FABÍOLA RABELO

**Marcadores inflamatórios sistêmicos em
pacientes com doença hepática gordurosa não
alcoólica (DHGNA)**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Gastroenterologia Clínica

Orientador: Profa. Dra. Cláudia Pinto Marques Souza de
Oliveira

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Rabelo, Fabíola

Marcadores inflamatórios sistêmicos em pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) / Fabíola Rabelo. -- São Paulo, 2010.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Gastroenterologia.

Área de concentração: Gastroenterologia Clínica.

Orientadora: Cláudia Pinto Marques Souza de Oliveira.

Descritores: 1.Fígado gorduroso 2.Citocinas 3.*Diabetes mellitus* 4.Marcadores biológicos

USP/FM/SBD-032/10

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira, exemplo de dedicação ao estudo científico e que reconheceu em mim a capacidade de conduzir este estudo.

Grata pelo carinho e paciência.

À Profª Drª Wanda Regina Cally pelo seu exemplo de dedicação e inestimável apoio.

Agradeço pelas importantes sugestões que vieram contribuir e foram fundamentais na estruturação final deste trabalho.

Mestre, exemplo de ser humano e profissional.

Ao Dr. Joel Faintuch, pelo exemplo de dedicação á formação científica.

Agradeço as sugestões para realização deste estudo.

Ao Grupo Multidisciplinar de Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica da Gastroenterologia Clínica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pelo apoio e momentos descontraídos que foram fundamentais para realização deste estudo.

Ao Grupo de Gastroenterologia Clínica da Faculdade de Medicina do ABC que me propiciou a oportunidade de trilhar nos primeiros passos da Gastroenterologia.

Aos pacientes e responsáveis, pela confiança, compreensão e que voluntariamente contribuíram com a realização deste estudo.

Enfim, agradeço a todos que, de alguma forma contribuíram para a realização deste estudo.

Esta dissertação 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, Sueley Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2^a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1	Introdução	2
1.1	Definição e epidemiologia.....	2
1.2	Fatores predisponentes e fisiopatogênese.....	6
1.3	Citocinas e DHGNA.....	9
1.3.1	Fator de Necrose tumoral (TNF α).....	11
1.3.2	Interleucina-6 (IL-6).....	13
1.3.3	Interleucina 10 (IL-10).....	14
2	Justificativa.....	16
3	Objetivo.....	18
4	Casuística.....	20
4.1	Considerações Éticas.....	20
4.2	População.....	20
4.2.1	Critérios de Inclusão.....	20
4.2.2	Critérios de Exclusão.....	21
5	Métodos.....	21
5.1	Desenho experimental.....	21
5.2	Avaliação clínica.....	22
5.2.1	Provas bioquímicas e marcadores inflamatórios sistêmicos.....	23

5.2.2	Avaliação histológica.....	24
6	Análises estatísticas.....	27
7	Resultados.....	29
7.1	Dados Clínicos e Laboratoriais.....	29
8	Discussão.....	45
9	Conclusões.....	47
10	Anexos.....	49
11	Referências	57

LISTAS

ABREVIATURAS E SIGLAS

AGL	Ácidos Graxos Livres
ATP III	Adult Treatment Panel III
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CHC	Carcinoma Hepatocelular
DM	Diabetes mellitus
DHGNA	Doença hepática gordurosa não-alcóolica
EROS	Espécies reativas de oxigênio
EHNA	Esteato-hepatite não alcoólica
TNFα	Fator de necrose tumoral α
AP-1	Fator de transcrição AP-1
NF-Kβ	Fator nuclear kappa beta
FA	Fosfatase alcalina
γGT	Gama-glutamil transferase
HE	Hematoxilina-eosina
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HOMA-IR	Homeostasis model assessment - Insulin resistance
IMC	Índice de massa corpórea
IKKβ	Inhibitor Kappa beta Kinase
IRS	Insulin- receptor substrate family
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
JNK	Jun N-terminal Kinase
LTh 1/2	Linfócito T <i>helper</i> 1/2
HDL	Lipoproteína de alta densidade
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
NAS	NAFLD activity score
NAFLD	Nonalcoholic fatty liver disease
NASH	Nonalcoholic steatohepatitis
PPARα	Peroxisome proliferator-activated receptors α

PCR	Proteína C reativa
RI	Resistência Insulínica
SOCS	Sinalizador da supressão de citocinas
SM	Síndrome Metabólica
SREBP-1	Sterol regulatory element binding protein-1c

TABELAS

Tabela 1	– Classificação de Síndrome Metabólica de acordo com <i>Adult Treatment Panel (ATP III)</i>	4
Tabela 2	– Diagnóstico de <i>Diabetes Mellitus</i> pelos critérios da American Diabetes Association.....	4
Tabela 3	– Classificação de Obesidade de acordo o Índice de Massa Corpórea (IMC).....	5
Tabela 4	– Definição e escores de acordo com <i>NASH Clinical Research Network Scoring System</i> .(NAS).....	26
Tabela 5	– Características Clínico-Laboratoriais e Demográficas dos pacientes com DHGNA, de acordo com a característica histológica.....	30
Tabela 6	– Principais comorbidades, presentes na Síndrome Metabólica, dos pacientes com DHGNA, de acordo com a classificação histológica.....	31
Tabela 7	– Perfil das citocinas em pacientes com DHGNA comparados aos pacientes diabéticos.....	32
Tabela 8	– Perfil das citocinas em pacientes com DHGNA comparados com Hipertensão Arterial.....	33
Tabela 9	– Correlação das citocinas em pacientes com Esteatose Hepática.....	33
Tabela 10	– Correlação das citocinas em pacientes com Esteatohepatite não alcoólica.....	34
Tabela 11	– Correlação das Citocinas no Grupo: Não diabéticos.....	34
Tabela 12	– Correlação das Citocinas no Grupo: <i>Diabetes mellitus</i>	35

FIGURAS

Figura 1 –	Patogênese da DHGNA.....	9
Figura 2 –	EHNA: mediadores e caminhos envolvidos.....	14

RESUMO

Rabelo F. *Marcadores Inflamatórios Sistêmicos em Pacientes com Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA)* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 65p.

INTRODUÇÃO: A Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA) é atualmente a forma mais comum de doença hepática. Sem fisiopatologia totalmente esclarecida, apresenta-se na forma de esteatose, até formas mais avançadas denominadas Esteatohepatite não alcoólica (EHNA). Citocinas como TNF- α , são frequentemente mensuradas em EHNA, diferente da IL-6 e IL-10. **MÉTODOS:** Pacientes moderadamente obesos (n=80) com histologia apresentando esteatose (n=29) e EHNA (N=51). Níveis de citocinas séricas foram dosadas. O objetivo foi correlacionar a correlação das citocinas com esta população. **RESULTADOS:** Pacientes diabéticos tendem a ser mais associados com EHNA (52.5% vs 41.4%, P=0.015), sem diferença na idade, gênero ou IMC considerando esteatose. Para a população total, não houve diferenças significantes entre as citocinas, incluindo TNF- α e IL-6. Em paciente diabéticos, todas as citocinas tenderam à diminuir na EHNA, especialmente IL-10(P= 0.000). A citocina IL-10 correlacionou-se com o índice HOMA (P=0.000) e outras variáveis de homeostase no diabetes, representando assim, um marcador importante nesta doença. **CONCLUSÕES:** 1) Em geral, ocorrem mudanças inconsistentes nas citocinas quando comparados os pacientes com esteatose.2) Em contraste, baixa regulação da IL-6 e IL- 10 foram persistentes em pacientes diabéticos com NASH. 3) Hipertensão Arterial não apresentou alteração nessas circunstâncias.4) IL-10 manteve forte correlação com os índices de metabolismo glicêmico. 5) TNF- α não pode ser responsabilizado pelo dano hepático progressivo, pois seus valores não aumentaram na EHNA.6) Investigação da IL-10 e outras citocinas contra reguladoras são necessárias neste contexto e merecem mais estudos.

Descritores: 1.Fígado gorduroso 2.Citocinas 3.Diabetes mellitus 4.Marcadores Biológicos

SUMMARY

Rabelo F. *Pro- and antiinflammatory cytokines in steatohepatitis: What profile in moderate obesity with diabetes ?* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2010. 65p.

Background: Fatty liver disease is a problem of obesity in the morbid modality and even more so in nonbariatric candidates, who rely on clinical treatment only. TNF- α has been frequently measured in steatohepatitis (NASH) with or without diabetes, but less is known about IL-6 and IL-10. Methods: Moderately obese patients (n=80) with histologically proven Steatosis (n=29) and NASH (n=51) were recruited. Serum levels of cytokines were documented along with clinical information. The aim was to identify the correlates of such biomolecules in a stable population. Results: Diabetes tended to be more associated with NASH (52.5% vs 41.4%, P=0.015), with no difference of age, gender or BMI regarding steatosis. For the entire population cytokine changes were not significant, including TNF- α and IL-6. In diabetics only, all markers tended to diminish with NASH, especially IL-10 (P= 0.000). IL-10 correlated with HOMA index (P=0.000) and other variables of glucose homeostasis in diabetes, thus representing a major marker of the disease. Conclusions: 1) Generally inconsistent changes in pro- and antiinflammatory cytokines occurred when NASH was globally compared to steatosis. 2) In contrast, downregulation of IL-6 and IL-10 was perceived in diabetics with NASH. 3) Arterial hypertension did not play a role in these circumstances. 4) IL-10 maintained strong correlations with glucose metabolism indices. 5) TNF- α could not be incriminated for progressive liver damage, as values failed to increase in NASH. 6) Investigations of IL-10 and other counterregulatory cytokines are lacking in this context and deserve further studies.

Descriptors: 1.Fatty liver 2.Cytokines 3.Diabetes mellitus 4.Biological markers

1 INTRODUÇÃO

1.1 Definição e epidemiologia

A Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica (DHGNA) é considerada uma epidemia mundial, representando a forma mais comum de doença hepática na atualidade. Inicialmente, esta doença foi considerada de curso benigno, contudo, hoje se sabe que a esteatose pode evoluir para esteato-hepatite (EHNA), fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular em pacientes sem história prévia de etilismo ^{1,2}.

A DHGNA tem elevada prevalência em países industrializados com um aumento significativo em países em desenvolvimento. A prevalência de DHGNA está estimada em 10 a 40% nos estudos de populações da América do Norte, América do Sul, Japão, Europa, Austrália, enquanto que a prevalência em estudos de autópsia, realizados nos Estados Unidos, é de aproximadamente 20% ³.

