalina, albumina, INR, bilirrubina total e frações, proteína C reativa (PCR).

3.6 Estudo Molecular

3.6.1 Pesquisa de mutações para hemocromatose hereditária

A pesquisa das mutações para hemocromatose foram avaliadas em todos os pacientes com hiperferritinemia associada à elevação de saturação de transferrina acima de 45% para mulheres e 55% para homens, ou níveis de ferritina acima de 500 ng/mL independente da saturação de transferrina. As mutações avaliadas foram: C282Y, H63D e S65C, no gene HFE⁸⁹.

Pacientes com mutações do gene HFE C282Y, tanto em homo quanto em heterozigose, e H63D em homozigose foram excluídos do projeto, por terem sobrecarga de ferro com causa distinta dos pacientes com SDDF. Já os pacientes com mutação H63D em heterozigose foram incluídos no estudo.

Os exons 2 e 4 foram amplificados através de reação de polimerase em cadeia (PCR) utilizando primers sense e antisense (exon 2 5'GGTGTGTGGAGCCTCAACAT 3'e 5'AGCTCTGACAACCTCAGGAA 3'; exon 4 5'AGTTCCAGTCTCCTGGCAA 3'e 5'AGCTCCTGGCTCATCAGT 3'). As amostras foram submetidas a 95°C por 2 minutos, seguidos de 35 ciclos de

94 °C por 30 segundos, 56 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto; e uma extensão final a 72 °C por 5 minutos. A amplificação dos fragmentos foi verificada em gel de agarose a 2%. Os produtos da PCR foram submetidos à purificação enzimática e posteriormente a sequenciamento automático. Esta análise foi realizada no laboratório de biologia tumoral da hematologia.

3.6.2 Identificação das subunidades da ferritina através da expressão dos genes das cadeias leve e pesada da ferritina por reação em cadeia da polimerase em tempo real

3.6.2.1 Coleta do sangue e preparação de RNA

Coleta de Leucócitos de Sangue Periférico

Foram coletados 2,5 mL de sangue total, dos pacientes em tubos, sistema a vácuo *PAXGene Blood RNA* 16X100 mm (Beckton e Dickson- cód 762165), específico para RNA, pois destina-se à coleta, armazenamento e transporte de sangue, contendo estabilizante que conserva o RNA intracelular do sangue total humano, que tem a função de estabilizar a transcrição gênica *in vivo*, reduzindo a degradação do RNA *in vitro*, eliminando e minimizando a indução gênica, permitindo a detecção e quantificação rigorosa das cópias de genes.

Após coleta, o sangue foi homogeneizado, invertendo o tubo por 10x, com a solução estabilizante e conservadora, com volume de 6,9 mL contida no interior do tubo, e em seguida, o mesmo permanece em temperatura ambiente (18 °C - 25 °C), por duas horas, após a coleta e decorridos este tempo, são armazenados em freezer -20 °C, até o momento da extração do RNA total, com kit específico.

3.6.2.2 Extração do RNA total

Os tubos PAXgene foram removidos do freezer -20 °C, e descongelados por duas horas, em temperatura ambiente (18 °C - 25 °C) e após o descongelamento, os tubos foram invertidos cuidadosamente por 10 vezes antes da etapa de extração do RNA. total, garantindo assim a lise das células vermelhas.

Após esta etapa, o RNA total foi extraído com o kit específico PAXgene®Blood RNA Tubes - Cód 762174 (Qiagen - Alemanha), seguindo o manual de purificação do fabricante para extração do RNA para sangue total humano, conforme descrito a seguir:

1. O tubo PAXgene foi centrifugado por 10 minutos a 5.000x g em temperatura ambiente (15 °C - 25 °C) e após centrifugação, o sobrenadante foi descartado cuidadosamente e o *pellet*, ressuscitado com 4 mL de água livre de nucleases e efetuando a troca de uma nova tampa do tubo PAXgene.
2. Em seguida, o *pellet* foi dissolvido em vórtex e centrifugado por 10 min a 5.000x g em temperatura ambiente (15 °C - 25 °C), descartando em seguida o sobrenadante.
3. Após, o *pellet* foi ressuscitado com 350 µL de tampão BR1 e dissolvido por vórtex, e transferido para um tubo eppendorf estéril de 1,5 mL, adicionando 300 µL do tampão de ligação (BR2) e 40 µL de proteinase (PK), homogeneizando por vortex por 5 seg. incubando o tubo por 10 min a 55 °C com agitação 400 rpm - 1400 rpm.

4. Após esta etapa, o lisado foi pipetado dentro da coluna lilás PAXgene *Shredder spin* (PSC) e centrifugado por 10 min, 14.000x g.
5. Após o sobrenadante é transferido para um tubo eppendorf 1,5 mL e foi acrescentado 350 µL de Etanol PA, misturado por vórtex e centrifugado por dois segundos a 1000x g, para remoção de bolhas.
6. Em seguida, foi pipetado 700 µL da amostra dentro da coluna PAXgene RNA Spin (PRC red), centrifugado por 1 minuto a 10.000x g, descartando o tubo que continha o sobrenadante e iniciando as etapas de lavagens com o tampão (BR3), adicionando 350 µL dentro da coluna PRC, centrifugado a mesma por um minuto a 10.000x g e após, foi descartado o tubo contendo o sobrenadante. Esta etapa foi realizada por duas vezes, porque a coluna suporta no máximo 700 µL.
7. Após esta etapa, a coluna foi submetida a tratamento com DNase, com 80 µL de uma solução contendo a DNase com tampão de digestão, que foi pipetada diretamente no centro da membrana da coluna PRC, deixando atuar por quinze minutos a temperatura ambiente (20 °C - 30 °C).
8. Decorrido este tempo, foi acrescentado na coluna PRC, 350 µL do tampão de lavagem BR3, centrifugando por um minuto 10.000x g, descartando o tubo, contendo o sobrenadante.
9. A seguir, foi adicionado um volume de 500 µL do tampão de lavagem BR4 na coluna PRC, centrifugado por 1 minuto a 10.000x g e após, foi descartado o tubo contendo o sobrenadante

e repetido a mesma lavagem com tampão BR4, por 3 minutos a 10.000x g, descartando o tubo contendo o sobrenadante.

10. Finalizando esta etapa de lavagem, a coluna PRC, foi centrifugada novamente, por 1 minuto a 10.000x g, com a finalidade de remover todo o resíduo de etanol na mesma.
11. Após o RNA foi eluído com 40 µL de água livre de nucleases, introduzido diretamente na membrana da coluna PRC e centrifugado por 1 minuto a 10.000x g. O RNA foi repassado novamente na coluna, para garantir a eficiência da eluição.
12. Em seguida, o RNA eluído, foi deixado por cinco minutos a 65 °C no incubador, sem agitação e decorrido este tempo, colocado diretamente no gelo e estocado em -70 °C, até momento do uso.

3.6.2.3 Avaliação da qualidade, quantificação do RNA total

As amostras do RNA total, foram avaliadas quanto a sua qualidade e quantificação por espectrofotometria, em -NanoDrop ND-2000 (A260/A280 e A260/230) (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA).

Foi utilizado 1 µL de cada amostra para avaliar o grau de pureza e qualidade e os valores obtidos, compreenderam entre 2,0 e 2,1 e quanto a quantificação, foram obtidos valores satisfatórios.

3.6.2.4 Avaliação da integridade das amostras do RNA total

A integridade das amostras foi avaliada, através do kit RNA 6000 Nano da Agilent Technologies (Waldbronn, Alemanha), no equipamento Bioanalyzer 2100, aferindo se a amostras estavam sem contaminação com DNA genômico e adequadas para o processamento da expressão gênica. A integridade das amostras é dada pelo valor do RIN (*RNA integrity number*, que varia em ordem crescente de integridade de 0 a 10. Todas as amostras apresentaram o valor do RIN satisfatórios para a realização dos ensaios, evidenciando boa qualidade do método de extração do RNA total e a maioria com $RIN \geq 8,0$. A Figura 2 demonstra o eletroferograma de uma das amostras.

Figura 2 - Eletroferograma. Eletroferograma de uma das amostras de RNA total, realizado no Bioanalyzer evidenciando alta qualidade, demonstrado pelo valor do *RNA integrity number* (RIN) = 9,1 identificando as bandas ribossomais 18S e 28S

3.6.2.5 Reação transcrição reversa e expressão dos genes alvos por qRT-PCR

Foram realizados a reação da transcrição reversa, de 50 indivíduos, sendo 34 que apresentavam hiperferritinemia (HF) e 16 com Ferritina normal (FN), utilizando o kit comercial *High Capacity -RNA-to cDNA-* PN 4375575 (Applied Biosystems, EUA), em tubos de *ependorf* de 0,2 mL, livre de nucleases, numa concentração final de 100 ng do RNA total. Foi preparada uma solução do mastermix no gelo, com os seguintes componentes: 2,0 µL do RT *buffer* (10x); 0,8 µL dNTP mix(25x) 100mM; 2,0 µL *Random Primers*(10x); 1,0 µL *multiScribe Reverse Transcriptase* e 4,2 µL água livre de nucleases. A reação da transcrição reversa consistiu em: 10 µL do mastermix, descrito acima e 10 µL da amostra do RNA, com volume final de 20 µL e foi processada no Termociclador Veriti® (Applied Biosystems), com as seguintes condições de ciclagem: 25 °C por dez minutos; 37 °C por 120 minutos; 85 °C por 5 minutos, finalizando a 4 °C, de acordo com o protocolo do fabricante.

Após processamento do cDNA, as amostras foram armazenadas em freezer -20C, até momento do uso.

Para a reação da expressão gênica, foram utilizados ensaios TaqMan inventoriados e específicos, com os seguintes genes endógenos GAPDH (lote 1600800) e β -actina Hs01060665-ACTB (lote 1578326) e dois genes alvos (FTH1 - Hs01694011_s1- lote 1568403 e FTL- Hs00830226_gH- lote 1608403).

A reação da PCR em tempo real, foi processada no equipamento StepOne Plus Real Time System (Applied Biosystem- Foster City, CA, EUA) em duplicata, utilizando placas MicroAmp™ Fast 96-Well Reaction Plate with Bar

Code (PN 4346906), sendo 10 µL do mastermix,; 1 µL *primer* ; 7 µL água livre de nucleases e 2 µL da amostra do cDNA, com volume final de 20 µL. A placa foi selada com adesivo óptico, dando spin para homogeneizar e após a mesma foi introduzida no StepOne Plus, com a seguinte ciclagem: 50 °C por dois minutos; 95 °C por 10 min; 40 ciclos de quinze segundos a 95 °C e um minuto à 60 °C.

Os resultados da expressão foram analisados pelo método de quantificação relativa (*Ct cycle threshold*) com normalização pelo valor médio dos dois genes de controle endógeno, *GAPDH* e *ACTB*, utilizando-se a fórmula:

$$\Delta Ct = Ct \text{ gene alvo} - \text{média do Ct dos genes endógenos } GAPDH \text{ e } ACTB^{90}$$

Sendo que o Ct do gene-alvo e Ct do controle endógeno, correspondem à média dos valores do Ct das duplicatas. Após o cálculo, foi utilizada a fórmula de expressão normalizada: $2^{-\Delta Ct}$ e para a realização do cálculo da expressão $2^{-\Delta\Delta Ct}$, foi utilizada a média dos controles, com ferritina normal.