Esteatose Hepática (EH) constitui uma das alterações hepatocelulares mais freqüentes, em biópsias hepáticas. Nos Estados Unidos e em outros países ocidentais, estudos baseados em biópsias e exames de imagem sugerem que 20% a 30% dos adultos apresentam acúmulo excessivo de gordura nos tecidos hepáticos, sendo que aproximadamente 2-5% destes indivíduos apresentam diagnóstico histológico de EHNA ⁴.

A EHNA foi descrita inicialmente na década de 80 por Ludwig e colaboradores como uma entidade clínico-patológica caracterizada por alterações histológicas que se assemelham àquelas encontradas na doença alcoólica do fígado (DAF) como: esteatose macro e microvesicular, infiltrado inflamatório lobular misto, balonização hepatocelular em área da veia centrolobular (Zona III), podendo apresentar fibrose pericelular, corpúsculos de Mallory e cirrose. Esses aspectos morfológicos são indiferenciáveis da doença hepática alcoólica, ocorrendo contudo, mesmo em indivíduos cujo consumo diário de álcool for inferior a 20 gramas por dia ^{5,6}.

Na população geral, EHNA, forma de maior importância clínica da DHGNA, tem prevalência estimada em torno de 1.2% a 4.8%. Entretanto, sua frequência aumenta consideravelmente em pacientes portadores da síndrome metabólica ^{2,7,8}. A Síndrome Metabólica pode ser definida segundo os critérios diagnósticos do ATP III (*Adult Treatment Panel III*), quando três ou mais dos seguintes critérios estiverem presentes: obesidade abdominal (visceral), medida ao nível médio do abdome: cintura > 102 cm em homens e > 88 cm em mulheres; Hipertrigliceridemia: ≥ 150 mg/dL; HDL colesterol: < 40 mg/dL em homens e < 50 mg/dL em mulheres; Hipertensão arterial sistêmica > 130/85 mmHg; Glicemia de jejum: > 110 mg/dL ⁹ -Tabela 1.

Tabela 1 – Critérios para o diagnóstico de Síndrome Metabólica (ATP III, 2001) ⁹

Circunferência Abdome	Homens > 102 cm; Mulheres > 88 cm
Triglicerídeos	≥ 150 mg/dL ou uso de medicação
HDL	Homens < 40 mg/dL e Mulheres < 50 mg/dL
Pressão Arterial	≥ 130/85 mmHg ou uso de medicação
Glicemia de jejum	≥ 110 mg/dL ou uso de medicação

Tabela 2 – Critérios Diagnósticos para *Diabetes Mellitus*

Glicemia de Jejum	Classificação
70 – 99	Normal
100 – 125 mg/dL	Alteração glicemia de jejum
>126 mg/dL	<i>Diabetes Mellitus</i>
Teste oral de tolerância à glicose (75g) >200 mg/dL em 120 minutos	<i>Diabetes Mellitus</i>

FONTE: American Diabetes Association (IDF, 2004) ⁽¹⁰⁾

(Grundy SM, Hansen B, Smith SC, Cleeman JI, Kahn RA et al. Clinical management of metabolic syndrome: report of the American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute/American Diabetes Association conference on scientific issues related to management. *Circulation*. 2004;109(4):551-6.)

Além disso, a própria obesidade, independentemente dos outros fatores, aumenta a prevalência da síndrome metabólica, sendo esta última proporcional ao aumento do índice de massa corporal, variando de 18% em indivíduos com peso normal para 67% em obesos ^{11,12}.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a obesidade é definida e classificada de acordo com o Índice de Massa Corpórea (IMC) ¹³.

Tabela 3 – Classificação de Obesidade de acordo com o Índice de Massa Corpórea (ICM)

IMC (Kg/ m ²)	Classificação
< 18,5	Baixo peso
18,5- 24,9	Eutrófico
25,0- 29,9	Pré- obesidade
30,0- 34,9	Obesidade grau I
35,0- 39,9	Obesidade grau II
≥ 40,0	Obesidade grau III

Estima-se que 13% dos portadores de EHNA possam evoluir para fibrose, cirrose e suas complicações, num intervalo de 7 a 10 anos de seguimento ¹⁴. A associação entre diabetes mellitus e obesidade também é reconhecida como causa de risco adicional: 50% dos portadores dessas doenças apresentam EHNA, 19% dos quais em estágio de cirrose hepática, e estima-se que 3% dos pacientes com esteatose isolada possam evoluir para cirrose ¹⁵.

A DHGNA também é associada com *diabetes mellitus* tipo 2 (DM) e intolerância à glicose, com ou sem sobreposição de obesidade, contudo a associação de DM2 e DHGNA parece maior em morbidade em pacientes obesos ¹⁶. Intolerância à glicose, hiperglicemia ou DM2 tem sido descritas em 20% a 75% dos pacientes adultos com EHNA e pode aumentar o risco de EHNA mais de duas vezes, comparados aos não diabéticos. A DHGNA tem sido associada à resistência insulínica e hiperinsulinemia, mesmo em pacientes magros com tolerância a glicose normal ⁸. A DM2 pode ser um preditor independente de DHGNA avançada, incluindo cirrose e carcinoma hepatocelular ^{11,17,18}.

No Brasil, um estudo multicêntrico realizado pela Sociedade Brasileira de Hepatologia, computou 1280 casos de DHGNA, dos quais 437 biopsiados, encontrou-se em 31% EHNA ¹⁹. Essa prevalência correlaciona-se, provavelmente, ao aumento das taxas de obesidade, DM2 e síndrome metabólica na nossa população na última década.

1.2 Fatores predisponentes e fisiopatogênese

Os fatores predisponentes relacionados à DHGNA dividem-se basicamente em dois grupos:

- a) Primários: associados à síndrome metabólica (obesidade, diabetes mellitus tipo 2 ou resistência insulínica, adiposidade visceral, dislipidemia e hipertensão arterial). Ressalta-se que a obesidade tem sido descrita como fator de risco independente para o desenvolvimento de EHNA ¹¹.
- b) Secundários: associados ao uso de nutrição parenteral total prolongada, desnutrição, perda de peso rápida e acentuada, uso de drogas como amiodarona, corticóide, tamoxifen, lipodistrofias, abetalipoproteinemia, doença de Wilson, exposição ocupacional à substâncias voláteis tóxicas, entre outras.

Algumas hipóteses podem ser consideradas para explicar a fisiopatogênese da DHGNA e sua evolução para EHNA, destacando-se a teoria dos “múltiplos hits” que apontam a resistência insulínica como

condição inicial (“first hit”) para o acúmulo de ácidos graxos no hepatócito^{20,21}, e os estímulos subsequentes para o desenvolvimento de inflamação e fibrose, como o estresse oxidativo, a ativação de citocinas inflamatórias, o estresse do Reticulo endotelial, entre outros (“multiples hit”)²²⁻²⁴.

Segundo esta hipótese, a insulina, hormônio que favorece a lipogênese e inibe a lipólise, inclusive no fígado, promoveria condições predisponentes para a infiltração gordurosa daquela glândula. Alguns trabalhos demonstram forte associação entre resistência insulínica e progressão para formas mais severas de EHNA e cirrose^{20,21}. Desta forma, a esteatose hepática (condição inicial) seria resultante de uma combinação de fatores: predisposição gênica, aberrações na lipólise pós-prandial relacionada à insulina com aumento de ácidos graxos livres, excesso de carboidratos na dieta resultando em uma nova síntese hepática de ácidos graxos, falha na β -oxidação mitocondrial e depleção de adenosina trifosfato, além de um complexo mecanismo deficiente de transporte de triglicérides.

O aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (EROS), conseqüente ao excesso de ácido graxo no hepatócito direcionado para a mitocôndria para ser oxidado, seria importante na evolução de esteatose para esteatohepatite e fibrose^{25,26}. O estresse oxidativo se estabelece quando as defesas intracelulares anti-oxidantes são insuficientes para detoxificar os EROS ou, também, quando há produção excessiva de EROS.

Dentro desse contexto, o excessivo aporte de ácidos graxos ao fígado pode promover esgotamento da oxidação mitocondrial e aumento na produção de EROS, bem como a ativação de outras vias de oxidação

lipídica (via peroxissomal e microssomal) que geram por sua vez mais EROS, aumentando o estresse oxidativo hepático. Esse aumento pode causar peroxidação lipídica, cujos produtos intermediários (hidroxinonemal e malonaldeído) são importantes agentes pró-inflamatórios e ativam fibroblastos, favorecendo a fibrogênese (“multiple hit”) ²⁵⁻²⁸. Outro estímulo importante, além do estresse oxidativo, na progressão para inflamação e fibrose na DHGNA, seria a endotoxemia crônica presente principalmente na obesidade. O tecido adiposo não é mais considerado um tecido inerte como reserva de energia ou excesso de ácidos graxos livres e sim um órgão endócrino altamente ativo que origina inúmeros produtos secretórios, coletivamente chamados de adipocinas ou adipocininas ²⁹ - Figura 1

Recentemente, se tem discutido que a teoria dos múltiplos “hits” seja, na verdade, teoria de um único “hit”. O próprio estresse oxidativo, assim como o estresse do retículo endoplasmático, a endotoxemia e as citocinas poderiam preceder as alterações do metabolismo lipídico e mitocondriais, provocando esteatose ³⁰.

FONTE: Modificado de Cheung et al. Curr Opin in Gastroenterol, 2009.

Figura 1 – Patogênese da DHGNA

1.3 Citocinas e DHGNA

Citocinas são proteínas de baixo peso molecular com diversas funções metabólicas e endócrinas que participam da inflamação e resposta do sistema imune. A principal fonte são as células imunológicas, porém elas são produzidas por quase todos os órgãos e tecidos, inclusive tecido adiposo subcutâneo, assim como o visceral. Estão envolvidas na fisiologia do fígado saudável e na fisiopatologia de muitas doenças hepáticas, tanto agudas como crônicas³¹.

A elevação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias também está demonstrada em obesos livres de traumas, infecções, artropatias crônicas,

moléstias auto-imunes e derivação jejuno-ileal^{32,33}. O conceito de inflamação relacionado à obesidade e resistência insulínica remonta de 1993, quando se demonstrou que os adipócitos expressavam o TNF- α (Fator de Necrose Tumoral alfa), uma citocina pró- inflamatória, que se encontrava aumentada em animais obesos, cuja neutralização, levava à diminuição da resistência insulínica nesses animais. Assim, estabeleceu-se a primeira conexão entre aumento de expressão e da concentração plasmática de citocina pró-inflamatória e resistência insulínica³⁴.

A importância da gordura visceral na patogênese da resistência insulínica hepática e da esteatose foi demonstrada em elegantes estudos de modelos animais, que incluíram camundongos ob/ob. Nesses animais, com deficiência de leptina, a ressecção cirúrgica de gordura intrabdominal reverteu tanto a resistência insulínica quanto a esteatose³⁵.

Poorten et al demonstraram que a gordura visceral está diretamente associada a inflamação hepática e fibrose, independentemente da resistência insulínica e grau de esteatose. Contrariamente, a redução de peso é acompanhada da diminuição e até mesmo normalização nas citocinas^{36,37}.

A obesidade e a síndrome metabólica são condições inflamatórias que conduzem a aterosclerose e a um processo inflamatório crônico³⁸⁻⁴⁰. A concentração sérica de proteína C reativa (PCR) é utilizada como marcador de reação de fase aguda inflamatória, e tem sido usada em pacientes com Síndrome Metabólica, para avaliação do risco cardiovascular, correlacionando elevadas concentrações de PCR à maior risco de

inflamação crônica no endotélio vascular e ateromatose cardiovascular ⁴¹. Abiru et al confirmaram que pacientes com EHNA com maior grau de inflamação tinham maiores concentrações de PCR do que aqueles com EHNA quiescente (grau I) ou esteatose simples ⁴².

1.3.1 Fator de Necrose tumoral (TNF- α)

O TNF- α é atualmente uma das citocinas mais bem estudadas. Consiste em uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente pelos macrófagos, linfócitos e também por células do tecido adiposo. Embora, trabalhos iniciais com ratos demonstraram que o TNF- α desempenhava um papel fundamental na patogênese da lesão hepática pelo álcool ⁴³, mais recentemente em seres humanos, níveis de TNF- α se relacionam com o grau de resistência insulínica ⁴⁴, e polimorfismos desta citocina estavam associados com suscetibilidade à resistência insulínica e DHGNA ⁴⁵. Por outro lado, a importância do TNF- α tem sido realçada pela observação de que terapias anti- TNF- α atenuam a DHGNA em modelos animais embora com resultados controversos ^{46,47}.

Os mecanismos intracelulares e moleculares responsáveis pela indução, através do TNF- α , da resistência insulínica e da sobrecarga lipídica nas células hepáticas estão sendo elucidados. Dois mecanismos têm sido descritos no desenvolvimento da resistência insulínica: 1) ativação do receptor de superfície celular do TNF- α , que ativa fatores de transcrição intracelulares, entre eles Jun N-kinase (JNK) e inibidor da kappa beta kinase

(IKK β); 2) translocação intranuclear de Fator de Transcrição AP-1 e Fator de Transcrição Nuclear (NF-K β), resultando no aumento da produção de citocinas inflamatórias provocando um efeito em cascata. Além disso, a sensibilidade da insulina está prejudicada pela fosforilação do receptor de insulina-1 (IRS-1) mediada pelo JNK ⁴⁸ - Figura 2.

Um grande número de evidências tem ratificado um papel central do TNF α e outras citocinas na progressão de esteatose para EHNA. Exemplos disto são que ratos geneticamente deficientes de receptores de TNF tipo 1(TNFR-1) são resistentes a esteatose e a danos hepáticos induzidos por duas diferentes dietas: uma rica em carboidratos e outra deficiente em colina e metionina (MCD) ⁴⁹⁻⁵⁰.

Outro mecanismo molecular de lesão do TNF- α na DHGNA, inicia-se no aumento de ácidos graxos livres (AGL) circulantes, vindos do tecido adiposo, os quais provocam translocação intracelular de Bax, um membro pró-apoptótico das células B (Bcl-2), no lisossomo. Ocorre aumento da permeabilidade lisossomal com conseqüente liberação da cisteína protease catepsina B. Esta, por sua vez, desencadeia uma cascata culminando na ativação do NF-K β e sua translocação no núcleo, promovendo a síntese de TNF α perpetuando o processo. A catepsina B também promove disfunção mitocondrial levando a apoptose ^{51,52}.

1.3.2 Interleucina-6 (IL-6)

A IL-6 é produzida por diversos tipos de células (monócitos, fibroblastos, células endoteliais) e alguns tecidos, como o tecido adiposo (15 a 30% da produção total circulante, na ausência de inflamação aguda) ⁵³.

Na patogênese da DHGNA, o papel da IL-6 é ainda pouco compreendido. Vários estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que o fígado é o principal alvo da IL-6, à qual pode inibir os sinalizadores de insulina (IRS-1, IRS-2) com subsequente hiperglicemia e hiperinsulinemia compensatória. Além disso, a super expressão dos sinalizadores de supressão das citocinas (SOCS-1 e SOCS-3) no fígado também pode inibir os IRS-1 e IRS-2, através da degradação mediada pelo ubiquitina e, ainda, SOCS-3 pode levar ao aumento de um regulador chave na síntese de ácidos graxos no fígado, o Fator de Transcrição SREBP-1c ⁵⁴ - Figura 2.

A expressão hepática de IL-6 é maior em pacientes com DHGNA, e está associada com a gravidade da doença ⁵⁵.

Embora a IL-6, agudamente, leve a uma melhora na regeneração do dano hepático, a exposição crônica pode, não apenas abolir este efeito protetor, como também sensibilizar o fígado á injúria por apoptose e consequente morte celular ⁵⁶.

FONTE: Modificado de Tilg et al. Gastroenterology, 2006.

Figura 2 – EHNA: mediadores e caminhos envolvidos.

1.3.3 Interleucina 10 (IL-10)

Citocina antiinflamatória que atua como modulador endógeno de inflamação em diversos tecidos e órgãos. A IL-10 foi primeiramente descrita como fator inibidor da síntese de citocinas, uma atividade produzida por células *T helper* tipo 2 (Th2) de rato que inibiram a ativação e a produção de citocinas por células *T helper* tipo 1 (Th1). A capacidade da IL-10, de inibir a produção de citocinas por células T e células *natural killer* (NK) parece ser indireta, através da inibição de células acessórias (macrófagos) de monócitos. Estes estudos foram logo se estendendo e mostraram que a IL-10 inibe um amplo espectro de macrófagos ativados de monócitos ⁵⁷. Com os

primeiros estudos clínicos iniciais utilizando recombinantes IL-10 não obtiveram sucesso, parte do interesse nesta citocina, como um antiinflamatório terapêutico diminuiu. Porém, novos estudos pré-clínicos sugerem que as terapias utilizando anticorpos para IL-10, juntamente com quimioterapia, podem ser eficazes no tratamento de doenças bacterianas, virais e até neoplásicas ⁵⁸.

Recentemente, um estudo mostrou que em modelo animal com dieta hipergordurosa, a inibição da IL-10 promove um aumento da expressão de citocinas inflamatórias e piora a sinalização de insulina ⁵⁸. Contrariamente, outro estudo envolvendo ratos sob regime com dieta rica em gordura, mostrou que a IL-10 foi fator de proteção apenas de esteatose, mas não da resistência insulínica ⁵⁹.

2 JUSTIFICATIVA

A biópsia hepática ainda é o único método confiável para confirmar esteato-hepatite em pacientes com enzimas hepáticas cronicamente elevadas e exames de imagem detectando esteatose. É também o melhor método de avaliar fibrose hepática, um marcador chave na progressão da doença, em pacientes com EHNA quando não há sinais clínicos que sugiram cirrose. A biópsia hepática, entretanto é invasiva, de custo elevado e não isento de riscos, com taxa de morbidade de 1- 5% e taxas de mortalidade entre 1:1000 e 1:10.000 ⁶⁰. Além disso, não há consenso quanto á realização de tal procedimento, pois ainda não existe tratamento bem estabelecido ²⁹.

Desta forma, a pesquisa da associação de marcadores inflamatórios sistêmicos poderia definir pacientes com maior risco para desenvolver EHNA e cirrose, com isso, caracterizando de ferramentas disponíveis e não invasiva no diagnóstico precoce de patologia tão prevalente quanto a DHGNA.

3 OBJETIVOS

- 1) Avaliar o significado clínico das concentrações séricas de marcadores inflamatórios sistêmicos em pacientes com DHGNA.
 - 2) Estabelecer marcadores séricos clinicamente úteis para distinguir pacientes com EHNA daqueles com simples esteatose.
 - 3) Verificar se pacientes com EHNA diabéticos apresentam diferenças significantes nos marcadores bioquímicos inflamatórios, comparados com indivíduos com EHNA não diabéticos.
-

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Considerações éticas

O protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão Ético-Científica do Departamento de Gastroenterologia e CAPPesq do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (nº1351/06) em 27/03/2007.

4.2 População

Foram incluídos 80 pacientes portadores de DHGNA (29 pacientes com esteatose e 51 pacientes com esteato-hepatite) com biópsias hepáticas realizadas no período de Janeiro de 2005 à Janeiro de 2007, provenientes do ambulatório de Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica da Disciplina de Gastroenterologia do HC-FMUSP.

4.2.1 Critérios de Inclusão

- Biópsia compatível com DHGNA
 - Idade entre 15-75 anos, ambos os sexos
 - Consentimento informado
-

4.2.2 Critérios de Exclusão

- Outras causas de hepatopatia crônica, como: Esquistossomose, Hepatites Virais, Hepatite Autoimune, Doença de Wilson, Deficiência de alfa 1-antitripsina, Hemocromatose e Ingesta de álcool (>140g etanol/semana).
- Uso de medicamentos hepatotóxicos nos últimos 6 meses
- Doenças hepáticas descompensadas
- Presença de Neoplasias
- Intoxicação exógena por agentes oxidantes- polifenóis e derivados de petróleo
- Gravidez e lactação
- Infecções respiratória, urinária, gastrointestinal ou de outra localização
- Inflamação clinicamente manifesta
- Cirurgia, trauma ou hospitalização nos últimos 30 dias
- Recusa em colaborar com a pesquisa

5 Métodos

5.1 Desenho experimental

Fase I – Procedeu-se a um questionário clínico, exame físico geral e nutricional, provas bioquímicas gerais, de enzimas hepáticas,

função hepática, sorologias virais, e pesquisa de marcadores inflamatórios sistêmicos, com ênfase na correta caracterização dos critérios de inclusão e exclusão. As análises laboratoriais foram realizadas pelo Laboratório Central do Hospital das Clínicas da FMUSP. Todos os pacientes foram submetidos à ultrasonografia de abdômen superior e apresentaram sinais compatíveis com a presença de esteatose.

Fase II – Foi realizada a avaliação histopatológica minuciosa da biópsia hepática dos pacientes e, tendo em vista a lenta evolução da DHGNA, foram incluídas as biópsias realizadas até 02 (dois) anos do início do projeto.