3.7 Biópsia Hepática

Os pacientes foram incluídos no projeto após realização de biópsia hepática para investigação de DHGNA. A biópsia hepática foi utilizada para diagnóstico histológico de DHGNA e quantificação hepática de ferro. Os fragmentos de tecido hepático analisados foram fixados em formol salino a 4% e submetidos a colorações hematoxilina-eosina (HE), Tricrômio de Masson, Perls para pigmentos e impregnação com Sais de Prata (Reticulina). Foi

utilizado o sistema de classificação histológica NASH CRN (esteatose 0-3, inflamação lobular 0-3, balonização hepatocelular 0-2, inflamação 0-4, fibrose 0-4)⁹¹ A classificação de ferro foi dada em cinco estágios, graus 0 a 4, de acordo com a coloração de Perls, sendo relatado qual o local de depósito, hepatocelular (HC), sistema reticuloendotelial (SRE) ou portal.

A indicação de biópsia foi baseada no consenso da sociedade brasileira de hepatologia já citado previamente. As biópsias foram avaliadas em dois momentos, primeiramente pelo grupo de fígado da patologia do HC-FMUSP e em um segundo momento as lâminas foram reavaliadas por uma única patologista. Comparando as duas análises houve uma boa correlação entre elas, dando credibilidade ao resultado obtido. Os valores utilizados foram os da análise realizada por uma única patologista em um único momento. Os resultados da análise de comparação estão detalhados na Tabela 1.

Tabela 1 - Concordância entre avaliações histológicas

			1ª avaliação			
			Esteatose	Balonização	Inflamação	Siderose
2ª avaliação	Esteatose	Coeficiente de correlação	,770**			
		Sig. (p)	,000			
		n	67			
	Balonização	Coeficiente de correlação		,882**		
		Sig. (p)		,000		
		n		67		
	inflamação	Coeficiente de correlação			,787**	
		Sig. (p)			,000	
		n			67	
	Siderose	Coeficiente de correlação				,704**
		Sig. (p)				,000
		n				67

3.8 Ressonância Magnética

Os pacientes foram submetidos à exame de ressonância magnética de abdome superior com contraste. A sequência específica para quantificação do depósito de ferro foi uma técnica gradiente echo com 8 tempos de echo (TE), intervalo de 1,2 ms entre cada TE, e TE inicial de 1,2 ms, utilizando aparelho de 3T com bobina de superfície dedicada (Philips Medical Systems, Leeds, The Netherlands) e sem pulso de saturação de gordura.

O intervalo de tempo entre a biópsia e a realização da RM não excedeu 6 meses. Todos os exames foram realizados no Instituto de radiologia do HC-FMUSP e analisados por um único radiologista.

3.8.1 Parâmetros da RM

Foi utilizada uma sequência Multiecho spoiled gradient echo 2D, com TR de 200ms, sendo 8 TE's espaçados com intervalos de 1,2 ms (TE inicial de 1,2 ms), com Flip angle de 20 graus, matrix de 256 x 256, espessura de 8mm (gap de 0 mm) e Bandwidth de 1000 Hz/pixel. A sequência dura cerca de 15 segundos e é obtida em uma apneia.

3.8.2 Análise da imagem

A análise foi feita por um radiologista especialista na parte de abdome, com experiência de 13 anos nesta área. O pós-processamento das imagens foi feito por um software dedicado (Dive-In - Magnepath® - Perth, Austrália), sendo mensuradas as concentrações de gordura (em porcentagem) e de $R2^*$ (em s^{-1}) em uma mesma região de interesse oval, colocada no aspecto posterior do lobo hepático direito, em uma tentativa de obter a região geralmente amostrada na biópsia. Foi ainda realizada uma região de interesse envolvendo toda a área do fígado em um corte de ressonância, no intuito de se obter uma melhor correlação com o conteúdo de ferro corporal. A Figura 3 exemplifica as áreas de análise.

Figura 3 - Medida de $R2^*$ e gordura no ROI e no fígado como um todo

Foi utilizada uma técnica de pós-processamento da imagem que quantifica o valor de $R2^*$, corrigindo a influência da gordura no fígado⁸¹. A presença da gordura hepática determina que a queda anárquica do sinal no

parênquima nos múltiplos tempos de echo, isto acontece devido a presença de vários tipos de triglicerídeos com tempos de precessão distintos, principalmente em pacientes com esteatose significativa, influenciando o sinal final do parênquima de maneira heterogênea⁷⁸. O pós-processamento considera uma curva de decaimento oscilatória dependente da presença de esteatose, retirando a influência da mesma sobre o cálculo de $R2^*$. Para se retirar esta influência, foi necessário calcular, da mesma forma, o grau de esteatose no fígado, logo a sequência retorna não apenas o valor de $R2^*$, mas também a porcentagem de esteatose, ambos com valores corrigidos para a influência deletéria do outro^{76-78,80,81}.

3.9 Análise Estatística

Foram digitados os dados no programa Excel e posteriormente exportados para o programa SPSS v19.0 (IBM SPSS, Brazil) para análise estatística. Todas as variáveis numéricas foram avaliadas pelo teste Kolmogorov-Smirnov, sendo verificado que elas não aderem à normalidade. Baseado neste dado foi optado por utilizar testes não paramétricos. As variáveis categóricas descritas por frequências e percentuais e comparadas pelo teste de Qui-quadrado. As variáveis numéricas foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney quando separado pelos grupos de siderose e pelo teste de Kruskal Wallis quando separados pelos grupos de ferritina. As diferenças foram localizadas pelo teste post hoc de Tukey.

A expressão das subunidades da ferritina foi normalizada com a média dos genes endógenos biológicos escolhidos (GAPDH e ACTB). As

expressões normalizadas em relação ao endógeno foram testadas no teste de normalidade e ambas rejeitaram. As comparações da expressão das subunidades da ferritina foram feitas com testes não paramétricos, Teste de Wilcoxon, no programa JMP.

As variáveis quantitativas foram correlacionadas pelo coeficiente de correlação de Spearman. Foi considerado um nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Casuística

No período de setembro de 2013 a novembro de 2016 foram avaliados 152 pacientes que realizaram biópsia hepática com diagnóstico de DHGNA. Destes 85 não eram candidatos ao estudo de acordo com os critérios de inclusão/exclusão do estudo. As principais razões para exclusão foram o não acompanhamento no serviço, recusa em participar do projeto, doença autoimune ativa em uso de imunossupressores (artrite reumatoide, espondilite anquilosante e lúpus eritematoso sistêmico), mutação C282Y positivo em heterozigose, neoplasia ativa, medicações hepatotóxicas e DM2 descompensado. A amostra totalizou 67 pacientes.

Os pacientes foram estratificados de duas formas (Figura 4):

- a) De acordo com a presença ou ausência de siderose na biópsia, independente dos níveis de ferritina.
- b) De acordo com os níveis de ferritina em três subgrupos de análise: FN, HFD e SDDF.

Figura 4 - Fluxograma da seleção dos casos

4.2 População do Estudo

Na Tabela 2 estão descritos os dados clínicos, antropométricos, laboratoriais e histológicos dos participantes do estudo. Pode-se observar que houve predomínio de participantes do sexo feminino, portadores de obesidade grau 1 com média de idade de 52 anos.

Tabela 2 - Dados clínicos, antropométricos, laboratoriais e histológicos

	Amostra completa	Homens n 26 (39%)	Mulheres n 41 (61%)	p
Idade (anos)	52,2±11,8	49±12	54±11	0,117
IMC (kg/m²)	31,7±4,8	30±4	32±5,2	0,181
CA (cm)	103,7±11	105±11	103±11	0,381
CP(cm)	40,5±6,2	42±3	38±3	<0,001
DM2 n(%)	26 (39)	7(27)	19(46)	0,183
HAS n(%)	33(49)	11(42)	22(53)	0,513
Glicose (mg/dl)	105±21	104±15	106±24	0,797
Insulina (mg/dL)	20,9±7	20,8±9	21±6	0,669
Homa ir	5±3	5±3	5,1±3	0,632
CT (mg/dL)	181±40	170±39	187,5±40	0,061
HDL (mg/dL)	45±12	39±12	48,6±12	0,003
TG (mg/dL)	163±133	174±196	155,8±71	0,131
ALT (U/L)	55,6±41	48±24	60,5±48	0,507
AST (U/L)	38,3±23	32±13	42,5±27	0,210
Gama GT (U/L)	106,4±140	109±178	104,4±112	0,875
AU (mg/dL)	5,3±1,2	6±1	5±1,2	0,022
Ferritina (ng/mL)	377±379	549±360	267,6±352	<0,001
ST (%)	30,3±10	34±9	28,1±10,3	0,015
Ferro (µg/dL)	96,3±10	100±25	93,5±30	0,306
Hepcidina	32,78±18	42,3±14	26,04±17	0,001
IL-6	2,97±2	2,53±2,3	3,28±1,7	0,051
TNF-α	1,36±0,43	1,23±0,37	1,46±0,4	0,076
Histologia:				
Esteatose (n/%)				
1	15(22,5)	8(31)	7(17)	0,395
2	25(37,3)	8(31)	17(41,5)	
3	27(40,2)	10(38)	17(41,5)	
Inflamação (n/%)				
0	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	NA
1	28(41,8)	15(57,6)	13(31,7)	
2	36(53,7)	11(42,4)	25(60,9)	
3	3(4,5)	0(0,0)	3(7,4)	
Balonização				
0	2 (3,0)	1(3,8)	1(2,5)	NA
1	31(46,3)	17(65,4)	14(34,1)	
2	34(50,7)	8(30,8)	26(63,4)	
Fibrose				
0	1(1,5)	0(0,0)	1(2,5)	NA
1-2	30(44,7)	16(61,5)	14(34,1)	
3-4	36(53,8)	10(38,5)	26(63,4)	
NAS				
< 5	19(28,3)	11(42,3)	8(19,5)	0,082
≥ 5	48(71,7)	15(57,7)	33(80,5)	
Siderose				
0	32(47,8)	4(15,4)	28(68,3)	NA
1	20(29,8)	10(38,5)	10(24,3)	
2	12(18,0)	9(34,6)	3(7,4)	
3	3(4,4)	3(11,5)	0(0,0)	

IMC: índice de massa corporal; CA: circunferência abdominal; CP: circunferência de pescoço; DM2: diabetes tipo 2; HAS: Hipertensão arterial sistêmica; CT: Colesterol total; HDL: lipoproteína de alta densidade; TG: Triglicerídeos; AST: Aspartato aminotransferase; ALT: Alanina aminotransferase; Gama gt: Gamaglutamiltransferase; AU: ácido úrico; ST: saturação de transferrina; TNF-α: fator de necrose tumoral alfa; IL6: interleucina 6 NA não aplicável

4.3 Parâmetros Metabólicos e Inflamatórios de Acordo com os Níveis de Ferritina e Siderose

Na Tabela 3 estão dispostas as características clínicas, antropométricas e histológicas de acordo com a estratificação dos grupos quanto a presença de siderose e os níveis de ferritina. Houve predomínio de homens no grupo de SDDF e siderose positiva. O HDL foi significativamente menor no grupo com SDDF e siderose positiva. Não houve diferença nos outros parâmetros metabólicos de acordo com os níveis de ferritina e depósito de ferro. No entanto o grupo com siderose positiva na biópsia teve níveis de marcadores inflamatórios significativamente menores do que o grupo com siderose negativa. Não houve diferença de acordo com os níveis de ferritina.