5.2 Avaliação clínica

Os dados demográficos como gênero, altura e peso foram obtidos no tempo da biópsia hepática. O índice de Massa Corpórea foi calculado pela fórmula de Quetelet [$IMC = \text{peso em Kg} / (\text{altura em m})^2$].

A presença de comorbidades (hipertensão arterial sistêmica, *diabetes mellitus*, hipertrigliceridemia) e síndrome metabólica foram definidas de acordo com o ATP III (*Adult Treatment Panel III*). Para avaliação de resistência insulínica (RI) foi usado o HOMA (*Homeostasis Model Assessment*) ($\text{glicose de jejum [mg/dl]} / 18 \times \text{insulina de jejum } [\mu\text{U/mL}] / 22.5$). Foi utilizado como marcador de RI o índice HOMA, quando maior ou igual à

03⁹. Este índice não foi avaliado naqueles pacientes que estavam em uso de insulina (13% da amostra).

5.2.1 Provas bioquímicas e marcadores inflamatórios sistêmicos

Os seguintes exames foram realizados, no soro, em uma única visita, ao tempo do exame de biópsia hepática: hemograma completo, lipidograma, coagulograma, proteína total e frações, aspartato aminotransferase (AST), alanino aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), gama-glutamil transpeptidase (GGT), bilirrubina total e frações, glicemia, insulina, marcadores para hepatite B e C, auto-anticorpos hepáticos, cobre e ceruloplasmina sérica, perfil de ferro. Além disso, foram solicitados, exames parasitológico de fezes e pesquisa de ovos de *Schistosoma Mansoni* (Kato-Katz), caso ainda não tivessem sido realizados.

A dosagem sérica das citocinas; TNF- α , IL-6 e IL-10 foram realizadas no Laboratório de Investigação Médica (LIM51) da FMUSP e coletados pela manhã (8-9h) após jejum de 12 horas em grupos de pacientes incluídos no estudo, em dias de retorno ambulatorial. As dosagens desses marcadores foram medidas por imunoensaio (ELISA), através de *Kits* comerciais (R&D Systems, Inc., Minneapolis, Minn.) em 96 “plates” (Nunc Immunoplate Maxisorb; Nunc, Neptune, N.J.).

5.2.2 Avaliação histológica

A biópsia hepática foi avaliada por um único observador, um hepatopatologista experiente, que procedeu à avaliação do material, sem prévia notificação dos dados clínico-laboratoriais correspondentes. Fragmentos de tecido hepático 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), conforme método adotado na divisão de Anatomia Patológica do HC-FMUSP.

A avaliação histopatológica foi baseada na classificação padronizada por meio da revisão pelo *Pathology Committee of the NASH Clinical Research Network* Scoring System (NAS) que designou e validou as características histológicas e um sistema de escore de atividade para DHGNA em estudos clínicos ⁶¹. Histologicamente, o escore é calculado utilizando basicamente a soma de três parâmetros: esteatose, em graus de 0 a 3; inflamação lobular, em graus de 0 a 3 e balonização em graus de 0 a 2. Os valores variam de 0 a 8. Os valores $NAS \geq 5$ correlacionam-se com o diagnóstico de EHNA, enquanto que aqueles com valores menores que 3 excluem o diagnóstico de EHNA. Os pacientes que, entretanto, apresentam valores de 3 ou 4, não podem ser alocados, com certeza, em grupos que apresentam ou não o diagnóstico de EHNA.

A presença de fibrose e outros achados se tornam variáveis histológicas que facilitam a compreensão das alterações encontradas como um todo.

No estadiamento das alterações estruturais, atribui-se o Grau 4 (quatro) para casos com septos de fibrose determinando nódulos ou quando já havia cirrose estabelecida. Os graus são atribuídos integrando-se densidade celular e tecidual das variáveis, considerando-se que a distribuição na amostra é freqüentemente heterogênea. Assim, a gradação resulta tanto da freqüência com que a variável se apresenta, como também da dimensão de sua expressão.

Tabela 4 – Definição e escores de acordo com NASH Clinical Research Network Scoring System ⁶¹.

	DEFINIÇÃO	SCORE
ESTEATOSE		
GRAU	<5%	0
	5%-33%	1
	>33%-66%	2
	>66%	3
FIBROSE		
ESTADIO	Ausente	0
	Perissinusoidal ou periportal	1
	Leve, zona 3, perissinusoidal	1A
	Moderada, zona 3, perissinusoidal	1B
	Portal/periportal	1C
	Perissinusoidal e portal/periportal	2
	Pontes de fibrose	3
	Cirrose	4
INFLAMAÇÃO		
INFLAMAÇÃO LOBULAR	Sem foco	0
	<2 focos por campo de 200X	1
	2-4 focos por campo de 200X	2
	>4 focos por campo de 200X	3
INFLAMAÇÃO PORTAL	Ausente a mínima	0
	Frequente	1
LESÃO HEPATOCELULAR		
BALONIZAÇÃO	Ausente	0
	Poucas células com balonização	1
	Muitas células / balonização proeminente	2
OUTROS ACHADOS		
CORPÚSCULOS HIALINOS DE MALLORY	Ausente a mínima	0
	Frequente	1
GLICOGENAÇÃO	Ausente a mínima	0
	Frequente	1

NOTA: O escore da atividade da NAFLD (NAS) proposto pelo *Pathology Committee of the NASH Clinical Research Network*. Os valores NAS ≥ 5 correlacionam-se com o diagnóstico de NASH e o escore menor 3 diagnosticados não NASH, e os valores de 3 e 4 podem ser alocados nas categorias de ausências, presença ou provável ENA ⁶¹.

6 Análise estatística

As variáveis quantitativas foram representadas por média, desvio padrão (DP), valores mínimo e máximo e as qualitativas ou semiquantitativas por frequência absoluta (n) e relativa (%). A escolha entre t-Student e Wilcoxon foi feita com base no teste de Kolmogorov - Smirnov para a normalidade (distribuição Normal) das covariáveis. Na mesma linha, a análise de regressão linear (correlação de Pearson ou Speaman) foi utilizada, complementada com regressão logística das variáveis qualitativas. Foi utilizada a versão 10.0, SPSS da Windows (Chicago, IL, USA). Adotou-se o nível de significância de $P < 0,05$.

7 RESULTADOS

7.1 Dados clínicos e laboratoriais

Ao avaliarmos globalmente os pacientes com DHGNA, houve predomínio do sexo feminino (M:F 26:54) e a idade média dos pacientes foi de 56 ± 9 anos. Esteatose foi encontrada na biópsia hepática em 29 pacientes (36%) e esteatohepatite não alcoólica em 51 (64%).

Dentre as enzimas hepáticas, a principal alteração foi relacionada com a gama-glutamil transpeptidase (GGT) em 63% dos pacientes com DHGNA, tendo se mostrado maior no grupo com EHNA quando comparado com o grupo esteatose ($p=0,05$). As aminotransferases alanino aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) apresentaram-se alteradas em 56% e 53% dos casos, respectivamente, nos pacientes com DHGNA. Quando os grupos foram divididos em esteatose e EHNA, a AST foi maior nos pacientes com EHNA ($p=0,0022$).

Os resultados também mostraram uma tendência a maiores alterações no grupo EHNA na avaliação da ALT ($p= 0,065$) e Índice HOMA ($P=0,089$), porém, não houve significância estatística. Ressaltamos que a glicemia sérica obtida discriminou o grupo de pacientes com EHNA quando comparada ao grupo com esteatose. ($p= 0,0158$) Tabela 5.

O nível de colesterol total, embora elevado em aproximadamente 75% dos pacientes (Tabela 6), não mostrou diferença significativamente estatística na comparação dos grupos. Ressaltamos que no estudo das frações do colesterol, a lipoproteína de alta densidade (HDL) se mostrou significativamente menor no grupo EHNA quando comparada ao grupo esteatose ($p < 0,0001$). A determinação dos níveis de triglicérides (TGL) não discriminou os grupos estudados (Tabela 5).

Tabela 5 – Características Clínico-Laboratoriais e Demográficas dos pacientes com DHGNA, de acordo com a característica histológica.

Variável	ESTEATOSE(n=29)	EHNA (n=51)	p
Idade (anos)	55.7±12.4	56.1±7.8	0.617
Sexo feminino	19 (65.5%)	35 (68.6%)	0.97
Glicemia (mg/dL)	118.5±59.8	127.2±50.9	0.016*
Insulina (µU/mL)	19.8±22.7	18.1±9.4	0.185
HOMA-índice	6.5± 10.0	6.1±5.9	0.089
Hemoglobina (g/dL)	13.5±1.5	14.2± 1.5	0.115
Leucócitos (/mm ³)	7478±2156	6906 ±2233	0.228
AST (U/L)	35.6±28.3	44.3±38.8	0.002*
ALT (U/L)	49.6±45.2	60.3±41.9	0.065
GGT (U/L)	47.0±33.0	121.6±169.4	0.005*
Colesterol Total(mg/dL)	201.7±38.2	192.8±45.5	0.358
HDL (mg/dL)	58.7±11.1	50.8±14.2	0.000*
LDL(mg/dL)	124.5±46.0	110.8±35.7	0.295
Triglicérides (mg/dL)	176.0±95.2	159.6±78.4	0.395

* $p < 0.05$ Esteato-hepatite x Esteatose

NOTA: IMC: índice de massa corpórea; AST: aspartato amino transferase; (Normal- M: 10-34 F: 10-30 U/L), ALT: alanino aminotransferase (Normal – M: 10-44 F: 10-36U/L); GGT: gamaglutamil transpeptidase; (Normal-M:11-50 F:7-32 U/L); HOMA: *Homeostasis model assessment* (Normal $\leq 3,0$)

A prevalência de síndrome metabólica, de acordo com os critérios do ATPIII, foi de 62% (50 pacientes), sendo 51%¹⁵ do grupo esteatose e 68%³⁵ do grupo esteatohepatite.

O diagnóstico de *Diabetes mellitus* foi feito em 43 dos pacientes (57%), sendo mais freqüente no grupo EHNA, porém, sem diferença significativamente estatística (Tabela 6). Dentre os pacientes diabéticos, seis (13%) faziam uso de Insulina.

Apontamos para o fato de que, entre os fatores componentes da Síndrome Metabólica estudados, somente a Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) se mostrou com alterações significativamente maiores nos pacientes do grupo EHNA ($p=0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6 – Principais comorbidades, presentes na Síndrome Metabólica, dos pacientes com DHGNA, de acordo com a classificação histológica.