Tabela 3 - Características demográficas e laboratoriais da população estudada de acordo com os níveis de ferritina e depósito de ferro

Variáveis	FN	HFD	SDDF	p	Sid -	Sid +	p
Sexo F: (N/%)	25 (80,6)	9 (81,8)	7 (28,0)	<0,001	28 (87,5)	13(37)	<0,001
Sexo M: (N/%)	6 (19,4)	2 (18,2)	18 (72,0)		4(12,5)	22(63)	
Idade (anos)	54±11	48,9±16	51,8±9,8	0,426	50±12	51±11	0,421
IMC (kg/m²)	32±5	30±3,8	31,1±4,5	0,622	32,1±5	31±4	0,763
CA (cm)							
M	103±16	103±4	106±11	na	106±7	105±11	na
F	105±12	99±12	100±8	0,533	104±13	100±7	0,392
CP (cm)							
M	42±4	42±1	42±4	na	43±2	42±4	na
F	38±4	37±4	38±2	0,428	38±4	38±3	0,836
NCEP ATPIII	2,9±1,2	2,3±1,6	2,7±1,2	0,496	2,85±1,4	2,68±1,2	0,539
N(%)	15(48,3)	5(45,4)	13(52)	0,598	18(56)	15(42,8)	0,474
DM (%)	51,6	36,3	24	0,107	50	28,5	0,122
HAS (%)	54,8	54,5	40	0,598	59,3	40	0,180
Ferritina (ng/mL)	131±70	332±155	701±436	<0,001	185±149	551±439	<0,001
ST (%)	28±11	28±6,5	34±9,7	0,063	27±10	34±9	0,004
Ferro (µg/dL)	89,5±30	97,7±3	103±28	0,204	92,8±31	99,5±26	0,430
Hepcidina	18,35±14	26,9±8	76,6±12	<0,001	20,7±13	44,8±13	<0,001
IL-6	3,54±1,8	2,79±1,6	2,58±2,3	0,342	3,28±1,6	2,67±2,3	0,035
TNF-α	1,3±0,3	1,65±0,4	1,31±0,48	0,117	1,45±0,3	1,28±0,4	0,065
AST (U/L)	34,2±19	36,9±13	43,8±28	0,288	37,5±18	39±26	0,813
ALT (UL)	44,6±28	62,8±43	65,8±49	0,081	54,2±36	57±45	0,990
Gama gt (U/L)	84±113	128±82	125±187	0,482	111±116	101±161	0,299
Glicose (mg/dl)	107±24	102±19	104±18	0,887	107±22	104±20	0,551
Insulina (µU/L)	20,5±6	20±7	21,7±9	0,971	21,3±6,5	20,4±8	0,321
HOMA IR	5±3	5±2,3	4,7±3	0,938	5,5±2,8	4,65±3,3	0,148
HOMA Beta	64,9±19	68,29±31	72,6±29	0,823	68,8±22	68,1±28	0,682
A1C (%)	6±0,8	5,9±0,9	5,8±0,8	0,685	6±0,7	5,86±0,9	0,372
CT (mg/dL)	175±35	194±35	182±47	0,375	184±36	178±43	0,327

Continua

Conclusão						
Variáveis	FN	HFD	SDDF	p	Sid -	Sid + p
LDL (mg/dL)	107±31	111±36	105±39	0,901	108±31	106±38 0,856
HDL(mg/dL)						
M	3(50)	0(0,0)	10(55,5)	na	1(25)	12(54,5) 0,587
	42±15,9	48,5±9	37±11,3	na	50,5±16,2	37±10,7 na
n (%)						
F	12 (48%)	5(55)	6(85,7)	na	14(50)	9(69,2) 0,414
	47,9±11	52±15	46±13	0,595	48±13	48±9,8 0,750
TG (mg/dL)	129±47	168±93	201±198	0,486	153±65	171±174 0,280
AU (mg/dL)	5,1±1,3	5,0±1,2	5,7±1,1	0,577	5,0±1,3	5,6±1,1 0,194
Histologia						
Esteatose (n/%)						
1	8(25,8)	2(18,2)	5(20)	na	7(21,9)	8(22,8) 0,995
2	10(32,3)	6(54,5)	9(36)		12(37,5)	13(37,2)
3	13(41,9)	3(27,3)	11(44)		13(40,6)	14(40)
Inflamação (n/%)						
1	13(41,9)	3(27,3)	12(48)	na	11(34,4)	17(48,6) na
2	15(48,4)	8(72,7)	13(52)		18(56,2)	18(51,4)
3	3(9,7)	0(0,0)	0(0,0)		3(9,4)	0(0,0)
Balonização						
0	1(3,2)	0(0,0)	1(4,0)	na	1(3,1)	1(2,8) na
1	15(48,4)	4(36,4)	12(48)		11(34,4)	20(57,2)
2	15(48,4)	7(63,6)	12(48)		20(62,5)	14(40)
Fibrose						
0	1(3,2)	0(0,0)	0(0,0)	na	0(0,0)	1(2,8) na
1-2	14(45,2)	4(36,4)	12(48)		11(34,4)	19(54,3)
3-4	16(51,6)	7(63,6)	13(52)		21(65,6)	15(42,9)
NAS						
< 5	10(32,2)	2(18)	7(28)	0,672	6(18,8)	13(37,2) 0,135
≥ 5	21(67,8)	9(82)	18(72)		26(81,2)	22(62,8)
Siderose						
0	21(67,7)	11(100)	0(0,0)	na	32(100)	0(0,0) na
1	8(25,8)	0(0,0)	12(48)		0(0,0)	20(57,2)
2	2(6,5)	0(0,0)	10(40)		0(0,0)	12(34,2)
3	0(0,0)	0(0,0)	3(12)		0(0,0)	3(8,6)

O grupo com siderose positiva na biopsia tinha níveis significativamente maiores de ferritina e saturação de transferrina.

O Gráfico 1 demonstra a distribuição dos níveis de ferritina entre os grupos, discriminando o gênero dos pacientes. A mediana está marcada no gráfico com uma barra. As mulheres apresentaram níveis de ferritina mais baixos que os homens, por isso a separação por sexo se torna necessária.

Gráfico 1 - Mediana da ferritina

Foi realizada a análise de um ponto de corte do nível de ferritina para detecção de depósito de ferro hepático, evidenciou-se o valor 180,4 ng/mL para mulheres, com sensibilidade de 76,9% e especificidade de 64,3 % (Gráfico 2), e 350,7 ng/mL, para os homens, com sensibilidade de 72,7% e especificidade de 75,5 % (Gráfico 3).

Gráfico 2 - Curva ROC relacionando os valores de ferritina com siderose no sexo feminino

Gráfico 3 - Curva ROC relacionando os valores de ferritina com siderose no sexo masculino

Foram observadas discretas concentrações de ferro em 35 biópsias da amostra, correspondendo a 52,2%. Este dado é consistente com outros estudos realizados nesta população, que relata presença de ferro em 35% a 50% das biópsias realizadas por DHGNA^{3,92,93}. Destes 35 pacientes, 25 tiveram o diagnóstico de SDDF conforme os valores de ferritina estabelecidos pela maioria dos estudos^{16,29}. O grupo de 10 pacientes com ferritina considerada normal e siderose predominantemente grau 1 na biópsia, foi constituído por quatro homens (ferritina média: 202 ng/mL) e seis mulheres (ferritina média: 159 ng/mL).

A distribuição do depósito de ferro foi considerada mista, ou seja, ocorreu tanto no SRE quanto no HC em 91% da amostra. Em dois pacientes com siderose grau 3 de padrão misto, foi observado também siderose no espaço portal. Dados demonstrados no Gráfico 4

Gráfico 4 - Distribuição do depósito de ferro hepático

HC: Hepatocelular; SRE: Sistema retículoendotelial

Não foi encontrada correlação entre os níveis de ferritina e severidade histológica da DHGNA, como demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4 - Correlação da ferritina sérica com itens da análise histológica

		Ferritina
Grau de Esteatose	Coeficiente de correlação	,066
	Sig.(p)	,594
	n	67
Balonização	Coeficiente de correlação	,018
	Sig.(p)	,888
	n	67
Inflamação	Coeficiente de correlação	-,095
	Sig.(p)	,445
	n	67
NAS	Coeficiente de correlação	-,018
	Sig.(p)	,882
	n	67

4.4 Analise das Subunidades de Ferritina

A avaliação do comportamento das subunidades de ferritina resultou em correlação positiva entre as mesmas. Não houve diferença da expressão das subunidades de ferritina quanto a presença ou ausência de siderose na biópsia. Os Gráficos 5 e 6 ilustram o comportamento das subunidades segundo a presença ou ausência de siderose.

Gráfico 5 - Expressão de FP e siderose hepática **Gráfico 6 - Expressão de FL e siderose hepática**

Foi analisada a correlação entre as subunidades de ferritina com os parâmetros metabólicos e histológicos. Houve uma correlação positiva entre a fração leve e a circunferência abdominal e o número de componentes da síndrome metabólica. A FP se correlacionou com o grau de esteatose. Não houve correlação das subunidades com dos marcadores inflamatórios,

hepcidina, RI ou glicemia. Houve uma expressão semelhante das subunidades independentemente das características histológicas (balonização, inflamação, esteatose, fibrose e NAS). A correlação entre a expressão das subunidades e as variáveis estão descritas na Tabela 5 e Gráficos 7 e 8.

Tabela 5 - Expressão das subunidades de ferritina

		Spearman p	p
Expressão FL	Expressão FP	0,4079	0,0030*
CA	Expressão FP	0,2331	0,1108
CA	Expressão FL	0,2922	0,0439*
CP	Expressão FP	0,1128	0,4660
CP	Expressão FL	0,1391	0,3679
HOMA IR	Expressão FP	0,0152	0,9164
HOMA IR	Expressão FL	0,1407	0,3299
Glicemia	Expressão FP	0,0597	0,6771
Glicemia	Expressão FL	-0,1617	0,2571
NCEP ATP III	Expressão FP	0,0615	0,8778
NCEP ATP III	Expressão FL	0,3628	0,0113*
Hepcidina	Expressão FP	0,0215	0,8874
Hepcidina	Expressão FL	0,0375	0,8046
TNF- α	Expressão FP	0,1742	0,2469
TNF- α	Expressão FL	0,216	0,0917
IL-6	Expressão FP	0,0761	0,6151
IL-6	Expressão FL	0,1953	0,1934
Ferritina	Expressão FP	-0,0627	0,6619
Ferritina	Expressão FL	0,0352	0,8062
Grau de esteatose	Expressão FP	0,3534	0,0137*
Grau de esteatose	Expressão FL	0,0071	0,9619

FL: subunidade leve da ferritina; FP: subunidade pesada da ferritina CA: circunferência abdominal

Gráfico 7 - Expressão de FL e Circunferência abdominal

Gráfico 8 - Expressão de FL e Síndrome metabólica

4.5 Avaliação dos Níveis de Hecpidina

A hepcidina foi significativamente mais elevada no grupo com SDDF, sendo seu valor médio de 46,69 ng/mL. Os valores estão descritos no Gráfico 9. A hepcidina se correlacionou tanto com o conteúdo de ferro quanto com o padrão inflamatório, sendo mais elevada no grupo HFD do que no grupo de FN.

O grupo com siderose positiva na biopsia apresentou níveis significativamente maiores de hepcidina que o grupo sem siderose na biópsia com o demonstrado no Gráfico 9. Foi realizada a análise de um ponto de corte do nível de hepcidina para detecção de depósito de ferro hepático, foi evidenciado o valor 30,2 ng/mL, com sensibilidade de 87% e especificidade de 82%. AUROC 0,896. Dado demonstrado no Gráfico 10.