DESCRIÇÃO	ESTEATOSE (n= 29)	EHNA (n= 51)	<i>p</i>
Diabetes	12 (41.4%)	31 (52.5%)	0.15
Colesterol Total	22 (75.9%)	38 (74.5%)	0.89
Hipertensão Arterial	16 (59.3%)	42 (82.4%)	0.05*
IMC (kg/m²)	30.0±5.4	31.7±5.2	0.102

$p<0.05$ Esteato-hepatite x Esteatose

As dosagens das citocinas séricas, na avaliação dos dois grupos esteatose e EHNA, não apresentou diferença significativamente estatística (Tabela 7).

Estudando-se apenas os resultados dos pacientes diabéticos, verificamos que, tanto o TNF- α quanto a IL-10 tendem a mostrar dosagens menores no grupo EHNA, com valores de p próximos da significância estatística (Tabela 7).

Tabela 7 – Perfil das citocinas em pacientes com DHGNA comparados aos pacientes diabéticos.

População	Grupo DHGNA	Grupo Diabéticos
Esteatose (IL-6)	3.8 $\pm$ 3.1	5.2 $\pm$ 4.0
EHNA (IL-6)	3.3 $\pm$ 2.0	3.0 $\pm$ 1.0
p	0.940	0.247
Esteatose (TNF-α)	12.9 $\pm$ 21.6	17.2 $\pm$ 28.2
EHNA (TNF-α)	8.9 $\pm$ 16.3	8.8 $\pm$ 18.7
p	0.881	0.088
Esteatose (IL-10)	28.1 $\pm$ 34.1	38.3 $\pm$ 49.3
EHNA (IL-10)	21.3 $\pm$ 14.5	17.9 $\pm$ 10.0
P	0.587	0.060

NOTA: EHNA: esteatohepatite não alcoólica
Todos os valores são dados em pg/ml

O papel da hipertensão arterial, relacionado às citocinas, também foi estudado. A citocina TNF- α foi modestamente mais elevada em pacientes hipertensos, tanto com esteatose quanto com EHNA, mas uma significância estatística não ocorreu com esta variável (3.3 $\pm$ 1.9 versus 2.4 $\pm$ 0.8 pg/mL, P=0.169 e 3.1 $\pm$ 1.2 versus 2.6 $\pm$ 0.6 pg/mL, p=0.277) (Tabela 8).

Tabela 8 – Perfil das citocinas em pacientes com DHGNA comparados com Hipertensão Arterial.

População	Hipertensos	Não Hipertensos	<i>p</i>
Esteatose(TNF-α)	3.3 $\pm$ 1.9	2.4 $\pm$ 0.8	0.169
EHNA (TNF-α)	3.1 $\pm$ 1.2	2.6 $\pm$ 0.6	0.277

NOTA: EHNA: esteatohepatite não alcoólica

TNF- α , fator de necrose tumoral- α ;

Todos os valores são dados em pg/ml

A Tabela 5 mostra a relação das citocinas nos pacientes com Esteatose . Verificamos que a IL-10 apresentou relação significativamente estatística com as variáveis: glicemia, índice HOMA e dosagem de TGL. O TNF- α apresentou relação com significância estatística com os níveis de colesterol total e TGL, enquanto a IL-6 apresentou relação com significância estatística apenas com lipoproteína de baixa densidade (LDL).

Tabela 9 – Correlação das citocinas em pacientes com Esteatose Hepática.

Variável	IL 10 (<i>r</i> *)	TNF- α (<i>r</i> *)	IL-6 (<i>r</i> *)	<i>p</i>
Glicemia	0.364*	0.147	0.169	0.048
HOMA índice	0.422*	0.260	0.080	0.028
Colesterol Total	0.321	0.409*	0.187	0.033
LDL	0.097	0.213	0.475*	0.010
Triglicérides	0.381*	0.366 [§]	-0.037	*0.040/ [§] 0.048

NOTA: *r**: índice de correlação

Associação significativa com valor de *p* mais alto

HOMA: Homeostasis model assessment; LDL: lipoproteína de baixa densidade

Considerando os pacientes com EHNA, os níveis de IL-10 apresentaram relação com Diabetes e Colesterol Total. Demais citocinas

estudadas não apresentaram relação significativa nos pacientes com esteatohepatite (Tabela 10).

Tabela 10 – Correlação das citocinas em pacientes com Esteatohepatite não alcoólica.

Variável	IL 10 (r *)	TNF- α (r *)	IL-6 (r *)	p
Diabetes	-0.394*	-0.230	-0.251	0.002
Colesterol Total	-0.360*	-0.205	-0.240	0.009

NOTA: r*: índice de correlação;
Associação significativa com valor de p mais alto

Os grupos EHNA e esteatose foram subdivididos em diabéticos e não diabéticos com o objetivo de estudar a relação, nesses subgrupos, das citocinas com diversos parâmetros clínicos e bioquímicos, como mostram as Tabelas 11 e 12.

A Tabela 11 mostra uma relação significativamente estatística de IL-10 e TNF- α com a glicemia, assim como da IL-6 com as aminotransferases.

Tabela 11 – Correlação das Citocinas no Grupo: Não diabéticos.

Variável	IL 10 (r *)	TNF- α (r *)	IL-6 (r *)	p
Glicemia	0.400*	0.437 ^s	0.247	*0.037/ ^s 0.024
AST	0.159	0.067	0.401*	0.037
ALT	0.079	0.030	0.444*	0.023

NOTA: r*: índice de correlação;
Associação significativa com valor de p mais alto
Valores das citocinas dados em pg/ml
AST: aspartato amino transferase; (Normal- M: 10-34 F: 10-30 U/L) ALT: alanino aminotransferase (Normal – M: 10-44 F: 10-36U/L)

Na avaliação do grupo de Diabéticos, verificamos que o principal indicador foi a IL-10, a qual apresentou relação altamente significativa com Índice HOMA ($p=0.000$), além da glicemia, insulina, ALT e TGL.

Houve relação significativamente estatística na avaliação do TNF- α com a idade e Síndrome Metabólica, assim como da IL-6 com o LDL. Na avaliação, ainda da IL-6, apontamos ter havido relação significativamente estatística com o grupo EHNA (Tabela 12).

Tabela 12 – Correlação das Citocinas no Grupo: *Diabetes mellitus*.

Variável	IL 10 (r *)	TNF- α (r *)	IL-6 (r *)	p
Idade	0.219	0.440*	0.071	0.005
Esteatohepatite	-0.251	-0.214	-0.293*	0.049
Sd Metabólica	-0.004	-0.348*	0.085	0.025
Glicemia	0.372*	0.005	0.057	0.014
Insulina	0.300*	0.148	0.028	0.048
HOMA	0.500*	0.134	0.004	0.000
ALT	0.312*	-0.097	-0.134	0.046
LDL	0.034	0.072	0.453*	0.004
Triglicérides	0.345*	0.182	-0.186	0.025

NOTA: r*: índice de correlação;

Associações significantes estão relacionadas com valor de p

LDL: lipoproteína de baixa densidade; ALT: alanino aminotransferase (Normal – M: 10-44 F: 10-36U/L)

8 *DISCUSSÃO*

A Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica (DHGNA) é cada vez mais diagnosticada, sendo a principal doença hepática do mundo moderno. Contudo, o diagnóstico das formas mais avançadas, como a esteato-hepatite, que terão potencial para progredir para cirrose e suas complicações ⁶², depende da biópsia hepática, que embora seja o padrão ouro no diagnóstico, ainda apresenta custo elevado e riscos adicionais ao paciente. Desta forma, a pesquisa de marcadores inflamatórios sistêmicos ou marcadores clínico-laboratoriais poderiam contribuir para avaliar o risco de desenvolver EHNA e cirrose em pacientes com DHGNA, caracterizando ferramentas disponíveis e não invasivas no diagnóstico precoce da patologia.

A escolha desta casuística, ou seja, pacientes com DHGNA, reside no fato das citocinas séricas estarem diretamente relacionadas com a fisiopatologia da DHGNA, podendo ser utilizadas para identificar grupos de pacientes com maior risco de desenvolver EHNA em fases mais precoces. Além disso, as citocinas podem ser, ainda, um foco de possível tratamento na DHGNA ⁴⁸. Contudo, como os fatores de risco são múltiplos e existem outras causas de DHGNA denominadas secundárias (uso de drogas, intoxicação por petroquímicos, nutrição parenteral, entre outras), o objetivo do presente estudo foi avaliar o papel das citocinas na fisiopatogênese e

progressão da DHGNA. Além de determinar se podia-se-á prever a progressão para formas avançadas por meio da determinação sérica das citocinas ⁶³. Excluímos pacientes que apresentavam quadro infeccioso clinicamente manifesto no momento da coleta sanguínea das citocinas, pois é sabido que estes valores podem se alterar na presença de processos infecciosos agudos e crônicos, neoplásicos, assim como em mulheres grávidas ^{64,65}.

Outro aspecto importante em relação a casuística, foi a restrição na ingestão de álcool, baseada em dados da literatura, foi cuidadosamente revista na entrevista com os pacientes e seus familiares, pois o etanol poderia alterar os níveis de citocinas ⁶⁶. Neste aspecto, embora na literatura não haja consenso quanto à quantidade de álcool que induziria a lesão hepatocelular, todos os pacientes selecionados já eram acompanhados no ambulatório de Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica do Serviço de Gastroenterologia Clínica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, onde tinham exclusão dos critérios para doença alcoólica e apresentavam biópsia hepática prévia de até 2 anos do início do estudo. A biópsia hepática foi indicada nestes pacientes, tanto pela alteração de aminotransferases e ultrasonografia sugestiva de DHGNA, como pela presença de síndrome metabólica e ultrasonografia sugestiva de DHGNA, mesmo com enzimas hepáticas em muitos casos, normais. Com relação ao intervalo da biópsia e coleta das citocinas, existem algumas limitações neste estudo, pois as citocinas não foram colhidas no mesmo momento da biópsia hepática, diferente dos parâmetros clínicos e laboratoriais que foram obtidos

por meio de um banco de dados no momento da biópsia. Poderia se questionar que sendo as citocinas tão vulneráveis a vários fatores adicionais como infecção, obesidade, piora no diabetes, hipertensão arterial ou dislipidemia, as mesmas poderiam ser modificadas e interferir nos resultados dentro deste tempo. Contudo, sabe-se que a evolução histológica ⁶⁷ da DHGNA é lenta e, mesmo sabendo desta limitação, prospectivamente haveria maior dificuldade de se conseguir 80 biópsias no início do estudo.

Atualmente a Síndrome Metabólica (SM) está diretamente relacionada à DHGNA e suas variantes ⁸. Assim, foram utilizados os critérios do ATP III para identificar os pacientes com SM, a qual é comparável com outras classificações, como a *World Health Organization* (WHO) e *International Diabetes Foundation* (IDF) ^{68,69}. Na nossa casuística, 62% dos pacientes apresentavam-se com SM, dado este, semelhante à literatura ⁷⁰. Dentre os parâmetros da SM, apenas a HAS foi significativamente mais elevada nos pacientes com EHNA, diferente da população geral onde autores demonstram que *Diabetes mellitus* e Obesidade estão, atualmente, diretamente relacionados à EHNA ^{16,17}. Na nossa amostra a HAS foi considerada uma associação à EHNA. Uma possível explicação para esse achado seria a via angiotensina II, que aumentaria a produção de citocinas profibrogênicas, contribuindo para a ativação de células estreladas ⁷¹.

A medida da circunferência abdominal, no presente estudo, foi substituída pelo Índice de Massa Corpórea como critério da SM, sabendo que autores relatam semelhança entre esses parâmetros para prever resistência insulínica ⁷². O Índice HOMA foi utilizado para definir a presença

de resistência insulínica e sua escolha deveu-se a praticidade na rotina clínica. Embora essa não seja a técnica com maior acurácia existente, ela representa uma ferramenta útil para estudos populacionais. Sabe-se, porém, que o nível do HOMA-IR adequado para diagnosticar a RI é variável ⁸. Marchesini et al ⁸ definiram o HOMA=3 como índice de resistência insulínica. O cálculo do Índice HOMA não deve ser efetuado nos pacientes em uso de insulina, porém, nossa amostra apresentou percentual pequeno desses pacientes ⁶⁹. Na presente amostra, a média de IMC dos pacientes, tanto no grupo esteatose quando EHNA foi constituída por obesos (Obesidade Grau I, conforme classificação da OMS). Numerosos trabalhos relacionam a obesidade com um aumento da prevalência de DHGNA, principalmente em pacientes portadores de obesidade Grau III ^{16,73}.

Nesse estudo, as alterações glicêmicas caracterizadas por hiperglicemia (glicemia de jejum= 110 mg/dl), foram o critério metabólico persistente na EHNA, demonstrando ser um fator importante para o surgimento da EHNA ⁷⁴. Os mecanismos fisiopatogênicos que provavelmente explicariam essa associação não estão totalmente elucidados.

Dentre as enzimas hepáticas, a principal alteração foi relacionada com a gama-glutamil transpeptidase (GGT), com níveis mais elevados em pacientes com EHNA. Considerando as aminotransferases, a AST mostrou-se aumentada, associado a EHNA, o que pode ser decorrente do reduzido clareamento desta enzima pelas células hepáticas sinusoidais quando a fibrose está presente ⁷⁵. Na presente amostra, a elevação de ALT não

esteve associada a EHNA. Um estudo retrospectivo mostrou que todo espectro da EHNA, inclusive fibrose avançada, pode ser visto em pacientes com enzimas hepáticas normais ⁷⁶.

No que tange o perfil de colesterol, nossa amostra apresentou níveis mais baixos de HDL em pacientes com EHNA quando comparados à esteatose, contudo ainda assim, a média dos níveis de HDL em todos os pacientes com DHGNA, encontravam-se nos níveis considerados adequados (>50mg/dl). Isso pode se explicar por meio da deterioração hepática que ocorre na EHNA, o que diz contra relatos da literatura, pois, como descreve Avramoglu et al., na evolução para EHNA há aumento da liberação de VLDL na circulação e redução de HDL ⁷⁷.

Atualmente, o papel das citocinas na fisiopatologia da DHGNA tem sido amplamente discutido. Historicamente a primeira citocina a ser quimicamente identificada foi, provavelmente, IFN γ , uma molécula proinflamatória produzida por certas bactérias que interferem com a habilidade dos vírus de prosperar. A descoberta de outras citocinas que se seguiram, foram aquelas as produzidas pelas células imunes principalmente no contexto de sepse e inflamação.

Obesidade, diabetes e síndrome metabólica são excessões severas de como a cascata de citocinas nem sempre está sempre associada com má nutrição ou caquexia, muito pelo contrário. Super nutrição por si só e suas companhias anatômicas, como gordura visceral, são culpados pela ativação do sistema imune inato neste cenário. A DHGNA adiciona uma nova dimensão a esta equação, principalmente na fase de EHNA, pois o tecido

hepático danificado, constitui um componente inflamatório inquestionável. Citocinas podem contribuir como uma chave do fenômeno de resistência insulínica, aumento da sobrecarga de lipídeos hepáticos, apoptose e fibrose dentro deste contexto.

TNF- α é uma citocina paradigmática na DHGNA, tanto nos níveis séricos como no tecido. Geralmente, os níveis séricos e a expressão gênica estão aumentados, e é suspeito de desencadear fibrose e conversão para EHNA ⁷⁸. Esta citocina apresenta resultados discrepantes em diferentes estudos. Talvez porque TNF- α tenha meia vida relativamente curta e baixos níveis circulantes, o que pode não refletir as mudanças ocorridas no tecido hepático ou então devido à baixa sensibilidade dos métodos usados, ou ainda, devido às diferentes populações estudadas ⁴⁸. No presente experimento o TNF- α não aumentou na esteatose e, numericamente, uma diminuição foi vista em EHNA. Este resultado se relacionou com glicemia sanguínea em pacientes não diabéticos, e notadamente com colesterol total e TGL em esteatose. Neste contexto os nossos resultados são mais compatíveis com aqueles de Kashyap et al ⁷⁹ em pacientes obesos cirúrgicos, nos quais TGL foi marcador de progressão de DHGNA mas não o TNF- α por si só.

IL-6 é outra citocina estudada de grande importância na EHNA. A *Diabetes mellitus*, por si só, é condição inflamatória e IL-6, por outro lado como outro sinalizador químico, tem sido descoberto em EHNA combinado com resistência insulínica ⁸⁰. Em nosso estudo, os níveis séricos de IL-6 foram discretamente mais baixos nos pacientes com EHNA comparado aos

pacientes com esteatose. Esse desenho pode ser explicado pela falha da IL-6 na possível ação hepatoprotetora desta citocina, conforme alguns estudos experimentais. A função protetora da IL-6 no fígado esteatótico está relacionada com sua habilidade em conter o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial. Assim, em pacientes com EHNA, haveria redução sérica desta citocina^{85,86}.

Como associação, IL-6 não foi observada como espelho de progressão na nossa série de pacientes com DHGNA, como já confirmado por diversos autores^{55,82,83}. Apenas Abiru et al mostrou resultado divergente relacionada a IL-6 circulante, com aumento tanto dos níveis de IL-6 quanto de TNF- α ⁴².

IL-10 é uma citocina antiinflamatória central na contra regulação da família Th2, em contraste com a clássica estimulação de inflamação Th1. Ela inibe a síntese de diversos mediadores de Th1. Inibindo a síntese de múltiplos mediadores de Th1, pode também ter propriedades antifibróticas em modelos específicos de injúria hepática⁸⁷. Dado o potencial envolvimento na obesidade e EHNA com e sem DM, tal citocina foi incluída neste estudo.

Níveis baixos circulantes foram revelados em pacientes obesos, e o tratamento com este agente previne indução lipídica de resistência insulínica. No entanto, as implicações da IL-10 são obscuras⁸⁸.

Quando todos os pacientes DHGNA são avaliados, nenhuma das citocinas apresentou diferença significativamente estatística. Quando apenas diabéticos com EHNA foram discriminados, uma tendência em direção a

atenuação das citocinas pode ser notada, principalmente nas IL-6 e IL-10. Mesmo não ocorrendo significância estatística ($p=0.088$ e $p=0.060$, respectivamente), é provável que, com uma série maior, tal confirmação possa ocorrer. Ao mesmo tempo, semelhante perfil reforça o papel da diabetes como um respeitável influenciador na EHNA.

Este é um dos primeiros estudos em humanos que, no nosso conhecimento, dirigiu-se a IL-10 na DHGNA, e ainda, o primeiro a identificar diferenças inflamatórias moldadas em diabéticos versus não DM⁸¹. Exel et al, em estudo com idosos, demonstrou que há redução na capacidade de produzir IL-10 quando há associação de Síndrome Metabólica e DM⁹⁰.

A real fisiopatologia da citocina IL-10, possivelmente engloba outros mediadores antiinflamatórios como IL-4 e IL-13. Em um estudo experimental, a elevação da IL-10 em EHNA foi observada. Usando ratos diabéticos ob/ob, manejados com imunoterapia oral, uma diminuição do escore histológico seguido de um papel protetor da citocina foi verificado⁵⁸. A IL-10 apresenta padrão semelhante ao TNF- α , pois no grupo com todos os pacientes não houve diferença na esteatose e EHNA além de apresentar queda no grupo de diabéticos, assim como TNF- α , porém, sem significância estatística, mas numericamente a diferença foi notável (38 para 17). Essa semelhança entre estas citocinas se baseia no fato do TNF- α ser considerada uma citocina próinflamatória, ao contrário da IL-10, denominada antiinflamatória, ocorrendo assim, um mecanismo de compensação entre elas (mecanismo de defesa do organismo). Se a amostra fosse maior, mesmo no grupo total de pacientes, sem estratificar

diabéticos e não diabéticos, provavelmente ocorreria significância. Sendo os diabéticos um grupo mais homogêneo, há uma tendência a ser significativa. Este estudo não sugere que uma terapia anticitocina possa ser usada, pois as altas concentrações de citocinas em EHNA não se confirmaram. Ao menos em diabéticos, uma baixa regulação natural de certas citocinas parece ocorrer.

No âmbito das citocinas, a esteatose é a etapa de grande inflamação . Talvez porque ainda as células hepáticas ainda estão preservadas, as pequenas agressões levam a um aumento da produção de citocinas. Na EHNA a agressão é maior, mas as células apresentam maior lesão. Como Yamaguchi et al, em seus modelos experimentais mostrou que, apesar dos baixos valores de TNF- α , a fibrose hepática progrediu, indicando que outros mecanismos devem estar envolvidos⁸⁹. Estudos adicionais são aconselháveis.

Uma extensa lista de citocinas, fatores angiogênicos e de crescimento, ativadores da proliferação de peroxissomas (PPARs) e enzimas tem sido denominados como alvos pontuais para a intervenção terapêutica⁸⁴. Entretanto, os achados relacionados a IL-10 recomendam que, ao menos em diabéticos, esta molécula, conjuntamente a outras citocinas antiinflamatórias, tenham prioridade.

Futuros estudos são necessários para melhor esclarecer o papel das citocinas na progressão da DHGNA e avaliar o potencial terapêutico de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 nesta doença.