Gráfico 9 - Valores de hepcidina de acordo com os grupos de ferritina e siderose

Gráfico 10 - Valor do ponto de corte da hepcidina (ng/mL)

4.6 Avaliação do Conteúdo de Ferro pela Ressonância Magnética

A medida de $R2^*$ se correlacionou positivamente com o conteúdo de ferro evidenciado pela análise histológica, sendo mais elevada nos pacientes com SDDF e naqueles com siderose positiva. Os valores estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6 - Parâmetros da RM medidos no ROI e no fígado inteiro

Média±DP	FN	HFD	SDDF	p*	Sid -	Sid +	p**
$R2^*$ (Fígado inteiro)	53,16 ±9,19	60,26 ±14,63	89,09 ±35,44	<0,001	54,47 ±11,91	79,45 ±33,52	<0,001
$R2^*$ (ROI)	54,17 ±8,7	61,41 ±18,09	87,77 ±32,22	<0,001	55,97 ±13,06	78,42 ±8,73	<0,001
% Gordura (Fígado inteiro)	13,33 ±6,5	17,82 ±10,89	17,77 ±8,84	0,091	15,51 ±8,33	15,86 ±8,51	0,701
% Gordura (ROI)	13,71 ±7,14	17,58 ±11,15	17,28 ±11,15	0,284	16,02 ±8,73	15,33 ±8,73	0,772

p*: teste de Kruskal-Wallis; p** Teste de Mann-Whitney

Houve o aumento progressivo do valor de $R2^*$ de acordo com o grau de siderose conforme descrito na Tabela 7.

Tabela 7 - Valores de $R2^*$ e porcentagem de gordura no ROI, segundo o grau de siderose

		Siderose			Teste de Kruskal-Wallis (p)
		0	1	2/3	
$R2^*$ (ROI) s^{-1}	Média	54,47	72,53	88,22	<0,001*
	Mediana	54,00	59,30	78,50	
	Desvio-padrão	11,91	33,93	31,94	
	n	30	19	15	
% Gordura (ROI)	Média	15,51	14,10	18,09	0,537
	Mediana	13,00	12,80	17,20	
	Desvio-padrão	8,33	6,47	10,37	
	n	30	19	15	

Foi realizado um ponto de corte a fim de identificar um valor capaz de identificar acúmulos de ferro hepático. O valor encontrado foi de $58,9 s^{-1}$, com sensibilidade de 73,5% e especificidade de 70% e AUROC 0,780 (Gráfico 11).

Gráfico 11 -Curva ROC avaliando o ponto de corte de R2*

A medida de R2* apresentou correlação positiva com os níveis de ferritina sérica (Gráfico 12).

Gráfico 12 - Correlação entre os valores de R2* e ferritina

5 DISCUSSÃO

5.1 Papel da Hiperferritinemia na DHGNA

A relação entre DHGNA, síndrome metabólica e depósito de ferro é tema de vários estudos, sendo a interpretação da hiperferritinemia, tão frequente nestes pacientes, um grande desafio. A elevação dos níveis de ferritina pode refletir tanto o estado inflamatório característico desta população, quanto um real acúmulo de ferro, fator de pior prognóstico nestes indivíduos^{1,3,11,26}.

Porém o que ainda não ficou estabelecido foi se o depósito de ferro realmente é o responsável por estes desfechos ou se a hiperferritinemia é reflexo do estado avançado de inflamação que acarreta em aumento de estresse oxidativo, necrose dos hepatócitos, fibrinogênese e desenvolvimento de hepatocarcinoma. Esta é ainda uma grande questão de debate³⁶.

No presente estudo a ferritina se relacionou positivamente com o conteúdo de ferro na biópsia hepática. A ferritina não tem uma relação linear com o conteúdo de ferro, principalmente por sofrer influência de outros fatores, em especial da inflamação. Os valores de ferritina dos pacientes deste estudo foram superiores aos valores geralmente observados em uma população de indivíduos saudáveis, principalmente considerando uma amostra com predomínio feminino. Este dado reforça a influência da inflamação crônica típica destes pacientes com DHGNA nos níveis de ferritina. O ponto de corte do nível de ferritina capaz de identificar discreto

depósito de ferro hepático foi de 180,4 ng/mL em mulheres com uma sensibilidade de 76,9%, especificidade de 64,3%, e 350,7 ng/mL em homens com sensibilidade de 72,7% e especificidade de 75,5%. O valor de corte da ferritina foi inferior ao observado na prática clínica e na literatura. A média de ferritina de pacientes com síndrome metabólica é de aproximadamente 500 ng/dL, porém pode exceder 1000 ng/dL⁹⁴ sendo compatível com os níveis de pacientes com SDDF da presente amostra (média de 572 ng/dL).

A coexistência de inflamação e ferro em um mesmo paciente dificulta o estabelecimento de um ponto de corte mais acurado. Não foi encontrado na literatura nenhum valor de corte para detecção de siderose. A média de ferritina sérica em pacientes com DHGNA, relatada em estudo prévio, foi de 361,8 ng/dL, já a média em população somente com pacientes com SDDF foi de 672 ng/dL^{16,95}.

Acredita-se que o significado deste ponto de corte é que níveis de ferritina acima de 180,4 ng/dL, para mulheres, e 350,7 ng/mL, para homens, devem ser correlacionados com a clínica, investigados e acompanhados, complementados com a saturação de transferrina e não somente ser considerado como uma alteração frequentemente encontrada no paciente com DHGNA, proveniente da inflamação.

A saturação de ferro da amostra foi considerada normal, porém no grupo com siderose este valor se aproximou bastante do limite superior da normalidade, destoando dos outros grupos, indicando uma influência do ferro neste dado laboratorial, e a importância do mesmo na investigação da hiperferritinemia.

A hiperferritinemia foi correlacionada com aumento da mortalidade por todas as causas e um preditor de pior prognóstico metabólico e histológico na população com DHGNA^{11,13}. O recente estudo, no entanto, não foi capaz de encontrar uma relação entre os níveis de ferritina e piora metabólica ou histológica. Uma possível razão para este achado pode estar na seleção dos pacientes que compuseram a amostra do estudo. Todos os pacientes foram selecionados a partir da realização da biópsia hepática, sendo um possível viés de seleção, uma vez que são realizadas biópsias somente nos pacientes com alterações metabólicas descontroladas e elevação persistente de enzimas hepáticas.

Outro possível viés de seleção foi relacionado a distribuição dos gêneros entre os grupos propostos. Os pacientes diagnosticados com SDDF foram predominantemente do sexo masculino, totalizando 57%. A amostra teve predomínio feminino, sendo elas mais obesas e com circunferência abdominal proporcionalmente maior que os homens da amostra e sua maior concentração se deu no grupo de FN, tornando um grupo controle com mais características metabólicas que o grupo com SDDF.

A ausência de relação positiva entre depósito de ferro e características da síndrome metabólica (incluindo IMC e HOMA IR) foi descrita previamente por dois grandes estudos^{2,92}, sendo aventada a hipótese de que nesta população específica de pacientes com siderose haveria um mecanismo alternativo de desenvolvimento de DHGNA, provavelmente relacionado ao papel citotóxico do ferro com formação de EROS⁹².

5.2 Subunidades da Ferritina

O presente estudo avaliou a expressão das subunidades de ferritina no sangue periférico, através da avaliação de RNA dos leucócitos. A amostra foi constituída por pacientes com DHGNA e excesso de peso, duas comorbidades que têm como característica um ambiente de inflamação crônica. O objetivo foi avaliar o comportamento das subunidades em pacientes com inflamação crônica em um ambiente de ausência e discreto depósito de ferro hepático.

Pode-se observar a correlação entre as duas subunidades, não havendo predomínio de nenhuma delas. Dado interessante, pois deduzindo que haja uma inflamação crônica, pode-se esperar elevação da subunidade pesada. Talvez esta correlação pudesse ser observada se avaliado diretamente nos hepatócitos, como foi feito no estudo de Leibold *et al.*¹⁵. A opção por dosar no sangue periférico teve a intenção de identificar um método não invasivo de detectar depósito de ferro hepático.

Correlacionando a expressão das subunidades com os dados antropométricos e clínicos, foi encontrada correlação positiva entre FL e número de itens da síndrome metabólica e circunferência abdominal. Esta correlação provavelmente está relacionada a hiperexpressão de FL RNA mensageiro no tecido adiposo de obesos, com o aumento da massa adipocitária maior produção de FL. A contra prova desta relação foi evidenciada pela redução de ambas as subunidades pós cirurgia bariátrica⁹⁶.

Outra associação foi observada entre FP e o grau de esteatose hepática. Foi o único parâmetro histológico a se correlacionar com uma das subunidades. Quanto maior o grau de esteatose maior a expressão da

subunidade pesada. Como não há estudos na literatura comparando achados histológicos com expressão de subunidades de ferritina, este pode ser considerado um dado novo.

Ambas as subunidades são expressas no sangue periférico de pacientes com excesso de peso e DHGNA, mais dados sobre o seu comportamento auxiliam na compreensão da hiperferritinemia associada a DHGNA e SDDF.

5.3 Hepcidina

A hepcidina é o principal regulador do trânsito de ferro corporal, sendo sua análise de grande importância para a melhor compreensão do conteúdo de ferro. Os níveis séricos de hepcidina são mais elevados em indivíduos com SDDF em comparação a indivíduos saudáveis ou com DHGNA sem acúmulo de ferro^{36,46}. O estudo de Rametta *et al.*⁴⁶, mostrou por meio do teste de tolerância oral ao ferro que indivíduos com SDDF têm um índice de resistência a hepcidina maior que indivíduos com DHGNA. Esta hiperexpressão da hepcidina tem um efeito protetor nestes pacientes, evitando um acúmulo de ferro mais severo. Na SDDF o aumento da hepcidina acarreta em uma retenção discreta de ferro no fígado e macrófagos, enquanto que a deficiência da mesma, vista nos pacientes com HH, acarreta em aumento desenfreado da sua absorção intestinal e posterior sobrecarga em grandes órgãos⁴⁶.

A hepcidina sérica não foi dosada pelo método de espectrometria de massa e sim pelo método ELISA, porém os dados da literatura mostram uma boa correlação entre os dois métodos, garantindo uma boa acurácia, mesmo em jejum⁴⁶.

O presente estudo demonstrou um valor crescente da hepcidina conforme ferritina e siderose, demonstrando a influência de outros fatores estimulatórios na produção de hepcidina, que não a siderose apenas. Os níveis de hepcidina foram claramente distintos nos pacientes com SDDF e com HFD, refletindo a presença de ferro em um e a ausência no outro. Estudo realizado comparando indivíduos com DHGNA e saudáveis, observou elevação da hepcidina no grupo com DHGNA, mesmo na ausência de depósito de siderose⁹⁷. E ainda a hepcidina se relacionou com ferritina e enzimas hepáticas, ambos marcadores indiretos da inflamação hepática^{3,97}.

Apesar de sofrer influência de outras condições, o principal fator estimulador da hepcidina é o depósito de ferro. A hepcidina se mostrou um método não invasivo capaz de identificar pacientes com siderose, sendo o valor >30,2 ng/mL um bom marcador da presença de depósito de ferro com boa sensibilidade e especificidade.

5.4 Citocinas

O estado pró-inflamatório da síndrome metabólica, resistência à insulina, diabetes e obesidade é bem estabelecido, os fatores inflamatórios como resistina, leptina, TNF- α , IL-6 e PCR estão geralmente elevados nesta população⁹⁸. Com a relação íntima entre metabolismo do ferro e alterações metabólicas é esperado a elevação destes fatores inflamatórios em pacientes com excesso de ferro.