9 CONCLUSÕES

- 1) As concentrações séricas de marcadores inflamatórios sistêmicos (IL-6 e IL-10) são úteis clinicamente para diferenciar esteatose simples de EHNA somente quando os pacientes são estratificados segundo a presença ou ausência de *Diabetes mellitus*. As mesmas, não foram úteis para diferenciar esteatose simples de EHNA na população global de pacientes obesos com DHGNA.
 - 2) Pacientes não diabéticos com EHNA apresentam níveis de IL-10 maiores que aqueles com esteatose simples. Além disso, a IL-10 correlaciona-se com o índice HOMA, representando assim um marcador importante na EHNA em não diabéticos.
 - 3) Pacientes diabéticos com EHNA apresentam níveis mais baixos das interleucinas, especialmente IL-10. Além disso, a IL-10 correlaciona-se com o índice HOMA e outras variáveis de homeostase no diabetes, representando assim, um marcador importante na EHNA em diabéticos.
 - 4) O TNF- α não demonstrou ser útil para diferenciar esteato-hepatite da esteatose, mesmo quando estratificados em diabéticos e não diabéticos.
-

10 ANEXOS

**PROTOCOLO PARA ATENDIMENTO DE PACIENTES
COM DOENÇA GORDUROSA HEPÁTICA NÃO ALCÓOLICA (NAFLD)**

Nome: _____ RG-HC: _____
Data Nasc: _____ Sexo: () masc. () fem. Raça: _____
Endereço: _____
Telefone: _____
Data: _____

Motivo do encaminhamento:

- () Esteatose hepática por método de imagem (USG, TC, RNM)
() Alteração de enzimas hepáticas (TGO, TGP, FA, GGT)
() achado acidental de alt. laboratoriais / imagem (banco de sangue, check-up)
() achado durante exames por outros motivos, outras patologias de base
() queixa gastrointestinal
() achado esteatose em biópsia hepática durante cirurgia abdominal
() outros: _____

Fatores de risco associados:

- () Obesidade (Obesidade: $IMC > 30 \text{ Kg/m}^2$) ($IMC = \text{peso} / \text{altura}^2$)
() DM tipo 2 diagnosticado em _____
() Hipercolesterolemia ($CT > 200 \text{ mg/dL}$)
() Hipertrigliceridemia ($TG > 150 \text{ mg/dL}$)
() Síndrome plurimetabólica () DM ou IGT ou IR + 3 abaixo:
() HAS ($PA > 135 \times 80 \text{ mmHg}$)
() Obesidade ($IMC > 30$ ou cintura/quadril $> 0,85$ fem, $> 0,9$ masc)
() Dislipidemia ($HDL < 40 \text{ mg/dL}$ ou $TG > 150 \text{ mg/dL}$)

() Hipotireoidismo
() Drogas (amiodarona, corticosteróide, ACO alta dosagem, tamoxifeno, ACC)
() Toxicidade ambiental / trabalho (indústria de base)
() Antecedentes de nutrição parenteral, emagrecimento acentuado, desnutrição, bypass intestinal, síndrome do intestino curto

Medicações em uso:

Nome	Dose	Posologia	Início	Indicação

Contraceptivo (nome/dose/posologia/início): _____

História médica (outros antecedentes):

Exercício () frequentemente; () às vezes; () nunca

Aeróbico _____;

Musculação _____

História familiar de diabetes tipo 2:

() pai () mãe () irmãos () avós () tios

Anamnese / exame físico:

() dor em HCD

() síndrome dispéptica

() astenia

() sinais de insuf. hepática (spiders, ginecomastia, eritema palmar, icterícia)

() sinais de hipertensão portal (esplenomegalia, circulação colateral abdominal)

() familiares de primeiro e segundo grau com hepatopatia

Ap. cardio-respiratório:

Abdômen:

Pele e mucosas:

Geral:

PA: _____

Pulso: _____

Altura: _____

Tabagismo: ☐ Não fumante ☐ Ocasional ☐ Diariamente: _____ cigarros/dia

USG abdome (/ /):

Esteatose grau _____

Hepatimetria _____

Outros: _____

Continua

Conclusão

CT abdome (/ /): (CT ao nível de L4 L5 para medida da
gordura visceral e SC)

(anexar laudo do exame
anátomo-patológico)

Esteatose grau _____

Hepatimetria _____

Outros: _____

Teste respiratório da lactulose (/ /): _____

Evolução:

	Admissão	
	/ /	/ /
TGO (máx nl:)		
TGP (máx nl:)		
FA (máx nl:)		
GGT (máx nl:)		
BT / BD		
Albumina		
TP (INR)		
Ferro		
Sat. da transferrina		
Ferritina		
Glicemia		
Hb A1c		
Insulina		
Peptídeo C		
Leptina		
CT		
HDL		
LDL		
TG		
Uréia		
Creatinina		
Hb / VCM		
Plaquetas		
Seg/Linfócito/Eos		
TSH/ T4 livre		

	Admissão	
	/ /	/ /
Peso		
Cintura		
Quadril		
DCTríceps		
CMB		
Avaliação insulino-resistência		

PROTOCOLO PARA ATENDIMENTO DE PACIENTES
COM ESTEATOSE NÃO ALCOÓLICA (NAFLD)

Avaliação inicial:

Data: _____

Hepatite viral:

HbsAg _____ Anti-HBc total _____ Anti-HBs _____ Anti-HCV total _____
Anti-HIV _____

Hepatite auto-imune:

Auto-anticorpos hepáticos _____

Doença de Wilson:

Ceruloplasmina _____ Cobre sérico _____

Deficiência de $\alpha 1$ anti-tripsina:

$\alpha 1$ anti-tripsina _____

Hemocromatose:

Ferro _____ Sat. Transferrina _____ Ferritina _____

Doença celíaca:

Ac anti-endomísio _____ Dosagem de IgA _____

Hepatite alcoólica:

Ingestão alcoólica semanal: (... % x mL x 0,8 = gramas)

Outros comentários / procedimentos:

PROTOCOLO PARA ATENDIMENTO DE PACIENTES
COM DOENÇA GORDUROSA HEPÁTICA NÃO ALCOÓLICA (NAFLD)

Nome: _____ RG-HC: _____

Data: _____

Evolução (estado geral, ocorrência de eventos adversos, uso de outros medicamentos):

PA: _____ Pulso: _____

Outros comentários / procedimentos (coleta de exames, entrega/devolução de medicamentos, aderência ao tratamento):

11 REFERÊNCIAS

-
1. Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology*. 2006;43(2 Suppl 1):S99-S112.
 2. Falck-Ytter Y, Younossi ZM, Marchesini G, McCullough AJ. Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes. *Semin Liver Dis*. 2001;21(1):17-26.
 3. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM, Hobbs HH. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology*. 2004;40(6):1387-95.
 4. Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. Nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2002;346:1221-1231.
 5. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc*. 1980;55(7):434-8.
 6. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol*. 1999;94:2467-74.
 7. Angelico F, Del Ben M, Conti R, Francioso S, Feole K, Fiorello S, Cavallo MG, Zalunardo B, Lirussi F, Alessandri C, Violi F. Insulin resistance, the metabolic syndrome, and nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90(3):1578-82
 8. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, Natale S, Vanni E, Villanova N, Melchionda N, Rizzetto M. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis and the metabolic syndrome. *Hepatology*. 2003;37(4):917-23.
-

-
9. The Third Report of the National Cholesterol Education Program (NECP). Expert Panel on Detection, Evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001;285(19):2486-97.
 10. Grundy SM, Hansen B, Smith SC Jr, Cleeman JI, Kahn RA. Clinical management of metabolic syndrome: report of the American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute/American Diabetes Association conference on scientific issues related to management. *Circulation*. 2004;109(4):551-6.
 11. Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 1999;30:1356-62.
 12. Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE. Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. *Gastroenterology*. 2001;121(1):91-100.
 13. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. *Report of WHO Consultation on Obesity*. World Health Organization, Geneva, 1998.
 14. Adams LA, Lymp JF, StSauer J, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, Angulo P. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology*. 2005;129(1):113-21.
 15. Paradis V, Perlemuter G, Bonvoust F, Dargere D, Parfait B, Vidaud M, Conti M, Huet S, Ba N, Buffet C, Bedossa P. High glucose and hyperinsulinemia stimulate connective tissue growth factor expression: a potencial mechanism involved in progression to fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2001;34(4 Pt 1):738-44.
 16. Dixon J, Bhathal P, O'Brien P. Nonalcoholic fatty liver disease: Predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. *Gastroenterology*. 2001;121(91):91-100.
 17. El-Serag H, Tran T, Everhart J. Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2004;126:460.
-

-
18. Mofrad P, Contos M, Haque M, et al. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver.
 19. Cotrim H, Parise E, Leite N, Oliveira C et al . Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in Brazil: Clinical and histological profile. *J Hepatol*. 2008;48 (suppl2):S340.
 20. Scheen AJ; Luycky FH. Nonalcoholic steatohepatitis and insulin resistance: interface between gastroenterologists and endocrinologists. *Acta Clin Belg* 2003; 58(2): 81-91.
 21. Chituri S, Abeygunasekera S, Farrell GC et al. NASH and insulin resistance: insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology*. 2001;35(2):373-79.
 22. McCullough AJ. Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol*. 2006; 40 Suppl 1:S17-29.
 23. Farrell GC, Hall PM, McCullough AJ. Fatty Liver Disease: NASH and Related Disorders. Blackwell Publishing; 2005.
 24. Day CP, Saksena S. Nonalcoholic steatohepatitis: definitions and pathogenesis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2002;17 Suppl 3:S377-84.
 25. Berson A, De Beco V, Lettéron P, Robin MA, Moreau C, El Kahwaji J, Verthier N, Feldmann G, Fromenty B, Pessayre D. Steatohepatitis-inducing drugs cause mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in rat hepatocytes. *Gastroenterology*. 1998;114(4):764-74.
 26. Yang S, Zhu H, Li Y, Lin H, Gabrielson K, Trush MA, Diehl AM. Mitochondrial adaptations to obesity-related oxidant stress. *Arch Biochem Biophysics*. 2000;378(2):259-68.
 27. Curzio M, Esterbauer H, Dianzani MU. Chemotactic activity of hydroxyalkenals on rat neutrophils. *Int J Tiss React*. 1985;7(2):137-42.
-

-
28. Lee KS, Buck M, Houghlum K, Chojkier M. Activation of hepatic stellate cells by TGF alpha and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myb expression. *J Clin Invest.* 1995;96(5):2461-8.
 29. Vettor R, Milan G, Rossato M, Federspil G. Review article: adipocytokines and insulin resistance. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005;22 (Suppl. 2):3-10.
 30. Day CP. Mechanisms of steatosis: Is steatosis still the first Hit? Special Conference-EASL. Sep. 2009, 63.
 31. Tilg H, Hotamisligil G. Nonalcoholic fatty liver disease: Cytokine-adipokine interplay and regulation of insulin Resistance. *Gastroenterology.* 2006;131:934-45.
 32. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S, Coppack SW. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6 but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82(12):4196-200.
 33. Duncan BB, Schmidt MI, Chambless LE, Folsom AR, Carpenter M, Heiss G. Fibrinogen, other putative markers of inflammation, and weight gain in middle-aged adults – the ARIC study. Atherosclerosis Risk in Communities. *Obes Res.* 2000;8(4):279-86.
 34. Carvalho MHC, Colaço AL, Fortes ZB. Citocinas, disfunção endotelial e resistência à insulina. *Arq Brás Endocrinol Metab.* 2006;50:304-12.
 35. Gabriely I, Barzilai N. Surgical removal of visceral adipose tissue: effects on insulin action. *Curr Diab Rep.* 2003;3:201-6.
 36. Poorten D, Milner KL, Hui J, Hodge A, et al. Visceral fat: A Key mediator of steatohepatitis in metabolic liver disease. *Hepatology* 2008;48(2):449-57.
 37. Cottam DR, Mattar SG, Barinas-Mitchell E, Eid G, Kuller L, Kelley DE, Schauer PR. The chronic inflammatory hypothesis for the morbidly
-

associated with morbid obesity: implications and effects of weight loss. *Obes Surg.* 2004;14:589.