No presente estudo não foi observada elevação dos níveis de IL-6 e TNF- α de acordo com siderose, hiperferritinemia ou níveis de hepcidina.

Este padrão já havia sido relatado por outros autores, quando o grupo estudado era composto somente por indivíduos com DHGNA^{99,100}. Aparentemente os níveis dos marcadores inflamatórios não oscilam tanto em uma população com baixo grau de inflamação crônica. A presente amostra foi constituída por pacientes com indicação de biópsia hepática, ou seja, pacientes com elevação de transaminases por mais de 3 meses, ou com fatores de pior prognóstico, como os diabéticos.

5.5 Avaliação Histopatológica

A avaliação histopatológica foi realizada pelo grupo responsável pelas biopsias hepáticas do HC-FMUSP. Esta equipe é constituída por três patologistas experientes. Após esta primeira avaliação todas as lâminas foram reavaliadas por uma única patologista em um único momento, cega quanto aos resultados bioquímicos e radiológicos da amostra. O grau de correlação entre as análises foi considerado bom, reforçando a credibilidade das informações. A dosagem química do ferro não foi realizada pela dificuldade de realizar uma amostra grande o suficiente para se realizar tanto a avaliação histológica quanto a dosagem química.

A amostra foi constituída por pacientes com predomínio siderose grau 1, demonstrando a característica de depósito discreto de ferro encontrado em pacientes com SDDF^{19,27,32}.

O ferro pode se depositar no fígado em dois compartimentos, o hepatocelular (HC) e no sistema reticuloendotelial – células de Kupffer. Sendo assim observam-se três padrões de distribuição possíveis: o HC, SRE e misto.

O padrão misto é o mais frequente nos pacientes com DHGNA. O depósito de ferro misto foi encontrado em 91% dos pacientes com siderose positiva. O predomínio de ferro no SRE cursa com fibrose avançada e piores características histológicas, já o predomínio HC confere um melhor prognóstico. A presença de depósito de ferro misto está relacionada a um prognóstico histológico intermediário nos pacientes com DHGNA^{11,92}.

O acúmulo de ferro ocorre por mecanismos distintos. O depósito de ferro HC ocorre geralmente devido ao aumento da absorção do ferro, em situações de baixos níveis de hepcidina, enquanto que o depósito SRE é decorrente do aumento da necroinflamação hepática e fragilidade eritrocitária⁹².

Há a hipótese de que inicialmente haveria um depósito de ferro HC e depois no SRE⁹². A hepcidina poderia agir como intermediário deste processo, baseado na fisiopatologia da SDDF nos pacientes com DHGNA. Primeiro haveria uma maior oferta de ferro e gordura via alimentos e com o aumento da obesidade e progressivo depósito de gordura e ferro HC, haveria um aumento da hepcidina, corroborando com o represamento do ferro hepático, principalmente no SRE, e nos macrófagos^{44,92}.

Um ponto de interesse eram as características histológicas nos grupos HFD e SDDF em comparação nos grupos de ferritina normal e com siderose negativa. A hiperferritinemia e siderose não se relacionou a maior gravidade histológica. Por se tratar de um estudo transversal não há poder estatístico de associação de causa e efeito, porém esperava-se características histológicas mais graves nos grupos HFD e SDDF, de acordo com a literatura que relata que o depósito de ferro está relacionado ao pior prognóstico histológico^{3,93}.

5.6 Ressonância Magnética

O principal objetivo do projeto foi a avaliação de métodos não invasivos capazes de identificar discretas quantidades de ferro, em particular, a RM. Devido a literatura escassa utilizando a técnica de relaxometria em aparelhos 3 T e em pacientes com DHGNA, o presente trabalho acrescentará mais dados sobre pacientes com SDDF.

A RM, através da quantificação de $R2^*$, se mostrou um método não invasivo eficaz na quantificação do conteúdo de ferro hepático, apresentando uma boa correlação com a análise histológica. A média de $R2^*$ observada nos pacientes com siderose leve foi de $72,5 \pm 33 \text{ s}^{-1}$ e nos pacientes com siderose moderada foi de $88,2 \pm 31,9 \text{ s}^{-1}$. O nível de corte de $R2^*$ para identificar a presença de siderose foi de $58,9 \text{ s}^{-1}$ com uma sensibilidade de 73,5%, especificidade de 70% e AUROC 0,780.

Há uma grande variabilidade do valor de $R2^*$ medido em indivíduos sem sobrecarga de ferro, dificultando a determinação de um valor considerado normal¹⁰¹. Este fato dificulta a determinação de um ponto de corte que realmente separe pacientes com e sem sobrecarga de ferro e explica o alto valor do desvio padrão. Alguns autores acreditam que a técnica de relaxometria utilizando T2 ou T2* seja pouco sensível na detecção de discretos depósitos de ferro¹⁰¹, principalmente pela grande variação de valores de $R2^*$ em pacientes normais, porém o presente estudo se mostrou uma técnica eficaz na população com DHGNA. Em estudo de validação cuja amostra incluía pacientes com SDDF, realizada em um aparelho 3T, d'Assignies *et al.*⁸² relataram a equivalência de um valor de $R2^*$

de 77 s^{-1} (sensibilidade de 96% e especificidade de 93%) ao valor de LIC de $32 \text{ } \mu\text{mol/g}$, pela fórmula $\text{LIC}_{\text{r2}^*} (\text{ } \mu\text{mol/g}) = 0,314\text{R2}^* - 0,96$. Este estudo foi comparado com dosagem química.

Os valores de $\text{T2}^*/\text{R2}^*$ são distintos em máquinas 1,5 T ou de 3 T, alguns autores desenharam a seguinte fórmula para a conversão dos valores em aparelhos distintos: $\text{R2}^*_{3\text{T}} = (2 \times \text{R2}^*_{1,5\text{T}}) - 11 \pm 4^{102}$.

Há alguns estudos, com populações distintas, em máquinas 1,5T que relataram distintos valores de R2^* . Henninger *et al.*⁸⁵ compilaram os principais estudos usando a técnica de relaxometria e os comparou com a sua amostra. A descrição dos estudos está na Quadro 2.

Quadro 2 - Estudos usando a técnica de relaxometria

Estudos	Pacientes	Máquina	TR (ms)	TE inicial (ms)	Nº de ecoes	Correção para gordura
Anderson <i>et al.</i> ¹⁰³	- B talassemia (n=27)	1,5T	200	2,2	8	não
Wood <i>et al.</i> ⁷⁹	- 22/102 pacientes tinham RM e biópsia - Talassemia major - Anemia falciforme - Síndrome de Blackfan-Diamond	1,5 T	25	0,8	16	não
Hankins <i>et al.</i> ⁸⁴	- Anemia falciforme (32) - Talassemia major (6) - Aplasia de medula óssea (5)	1,5T	nm	1,1	20	não
Virtanen <i>et al.</i> ¹⁰⁴	- Saudáveis (6) - Suspeita de siderose (27)	1,5T	120	4	4	Somente in phase ecoes
Garbowski <i>et al.</i> ⁸⁶	- Talassemia major (20) - Síndrome de Blackfan-Diamond (2) - Anemia sideroblástica (2) - Anemia por deficiência de piruvatoquinase (1)	1,5T	nm	0,93	20	nm
Henninger <i>et al.</i> ⁸⁵	- SDDF (2) - HH (5) - Hemocromatose não HFE (6) - Anemias (2)	1,5T	200	0,99	12	sim
D'Assignies <i>et al.</i> ⁸²	- HF (58) - SM (52) - Hepatite alcoólica (15) - Hepatite B ou C (15) - Outras hepatopatias (6)	3T	nm	1,15-1,23	11	nm

Fonte: Adaptado de Henninger *et al.*⁸⁵

Em um estudo prévio, utilizando a técnica de relaxometria em scanner 1,5T, em pacientes com DHGNA, sem comparação com histologia, utilizou um ponto de corte de $R2^*$ de $75,48 \text{ s}^{-1}$, com especificidade de 90% e sensibilidade de 84,62%, porém foi em um aparelho 1,5T (valor em 3T: 140 s^{-1})⁷⁶. Kühn *et al.*¹⁰⁵, em um estudo populacional alemão encontraram uma prevalência de depósito de ferro de 17,4% com valor médio de $R2^*$ de 41 s^{-1} (valor 3T: 71 s^{-1}).

Alguns fatores influenciam o cálculo de $T2^*/R2^*$. Entre eles estão: as características das partículas de ferro (tamanho, local de depósito), parâmetros técnicos da RM (tipo de sequência, TE, TR, tipo de coil, bandwidth) e alterações do parênquima hepático (fibrose, inflamação e gordura)¹⁰¹. Baseado nestas informações deve-se levar em consideração algumas características dos estudos para entender a grande variabilidade de $T2^*/R2^*$.

Em primeiro lugar é importante salientar que os estudos realizados para calibração do método e estimativa da concentração de ferro foram comparados com a análise química do ferro, sendo que no presente estudo, foi utilizada a avaliação histológica proveniente da biópsia hepática, que é uma técnica subjetiva de análise. A maioria dos estudos é feita com análise histológica, pois para que a dosagem química fosse realizada seriam necessários dois fragmentos ou a realização com uma agulha mais grossa, durante a realização da biópsia hepática, procedimento que acarretaria maior risco de sangramento para o paciente.

Outro fator é que as populações estudadas são muito heterogêneas, variando de doenças hematológicas, em especial talassemia e anemia

falciforme, caracterizadas por grandes acúmulos de ferro e pacientes com SDDF, com pouco depósito de ferro^{74,79}. Há uma grande variedade de depósito de ferro e gordura dependendo da situação. Além disso, a análise deve ser feita com correção para porcentagem de gordura⁷⁸. A não correção, como já foi comentada, leva a uma superestimação do ferro hepático¹⁰¹. Quando se leva em consideração a população de SDDF, realmente o valor de $R2^*$ é mais baixo, como no estudo recente de validação na população francesa⁸². Henninger⁷⁵ em uma revisão, aponta a necessidade de uma padronização na realização da RM para cálculo de ferro, para tentar desmistificar esta questão. É importante salientar que cada técnica tem sua própria curva de calibração para correlacionar com LIC, não se pode utilizar a curva de calibração de um método em outro e cada pequena mudança nos parâmetros da RM, exige um novo estudo de recalibração. É de suma importância o conhecimento da técnica utilizada para a correta interpretação do exame.

Outro dado interessante foi a identificação que pacientes com ferritina elevada exibem valores maiores de $R2^*$ que pacientes com ferritina normal, mesmo na ausência de siderose na biópsia. A explicação deste achado ainda é desconhecida, porém está provavelmente relacionada a influência da fibrose e/ou inflamação neste parâmetro, apesar de não termos identificado diferença de fibrose e inflamação entre os grupos. O $R2^*$ pode ser um fator de risco independente de pior prognóstico já que se correlacionou com os níveis de ferritina e siderose. Mais estudos são necessários nesta população.

6 CONCLUSÕES

a) RM utilizando a técnica de relaxometria com correção de picos de gordura mostrou-se um método não invasivo efetivo para avaliação de discreto depósito de ferro em pacientes com DHGNA.

b) A HF pode refletir depósito de ferro hepático quando acima de 180,4 ng/mL em mulheres e 350,7 ng/mL em homens, não foi encontrada relação entre HF e características piores metabólicas ou histológicas.

c) As subunidades de ferritina, medidas no sangue periférico, não foram capazes de discriminar a siderose hepática. A FL se associou positivamente com síndrome metabólica e circunferência abdominal, enquanto a FP se correlacionou com esteatose hepática.

d) Hepcidina se correlacionou com siderose e ferritina sérica nos pacientes com DHGNA; O valor de 30,2 ng/mL se mostrou eficaz em identificar pacientes com siderose hepática.

7 ANEXOS

Anexo A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO:.....CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....).....
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE:..... SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO:.....CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Avaliação de sobrecarga de ferro através de métodos não invasivos em pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica, excesso de peso e hiperferritinemia**
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Dra. Cintia Cercato

CARGO/FUNÇÃO: Médica do Hospital das Clínicas de São Paulo

INSCRIÇÃO NO CONSELHO REGIONAL No. CRM 84722

UNIDADE DO HCFMUSP: DEPARTAMENTO DE ENDOCRINOLOGIA

PESQUISADOR EXECUTANTE: Dra. Paula Pessin Fábrega

CARGO/FUNÇÃO: Pós-graduanda do Hospital das Clínicas de São Paulo - Área: endocrinologia

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº. CRM 117232

UNIDADE DO HCFMUSP: DEPARTAMENTO DE ENDOCRINOLOGIA
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
RISCO MÉDIO

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 60 MESES

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

A Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA) é uma doença do fígado que pode se tornar crônica e se não for cuidada pode provocar cirrose e até câncer no fígado. Uma das manifestações importantes é o depósito de gordura no fígado, que está relacionado com obesidade, diabetes tipo 2, hipertensão arterial e dislipidemia. Isto pode prejudicar ou até mesmo impedir a realização de muitas tarefas do seu dia-a-dia e comprometer a sua qualidade de vida. Alguns pacientes com DHGNA tem depósito de ferro no fígado, isso pode ser causado pela própria gordura e inflamação que esta causa no fígado. A reversão deste quadro de acúmulo de ferro no fígado pode ajudar no tratamento de doenças metabólicas como diabetes e pré diabetes como também evitar/retardar a progressão da doença do fígado. Um exame que ajuda a identificar os pacientes com depósito de ferro no fígado é a ferritina. Ferritina é uma proteína produzida no fígado responsável pelo armazenamento do ferro. É analisada por meio de um exame de sangue. Este exame pode se encontrar alterado por outras causas fora depósito de ferro no fígado. Neste estudo só serão selecionados pacientes que já fizeram a biópsia hepática com indicação do gastroenterologista e que tenham ferritina elevada. O objetivo deste estudo é identificar um possível exame que ajudasse a diferenciar pacientes que tenham ferritina alta por presença de ferro no fígado de pessoas que tenham este exame alterado por outras causas.

Venho por meio deste termo convidá-lo(a) a participar, de forma voluntária, deste estudo. A seguir será feita uma explicação de todos os procedimentos que serão feitos nesta pesquisa.

Sua ficha médica será analisada para conhecer a sua doença, os remédios que você toma, seus exames clínicos, verificar se você tem alguma outra doença além da doença hepática gordurosa não alcoólica e avaliar outras informações médicas que possam ser úteis.

PROCEDIMENTOS

Você passará por avaliações que incluirão:

- Consulta com médico pesquisador que perguntará sobre sua idade, doenças, medicações que está usando no momento, hábitos e vícios, como também verificará seu peso, altura, circunferência da barriga e pescoço.

- Análise do seu sangue para identificar níveis de ferritina e alterações metabólicas como diabetes, colesterol e ácido úrico.

- Realização de ressonância nuclear magnética de abdome para identificar se há depósito de ferro no fígado. Este exame será comparado ao resultado da sua biópsia para identificar se há correlação. Se uma correlação for estabelecida pode haver substituição da biópsia hepática por um outro exame menos invasivo.

- Análise do seu perfil genético, por meio da coleta de material (sangue) para realizar um banco de DNA para futuras pesquisas. Não será utilizado nesta pesquisa em especial.

DESCONFORTOS E RISCOS

Você passará por avaliações que incluirão:

- Consulta com o médico, na qual você responderá a questionários de avaliação do consumo de álcool, terá seu peso, altura e circunferência da cintura medidos, assim como cálculo de seu índice de massa corpórea.

- Realização de uma ressonância magnética para verificar se há depósito de ferro no seu fígado e pâncreas.

PROCEDIMENTOS ROTINEIROS:

Serão realizados: coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço, e será realizado a ressonância magnética com uso de contraste.

Todos estes procedimentos serão realizados uma única vez.

DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS:

- Exames de sangue: os desconfortos da coleta de sangue serão os mesmos de qualquer outro exame laboratorial, incluindo desconforto no local da punção.

- Ressonância Magnética: os desconfortos da ressonância magnética serão os mesmos de qualquer outra ressonância. O exame tem duração de cerca de 1 hora e é necessário injeção de contraste. É rara qualquer reação alérgica porém pode ocorrer. O contraste não é iodado, logo não é contra indicação quem tem qualquer alergia a iodo.

Você será avaliado e iremos com os dados dos seus exames poder ajudar outras pessoas com a mesma doença que a sua.

ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

O paciente (ou o seu responsável) terá total liberdade de perguntar sobre todos os procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa a fim de que quaisquer dúvidas sejam esclarecidas.

A qualquer momento, você poderá optar por deixar de participar do estudo sem que isso prejudique a continuidade da assistência médica prestada. Caso ocorra algum dano à saúde decorrente da pesquisa, será assegurado o seu direito de receber assistência médica no Hospital das Clínicas (HC-FMUSP).

As suas informações pessoais serão mantidas em segredo. Os dados coletados serão usados apenas para fins de publicação científica.

Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, em relação aos exames e consultas. As despesas com relação a condução serão de responsabilidade do paciente. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa, a qual será financiada com recursos da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo).

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) - Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar - tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 - e-mail: cappelq@hcnnet.usp.br.

CONFIDENCIALIDADE

As informações médicas geradas por esta pesquisa farão parte do seu prontuário hospitalar. Aquelas informações que não constarem no seu prontuário serão mantidas no arquivo dos pesquisadores e identificadas apenas por um número. Os resultados desse estudo poderão ser publicados em uma revista ou livro texto da área médica com a finalidade de ensinamento. Os autores se comprometem a usar os dados apenas com os propósitos desta pesquisa.

SOLICITAÇÃO DE INFORMAÇÕES ADICIONAIS

O(a) senhor(a) poderá solicitar mais informações a respeito do estudo a qualquer momento. Em qualquer etapa do estudo, o senhor (a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa. O principal investigador é a Dra Cintia Cercato que pode ser encontrado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, telefone (s) (11)

26617516 .Se o senhor(a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) - Rua Ovídio Pires de Campos, 225 - 5º andar, telefone 3069-6442, ramais 16,17,18 ou 20, fax 3069-6442, ramal 26, ou pelo email: cappesq@hcnet.usp.br.

O(a) senhor(a) será informado sobre novas descobertas que possam influenciar a continuidade da sua participação na pesquisa.

RECUSA OU ABANDONO DO ESTUDO

O(a) senhor(a) está livre a recusar-se a participar, retirar o seu consentimento informado ou abandonar o referido projeto, a qualquer momento, sem prejuízo à continuidade de seu tratamento na instituição.

Eu, _____, fui informado(a) dos objetivos e da justificativa do estudo " **Avaliação de sobrecarga de ferro através de métodos não invasivos em pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica, excesso de peso e hiperferritinemia**", de forma clara e detalhada, conforme especificados no termo de consentimento livre e esclarecido. Recebi informações específicas sobre os procedimentos aos quais serei submetido(a), seus desconfortos e riscos, com da utilização de material biológico para estudo.

Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disso, terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa durante o andamento da mesma.

Eu discuti com a Dra. Paula Pessin Fábrega ou Dra. Cintia Cercato sobre minha decisão em participar deste estudo. Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou foram lidas para mim.

Ficou claro que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Fui informado(a) que todos os custos relacionados a exames diagnósticos e tratamento médico serão cobertos por verbas próprias do Projeto de Pesquisa.

Declaro ser de livre vontade minha participação nesta pesquisa, e que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

SÃO PAULO, ____ de _____ de 20__.

Anexo B - Questionário aplicado

Questionário aplicado aos pacientes número: RGHC _____

Nome: _____

Data de nascimento: __/__/__

Endereço: _____

Cidade: _____ Telefone : _____

Profissão: _____

1. Comorbidades: HAS DM DLP Hiperuricemia IRC Anemias

Outras _____

2. Med em uso nos últimos 6 meses:

3. Consumo de bebida alcoólica semanal

	Dose	Periodicidade na semana	Total
Destilados (40 mL)			
Vinho (150mL)			
Cerveja (300mL)			
Total			

4. Transfusão sanguínea há 6 meses

5. Doação de sangue: sim não. Quando? _____

6. DUM: _____ Possibilidade de gestação atual? _____

7. Data da realização da biópsia hepática: _____

8. Hepatite B e C sim não

9. Lipodistrofia sim não

10. Nutrição parenteral prolongada no último ano sim não

11. Desnutrição visível sim não

12. Uso de; amiodarona MTX tamoxifeno corticosteróides AC valproico TARV

13. Claustrofobia sim não

14. Profissão com farpas metálicas sim não

15. Neurocirurgia com clip metálico sim não

16. Projétil sim não

17. Marca passo sim não

18. Prótese metálica no corpo sim não

Laboratório pregresso:

Cobre

Ceruloplasmina

Alfa 1 antitripsina

Sorologias para hepatites

anticorpos anti-citosol hepático

anti célula parietal

anti mitocôndria

anti microssoma de fígado e rim (Anti LKM-1)

alfafetoproteína

Exame físico:

Peso: _____ alt _____ IMC _____ CA _____ CP _____ PA _____

8 REFERÊNCIAS

1. Aigner E, Theurl I, Theurl M, Lederer D, Haufe H, Dietze O, Strasser M, Datz C, Weiss G. Pathways underlying iron accumulation in human nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Nutr*. 2008;87(5):1374-83.
2. Kanwar P, Nelson JE, Yates K, Kleiner DE, Unalp-Arida A, Kowdley KV. Association between metabolic syndrome and liver histology among NAFLD patients without diabetes. *BMJ Open Gastroenterol*. 2016;3(1):e000114.
3. Corradini E, Pietrangelo A. Iron and steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012;27(Suppl 2):42-6.
4. Pietrangelo A. Iron and the liver. *Liver Int*. 2016;36(Suppl 1):116-23.
5. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, Charlton M, Sanyal AJ; American Association for the Study of Liver Diseases; American College of Gastroenterology; American Gastroenterological Association. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Am J Gastroenterol*. 2012;107(6):811-26.

6. Lewis JR, Mohanty SR. Nonalcoholic fatty liver disease: a review and update. *Dig Dis Sci*. 2010;55(3):560-78.
7. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016;64(1):73-84.
8. Furuya CK Jr., de Oliveira CP, de Mello ES, Faintuch J, Raskovski A, Matsuda M, Vezozzo DC, Halpern A, Garrido AB Jr, Alves VA, Carrilho FJ. Effects of bariatric surgery on nonalcoholic fatty liver disease: preliminary findings after 2 years. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007;22(4):510-4.
9. Calzadilla Bertot L, Adams LA. The natural course of non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci*. 2016;17(5). pii: E774.
10. Zelber-Sagi S, Nitzan-Kaluski D, Halpern Z, Oren R. NAFLD and hyperinsulinemia are major determinants of serum ferritin levels. *J Hepatol*. 2007;46(4):700-7.
11. Kowdley KV, Belt P, Wilson LA, Yeh MM, Neuschwander-Tetri BA, Chalasani N, Sanyal AJ, Nelson JE; NASH Clinical Research Network. Serum ferritin is an independent predictor of histologic severity and advanced fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2012;55(1):77-85.

12. Du SX, Lu LL, Geng N, Victor DW, Chen LZ, Wang C, Yue HY, Xin YN, Xuan SY, Jin WW. Association of serum ferritin with non-alcoholic fatty liver disease: a meta-analysis. *Lipids Health Dis.* 2017;16(1):228.
13. Hagstrom H, Nasr P, Bottai M, Ekstedt M, Kechagias S, Hultcrantz R, Stål P. Elevated serum ferritin is associated with increased mortality in non-alcoholic fatty liver disease after 16 years of follow-up. *Liver Int.* 2016;36(11):1688-95.
14. Ellervik C, Marott JL, Tybjaerg-Hansen A, Schnohr P, Nordestgaard BG. Total and cause-specific mortality by moderately and markedly increased ferritin concentrations: general population study and metaanalysis. *Clin Chem.* 2014;60(11):1419-28.
15. Leibold EA, Aziz N, Brown AJ, Munro HN. Conservation in rat liver of light and heavy subunit sequences of mammalian ferritin. Presence of unique octopeptide in the light subunit. *J Biol Chem.* 1984;259(7):4327-34.
16. Chen LY, Chang SD, Sreenivasan GM, Tsang PW, Broady RC, Li CH, Zypchen LN. Dysmetabolic hyperferritinemia is associated with normal transferrin saturation, mild hepatic iron overload, and elevated hepcidin. *Ann Hematol.* 2011;90(2):139-43.
17. Corradini E, Ferrara F, Pietrangelo A. Iron and the liver. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2004;2(Suppl 2):245-8.
18. Datz C, Felder TK, Niederseer D, Aigner E. Iron homeostasis in the metabolic syndrome. *Eur J Clin Invest.* 2013;43(2):215-24.

19. Fargion S. Dysmetabolic iron overload syndrome. *Haematologica*. 1999;84(2):97-8.
20. Fargion S, Mattioli M, Fracanzani AL, Sampietro M, Tavazzi D, Fociani P, Taioli E, Valenti L, Fiorelli G. Hyperferritinemia, iron overload, and multiple metabolic alterations identify patients at risk for nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol*. 2001;96(8):2448-55.
21. Yu FJ, Huang MC, Chang WT, Chung HF, Wu CY, Shin SJ, Hsu CC. Increased ferritin concentrations correlate with insulin resistance in female type 2 diabetic patients. *Ann Nutr Metab*. 2012;61(1):32-40.
22. Jin Y, He L, Chen Y, Fang Y, Yao Y. Association between serum ferritin levels and metabolic syndrome: an updated meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(8):13317-22.
23. Padwal MK, Murshid M, Nirmale P, Melinkeri RR. Association of serum ferritin levels with metabolic syndrome and insulin Resistance. *J Clin Diagn Res*. 2015;9(9):BC11-3.
24. Chen L, Li Y, Zhang F, Zhang S, Zhou X, Ji L. Association of serum ferritin levels with metabolic syndrome and insulin resistance in a Chinese population. *J Diabetes Complications*. 2017;31(2):364-8.
25. Beaton MD, Chakrabarti S, Adams PC. Inflammation is not the cause of an elevated serum ferritin in non-alcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol*. 2014;13(3):353-6.

26. Dongiovanni P, Valenti L, Ludovica Fracanzani A, Gatti S, Cairo G, Fargion S. Iron depletion by deferoxamine up-regulates glucose uptake and insulin signaling in hepatoma cells and in rat liver. *Am J Pathol.* 2008;172(3):738-47.
27. Dongiovanni P, Fracanzani AL, Fargion S, Valenti L. Iron in fatty liver and in the metabolic syndrome: a promising therapeutic target. *J Hepatol.* 2011;55(4):920-32.
28. Dongiovanni P, Lanti C, Gatti S, Rametta R, Recalcati S, Maggioni M, Fracanzani AL, Riso P, Cairo G, Fargion S, Valenti L. High fat diet subverts hepatocellular iron uptake determining dysmetabolic iron overload. *PloS one.* 2015;10(2):e0116855.
29. Adams PC, Barton JC. A diagnostic approach to hyperferritinemia with a non-elevated transferrin saturation. *J Hepatol.* 2011;55(2):453-8.
30. Crook MA. Hyperferritinaemia; laboratory implications. *Ann Clin Biochem.* 2012;49(Pt 3):211-3.
31. Deugnier Y, Bardou-Jacquet E, Laine F, Gandon Y, Jouanolle AM. Diagnosis of hepatic iron overload. *Rev Med Interne.* 2012;33(Suppl 1):S10-4.
32. Deugnier Y, Laine F. Dysmetabolic iron overload syndrome: a systemic disease? *Presse Med.* 2014;43(6 Pt 1):625-7.

-
33. Pietrangelo A, Caleffi A, Corradini E. Non-HFE hepatic iron overload. *Semin Liver Dis.* 2011;31(3):302-18.
 34. Riva A, Trombini P, Mariani R, Salvioni A, Coletti S, Bonfadini S, Paolini V, Pozzi M, Facchetti R, Bovo G, Piperno A. Revaluation of clinical and histological criteria for diagnosis of dysmetabolic iron overload syndrome. *World J Gastroenterol.* 2008;14(30):4745-52.
 35. Moirand R, Mortaji AM, Loreal O, Paillard F, Brissot P, Deugnier Y. A new syndrome of liver iron overload with normal transferrin saturation. *Lancet.* 1997;349(9045):95-7.
 36. Datz C, Muller E, Aigner E. Iron overload and non-alcoholic fatty liver disease. *Minerva endocrinol.* 2017;42(2):173-83.
 37. Abboud S, Haile DJ. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem.* 2000;275(26):19906-12.
 38. Aigner E, Weiss G, Datz C. Dysregulation of iron and copper homeostasis in nonalcoholic fatty liver. *World J Hepatol.* 2015;7(2):177-88.
 39. Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell.* 2010;142(1):24-38.
 40. Barisani D, Pelucchi S, Mariani R, Galimberti S, Trombini P, Fumagalli D, Meneveri R, Nemeth E, Ganz T, Piperno A. Hpcidin and iron-related gene expression in subjects with Dysmetabolic Hepatic Iron Overload. *J Hepatol.* 2008;49(1):123-33.

-
41. Trombini P, Paolini V, Pelucchi S, Mariani R, Nemeth E, Ganz T, Piperno A. Hepcidin response to acute iron intake and chronic iron loading in dysmetabolic iron overload syndrome. *Liver Int.* 2011;31(7):994-1000.
 42. Pietrangelo A. Hepcidin in human iron disorders: therapeutic implications. *J Hepatol.* 2011;54(1):173-81.
 43. Adams PC, Reboussin DM, Barton JC, McLaren CE, Eckfeldt JH, McLaren GD, Dawkins FW, Acton RT, Harris EL, Gordeuk VR, Leiendecker-Foster C, Speechley M, Snively BM, Holup JL, Thomson E, Sholinsky P; Hemochromatosis and Iron Overload Screening (HEIRS) Study Research Investigators. Hemochromatosis and iron-overload screening in a racially diverse population. *N Engl J Med.* 2005;352(17):1769-78.
 44. Ruivard M, Laine F, Deugnier Y. Iron absorption in nonalcoholic steatohepatitis and dysmetabolic iron overload syndrome. *Hepatology.* 2016;63(5):1737-8.
 45. Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1763(7):700-10.
 46. Rametta R, Dongiovanni P, Pelusi S, Francione P, Iuculano F, Borroni V, Fatta E, Castagna A, Girelli D, Fargion S, Valenti L. Hepcidin resistance in dysmetabolic iron overload. *Liver Int.* 2016;36(10):1540-8.

-
47. Ravasi G, Pelucchi S, Trombini P, Mariani R, Tomosugi N, Modignani GL, Pozzi M, Nemeth E, Ganz T, Hayashi H, Barisani D, Piperno A. Hepcidin expression in iron overload diseases is variably modulated by circulating factors. *PloS one*. 2012;7(5):e36425.
 48. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, Ganz T. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest*. 2004;113(9):1271-6.
 49. Martinelli N, Traglia M, Campostrini N, Biino G, Corbella M, Sala C, Busti F, Masciullo C, Manna D, Previtali S, Castagna A, Pistis G, Olivieri O, Toniolo D, Camaschella C, Girelli D. Increased serum hepcidin levels in subjects with the metabolic syndrome: a population study. *PloS one*. 2012;7(10):e48250.
 50. Chung B, Matak P, McKie AT, Sharp P. Leptin increases the expression of the iron regulatory hormone hepcidin in HuH7 human hepatoma cells. *J Nutr*. 2007;137(11):2366-70.
 51. Amato A, Santoro N, Calabro P, Grandone A, Swinkels DW, Perrone L, del Giudice EM. Effect of body mass index reduction on serum hepcidin levels and iron status in obese children. *Int J Obes (Lond)*. 2010;34(12):1772-4.

52. Yamamoto K, Kuragano T, Kimura T, Nanami M, Hasuike Y, Nakanishi T. Interplay of adipocyte and hepatocyte: Leptin upregulates hepcidin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;495(1):1548-54.
53. Aigner E, Felder TK, Oberkofler H, Hahne P, Auer S, Soyak S, Stadlmayr A, Schwenoha K, Pirich C, Hengster P, Datz C, Patsch W. Glucose acts as a regulator of serum iron by increasing serum hepcidin concentrations. *J Nutr Biochem*. 2013;24(1):112-7.
54. Fernandez-Real JM, McClain D, Manco M. Mechanisms linking glucose homeostasis and iron metabolism toward the onset and progression of type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2015;38(11):2169-76.
55. Hudson DM, Curtis SB, Smith VC, Griffiths TA, Wong AY, Scudamore CH, Buchan AM, MacGillivray RT. Human hephaestin expression is not limited to enterocytes of the gastrointestinal tract but is also found in the antrum, the enteric nervous system, and pancreatic {beta}-cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;298(3):G425-32.
56. Ueki K, Kondo T, Kahn CR. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. *Mol Cell Biol*. 2004;24(12):5434-46.

-
57. Valenti L, Dongiovanni P, Motta BM, Swinkels DW, Bonara P, Rametta R, Burdick L, Frugoni C, Fracanzani AL, Fargion S. Serum hepcidin and macrophage iron correlate with MCP-1 release and vascular damage in patients with metabolic syndrome alterations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(3):683-90.
 58. Aigner E, Feldman A, Datz C. Obesity as an emerging risk factor for iron deficiency. *Nutrients.* 2014;6(9):3587-600.
 59. Nairz M, Haschka D, Demetz E, Weiss G. Iron at the interface of immunity and infection. *Front Pharmacol.* 2014;5:152.
 60. Meli R, Mattace Raso G, Irace C, Simeoli R, Di Pascale A, Paciello O, Pagano TB, Calignano A, Colonna A, Santamaria R. High Fat diet induces liver steatosis and early dysregulation of iron metabolism in rats. *PloS one.* 2013;8(6):e66570.
 61. Boyd D, Jain SK, Crampton J, Barrett KJ, Drysdale J. Isolation and characterization of a cDNA clone for human ferritin heavy chain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81(15):4751-5.
 62. Dorner MH, Salfeld J, Will H, Leibold EA, Vass JK, Munro HN. Structure of human ferritin light subunit messenger RNA: comparison with heavy subunit message and functional implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(10):3139-43.

-
63. Wang Z, Li C, Ellenburg M, Soistman E, Ruble J, Wright B, Ho JX, Carter DC. Structure of human ferritin I chain. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2006;62(Pt 7):800-6.
 64. Koorts AM, Levay PF, Hall AN, van der Merwe CF, Becker PJ, Frantzen DJ, Viljoen M. Expression of the H- and L-subunits of ferritin in bone marrow macrophages of patients with osteoarthritis. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2012;237(6):688-93.
 65. Koorts AM, Levay PF, Hall AN, van der Merwe CF, Becker PJ, Viljoen M. Expression of the H-subunit and L-subunit of ferritin in bone marrow macrophages and cells of the erythron during cellular immune activation. *Blood Cells Mol Dis*. 2011;47(1):50-5.
 66. Cairo G, Tacchini L, Pogliaghi G, Anzon E, Tomasi A, Bernelli-Zazzera A. Induction of ferritin synthesis by oxidative stress. Transcriptional and post-transcriptional regulation by expansion of the "free" iron pool. *J Biol Chem*. 1995;270(2):700-3.
 67. Miller LL, Miller SC, Torti SV, Tsuji Y, Torti FM. Iron-independent induction of ferritin H chain by tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(11):4946-50.
 68. Daba A, Koromilas AE, Pantopoulos K. Alternative ferritin mRNA translation via internal initiation. *RNA*. 2012;18(3):547-56.

-
69. Mattila RM, Sainio A, Jarvelainen M, Pursiheimo J, Jarvelainen H. A novel double nucleotide variant in the ferritin-L iron-responsive element in a Finnish patient with hereditary hyperferritinaemia-cataract syndrome. *Acta Ophthalmol.* 2018;96(1):95-9.
70. Thurlow V, Vadher B, Bomford A, DeLord C, Kannengiesser C, Beaumont C, Grandchamp B. Two novel mutations in the L ferritin coding sequence associated with benign hyperferritinaemia unmasked by glycosylated ferritin assay. *Ann Clin Biochem.* 2012;49(Pt 3):302-5.
71. Alustiza Echeverria JM, Castiella A, Emparanza JI. Quantification of iron concentration in the liver by MRI. *Insights Imaging.* 2012;3(2):173-80.
72. Queiroz-Andrade M, Blasbalg R, Ortega CD, Rodstein MA, Baroni RH, Rocha MS, Cerri GG. MR imaging findings of iron overload. *Radiographics.* 2009;29(6):1575-89.
73. Wood JC, Zhang P, Rienhoff H, Abi-Saab W, Neufeld EJ. Liver MRI is more precise than liver biopsy for assessing total body iron balance: a comparison of MRI relaxometry with simulated liver biopsy results. *Magn Reson Imaging.* 2015;33(6):761-7.
74. Gandon Y, Olivie D, Guyader D, Aube C, Oberti F, Sebille V, Deugnier Y. Non-invasive assessment of hepatic iron stores by MRI. *Lancet.* 2004;363(9406):357-62.
75. Henninger B. Demystifying liver iron concentration measurements with MRI. *Eur Radiol.* 2018;28(6):2535-6.

-
76. Henninger B, Zoller H, Rauch S, Schocke M, Kannengiesser S, Zhong X, Reiter G, Jaschke W, Kremser C. Automated two-point dixon screening for the evaluation of hepatic steatosis and siderosis: comparison with R2-relaxometry and chemical shift-based sequences. *Eur Radiol.* 2015;25(5):1356-65.
 77. Kinner S, Reeder SB, Yokoo T. Quantitative Imaging Biomarkers of NAFLD. *Dig Dis Sci.* 2016;61(5):1337-47.
 78. Kuhn JP, Hernando D, Munoz del Rio A, Evert M, Kannengiesser S, Volzke H, Mensel B, Puls R, Hosten N, Reeder SB. Effect of multipeak spectral modeling of fat for liver iron and fat quantification: correlation of biopsy with MR imaging results. *Radiology.* 2012;265(1):133-42.
 79. Wood JC, Enriquez C, Ghugre N, Tyzka JM, Carson S, Nelson MD, Coates TD. MRI R2 and R2* mapping accurately estimates hepatic iron concentration in transfusion-dependent thalassemia and sickle cell disease patients. *Blood.* 2005;106(4):1460-5.
 80. St Pierre TG, Clark PR, Chua-anusorn W, Fleming AJ, Jeffrey GP, Olynyk JK, Pootrakul P, Robins E, Lindeman R. Noninvasive measurement and imaging of liver iron concentrations using proton magnetic resonance. *Blood.* 2005;105(2):855-61.
 81. Reeder SB, Sirlin CB. Quantification of liver fat with magnetic resonance imaging. *Magn Reson Imaging Clin N Am.* 2010;18(3):337-57, ix.

-
82. d'Assignies G, Paisant A, Bardou-Jacquet E, Boulic A, Bannier E, Lainé F, Ropert M, Morcet J, Saint-Jalmes H, Gandon Y. Non-invasive measurement of liver iron concentration using 3-Tesla magnetic resonance imaging: validation against biopsy. *Eur Radiol*. 2018;28(5):2022-30.
83. Meloni A, Positano V, Keilberg P, De Marchi D, Pepe P, Zuccarelli A, Campisi S, Romeo MA, Casini T, Bitti PP, Gerardi C, Lai ME, Piraino B, Giuffrida G, Secchi G, Midiri M, Lombardi M, Pepe A. Feasibility, reproducibility, and reliability for the T² iron evaluation at 3 T in comparison with 1.5 T. *Magn Reson Med*. 2012;68(2):543-51.
84. Hankins JS, McCarville MB, Loeffler RB, Smeltzer MP, Onciu M, Hoffer FA, Li CS, Wang WC, Ware RE, Hillenbrand CM. R²* magnetic resonance imaging of the liver in patients with iron overload. *Blood*. 2009;113(20):4853-5.
85. Henninger B, Zoller H, Rauch S, Finkenstedt A, Schocke M, Jaschke W, Kremser C. R²* relaxometry for the quantification of hepatic iron overload: biopsy-based calibration and comparison with the literature. *Rofo*. 2015;187(6):472-9.
86. Garbowski MW, Carpenter JP, Smith G, Roughton M, Alam MH, He T, He T, Pennell DJ, Porter JB. Biopsy-based calibration of T²* magnetic resonance for estimation of liver iron concentration and comparison with R2 Ferriscan. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2014;16:40.

87. Thun MJ, Peto R, Lopez AD, Monaco JH, Henley SJ, Heath CW, Jr., Doll R. Alcohol consumption and mortality among middle-aged and elderly U.S. adults. *N Engl J Med*. 1997;337(24):1705-14.
88. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *Jama*. 2001;285(19):2486-97.
89. Pietrangelo A. Genetics, genetic testing, and management of hemochromatosis: 15 years since hepcidin. *Gastroenterology*. 2015;149(5):1240-51 e4.
90. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101-8.
91. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ; Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;41(6):1313-21.

-
92. Nelson JE, Wilson L, Brunt EM, Yeh MM, Kleiner DE, Unalp-Arida A, Kowdley KV; Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Relationship between the pattern of hepatic iron deposition and histological severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2011;53(2):448-57.
 93. Valenti L, Fracanzani AL, Bugianesi E, Dongiovanni P, Galmozzi E, Vanni E, Canavesi E, Lattuada E, Roviato G, Marchesini G, Fargion S. HFE genotype, parenchymal iron accumulation, and liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2010;138(3):905-12.
 94. Lorcerie B, Audia S, Samson M, Milliere A, Falvo N, Leguy-Seguin V, Berthier S, Bonnotte B. Diagnosis of hyperferritinemia in routine clinical practice. *Presse Med*. 2017;46(12 Pt 2):e329-e38.
 95. Utzschneider KM, Largajolli A, Bertoldo A, Marcovina S, Nelson JE, Yeh MM, Kowdley KV, Kahn SE. Serum ferritin is associated with non-alcoholic fatty liver disease and decreased Beta-cell function in non-diabetic men and women. *J Diabetes Complications*. 2014;28(2):177-84.
 96. Moreno-Navarrete JM, Novelle MG, Catalan V, Ortega F, Moreno M, Gomez-Ambrosi J, Xifra G, Serrano M, Guerra E, Ricart W, Frühbeck G, Diéguez C, Fernández-Real JM. Insulin resistance modulates iron-related proteins in adipose tissue. *Diabetes Care*. 2014;37(4):1092-100.

-
97. Zimmermann A, Zimmermann T, Schattenberg J, Pottgen S, Lotz J, Rossmann H, Roeddiger R, Biesterfeld S, Geiss HC, Schuchmann M, Galle PR, Weber MM. Alterations in lipid, carbohydrate and iron metabolism in patients with non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and metabolic syndrome. *Eur J Intern Med.* 2011;22(3):305-10.
 98. Vykoukal D, Davies MG. Vascular biology of metabolic syndrome. *J Vasc Surg.* 2011;54(3):819-31.
 99. Yegin ZA, Iyidir OT, Demirtas C, Suyani E, Yetkin I, Pasaoglu H, İlhan Ç, Sucak GT. The interplay among iron metabolism, endothelium and inflammatory cascade in dysmetabolic disorders. *J Endocrinol Invest.* 2015;38(3):333-8.
 100. Stechemesser L, Eder SK, Wagner A, Patsch W, Feldman A, Strasser M, Auer S, Niederseer D, Huber-Schönauer U, Paulweber B, Zandanell S, Ruhaltinger S, Weghuber D, Haschke-Becher E, Grabmer C, Rohde E, Datz C, Felder TK, Aigner E. Metabolomic profiling identifies potential pathways involved in the interaction of iron homeostasis with glucose metabolism. *Mol Metab.* 2017;6(1):38-47.
 101. Sirlin CB, Reeder SB. Magnetic resonance imaging quantification of liver iron. *Magn Reson Imaging Clin N Am.* 2010;18(3):359-81, ix.
 102. Storey P, Thompson AA, Carqueville CL, Wood JC, de Freitas RA, Rigsby CK. R2* imaging of transfusional iron burden at 3T and comparison with 1.5T. *J Magn Reson Imaging.* 2007;25(3):540-7.

103. Anderson LJ, Holden S, Davis B, Prescott E, Charrier CC, Bunce NH, Firmin DN, Wonke B, Porter J, Walker JM, Pennell DJ. Cardiovascular T2-star (T2*) magnetic resonance for the early diagnosis of myocardial iron overload. *Eur Heart J*. 2001;22(23):2171-9.
104. Virtanen JM, Komu ME, Parkkola RK. Quantitative liver iron measurement by magnetic resonance imaging: in vitro and in vivo assessment of the liver to muscle signal intensity and the R2* methods. *Magn Reson Imaging*. 2008;26(8):1175-82.
105. Kuhn JP, Meffert P, Heske C, Kromrey ML, Schmidt CO, Mensel B, Völzke H, Lerch MM, Hernando D, Mayerle J, Reeder SB. Prevalence of Fatty Liver Disease and Hepatic Iron Overload in a Northeastern German Population by Using Quantitative MR Imaging. *Radiology*. 2017;284(3):706-16.

APÊNDICE

Apêndice A - Quantidade de etanol (g) por bebida alcoólica

	Destilados	Vinho	Cerveja
Dose (mL)	40	130	300
Etanol (g)	12	12	12

Fonte: Thun M.J., Alcohol consumption and mortality among middle-aged and elderly U.S. adults, The New England of Medicine. 1997. 337(24) 1705-1714.