38. Das UN. Is metabolic syndrome X an inflammatory condition? *Exp Biol Med* (Maywood). 2002;227(11):989-97.
39. Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest.* 1995;95(5): 2111-9.
40. Festa A, D'Agostino R Jr, Howard G, Mykkanen L, Tracy RP, Haffner SM. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation.* 2000; 102(1):42-7.
41. Curzio M, Esterbauer H, Dianzani MU. Chemotactic activity of hydroxyalkenals on rat neutrophils. *Int J Tiss React.* 1985;7(2):137-42.
42. Abiru S, Migita K, Maeda Y, Daikoku M, Ito M, Ohata K, Nagaoka S, Matsumoto T, Takii Y, Kusumoto K, Nakamura M, Komori A, Yano K, Yatsushashi H, Eguchi K, Ishibashi H. Serum cytokine and soluble cytokine receptor levels in patients with non-alcoholic steato-hepatitis. *Liver Int.* 2006;26 (1):39-45.
43. Yin M, Wheller MD, Kono H, et al. Essential role of tumor necrosis factor alpha in alcohol-induced liver injury in mice. *Gastroenterology.* 1999;117 (4):942-52.
44. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest.* 2005;115(5):1111-9.
45. Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P, Santorelli G, Branchi A, Taioli E, Fiorelli G, Fargion S. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms and insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* 2002;122(2):274-80.
-

-
46. Li Z, Yang S, Lin H, Huang J, Watkins PA, Moser AB, Desimone C, Song XY, Diehl AM. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2003;37(2):343-50.
47. Memon RA, Grunfeld C, Feingold KR. TNF-alpha is not the cause of fatty liver disease in obese diabetic mice. *Nat Med*. 2001;7(1):2-3.
48. Kent CC, Zein NN, Feldstein AE. Cytokines in the pathogenesis of fatty liver and disease progression to steatohepatitis: implications for treatment. *Am J Gastroenterol*. 2008;103:1036-42.
49. Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF, Rydzewski R, Burgart LJ, Gores GJ. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway. *Hepatology*. 2004;40(1):185-94.
50. Tomita K, Tamiya G, Ando S, Ohsumi K, Chiyo T, Mizutani A, Kitamura N, Toda K, Kaneko T, Horie Y, Han JY, Kato S, Shimoda M, Oike Y, Tomizawa M, Makino S, Ohkura T, Saito H, Kumagai N, Nagata H, Ishii H, Hibi T. Tumor necrosis factor-alpha signaling through activation of Kupffer cells plays an essential role in liver fibrosis of non-alcoholic steatohepatites in mice. *Gut*. 2006;55(3):415-24.
51. Feldstein AE, Gores GJ. Apoptosis in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *Front Biosci*. 2005;10:3093-99.
52. Feldstein AE, Werneburg NW, Li Z, Bronk SF, Gores GJ. Bax inhibition protects against free fatty acid-induced lysosomal permeabilization. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290(6):G1339-46.
53. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S, Coppel SW. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(12):4196-200.
54. Klover PJ, Zimmers TA, Koniaris LG, Mooney RA. Chronic exposure to interleukin-6 causes hepatic insulin resistance in mice. *Diabetes*. 2003;52(11):2784-9.
-

-
55. Wieckowska A, Papouchado BG, Li Z, Lopez R, Zein NN, Feldstein AE. Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol*. 2008;103(6):1372-9.
56. Jin X, Zimmers TA, Perez EA, Pierce RH, Zhang Z, Kpniaris LG. Paradoxical effects of short- and long-term interleukin-6 exposure on liver injury and repair. *Hepatology*. 2006;43:474-84.
57. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:683-765.
58. Mosser D, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev*. 2008;226:205-18.
59. den Boer MA, Voshol PJ, Schröder-van der Elst JP, Korshennikova E, Ouwers DM, Kuipers F, Havekes LM, Romijn JA. Endogenous interleukin-10 protects against hepatic steatosis but does not improve insulin sensitivity during high-fat feeding in mice. *Endocrinology*. 2006;147(10):4553-8.
60. Afdhal NH, Nunes D. Evaluation of liver fibrosis: a concise review. *Am J Gastroenterol*. 2004;99(6):1160-74.
61. 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.
62. Bellentania S, Bedognia G, Migliolia L, Tiribellib C. The epidemiology of fatty liver. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2004;16(11):1087-93.
63. Chang CY, Schiano TD. Review article: drug hepatotoxicity. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007;25(10):1135-51.
64. Germano G, Allavena P, Mantovani A. Cytokines as a key component of cancer-related inflammation. *Cytokine*. 2008;43(3):374-9.
-

-
65. Chaouat G, Dubanchet S, Ledée N. Cytokines: important for implantation? *J Assist Reprod Genet.* 2007;24(11):491-505.
66. Purohit V, Gao B, Song BJ. Molecular mechanisms of alcoholic fatty liver *Alcohol Clin Exp Res.* 2009;33(2):191-205.
67. Iris Liou, Kris V. Kowdley V. Natural history of nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol.* 2006;40:S11–S16.
68. Ford ES, Giles WH. A comparison of the prevalence of the metabolic syndrome using two proposed definitions. *Diabetes Care.* 2003;26(3):575-81.
69. Grundy SM, MD, PhD, Cleeman JIC, MD, Daniels CSR, et al. Diagnosis and Management of the Metabolic Syndrome. AHA/NHLBISS. *Circulation.* 2005;102.
70. Rector RS, Thyfault JP, Wei Y, Ibdah JA. Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: an update. *World J Gastroenterol.* 2008;14(2):185-92.
71. Chitturi S, Farrell GC. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis.* 2001;21(1):27-41.
72. Vasquez G, Duval S, Jacobs DR, Silventoinen K. Comparison of body mass index, waist circumference, and waist/hip ratio in predicting incident diabetes: a meta-analysis. *Epidemiol Rev.* 2007;29:115-28.
73. Crespo J, Fernández-Gil P, Hernández-Guerra M, Cayón A, Mayorga M, Domínguez-Diez A, Fernández-Escalante JC, Pons-Romero F. Are there predictive factors of severe liver fibrosis in morbidly obese patients with non-alcoholic steatohepatitis? *Obes Surg.* 2001;11(3):254-7.
74. Steven E. Shoelson, Jongsoon Lee, and Allison B. Goldfine. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Investigation.* 2006;7:1793-81.
75. Sheth SG, Gordon FD, Chopra S. Nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Inter Med.* 1997; 126(2):137-45.
-

-
76. Mofrad P, Contos MJ, Haque M, Sargeant C, Fisher RA, Luketic VA, Sterling RK, Shiffman ML, Stravitz RT, Sanyal AJ. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. *Hepatology*. 2003;37(6):1286-92.
77. Avramoglu RK, Basciano H, Adeli K. Lipid and lipoprotein dysregulation in insulin resistant states. *Clin Chim Acta*. 2006;368(1-2):1-19.
78. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006;116:1793–1801.
79. Kashyap SR, Diab DL, Baker AR, Yerian L, Bajaj H, Gray-McGuire C, Schauer PR, Gupta M, Feldstein AE, Hazen SL, Stein CM. Triglyceride levels and not adipokine concentrations are closely related to severity of nonalcoholic fatty liver disease in an obesity surgery cohort. *Obesity* (Silver Spring). 2009;17(9):1696-1701.
80. Bugianesi E. Non-alcoholic steatohepatitis and cancer. *Clin Liver Dis*. 2007;11:191-207.
81. Esposito K, Pontillo A, Giugliano F, et al. Association of low interleukin-10 levels with the metabolic syndrome in obese women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(3):1055-58.
82. Younossi ZM, Jarrar M, Nugent C, et al. A Novel Diagnostic Biomarker Panel for Obesity-related Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH). *Obes Surg*. 2008;18:1430-7.
83. Jarrar MH, Baranova A, Collantes R et al. Adipokines and cytokines in non- alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008;27:412-21.
84. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*. 2008;214:199- 210.
85. Sun Z, Klein AS, Radaeva S, et al. In vitro interleukin-6 treatment prevents mortality associated with fatty liver transplants in rats. *Gastroenterology*. 2003;125:202–15.
-

-
86. El-Assal O, Hong F, Kim WH, Radaeva S, Gao B. IL-6-deficient mice are susceptible to ethanol-induced hepatic steatosis: IL-6 protects against ethanol-induced oxidative stress and mitochondrial permeability transition in the liver. *Cell Mol Immunol*. 2004;1:205–11.
87. Peng XD, Dai LL, Huang CQ, He CM, Yang B, Chen LJ. Relationship between anti-fibrotic effect of *Panax notoginseng* saponins and serum cytokines in rat hepatic fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;388(1):31-4.
88. Hong EG, Ko HJ, Cho YR, Kim HJ, Ma Z, Yu TY, Friedline RH, Kurt-Jones E, Finberg R, Fischer MA, Granger EL, Norbury CC, Hauschka SD, Philbrick WM, Lee CG, Elias JA, Kim JK. Interleukin-10 prevents diet-induced insulin resistance by attenuating macrophage and cytokine response in skeletal muscle. *Diabetes*. 2009;58(11):2525-35.
89. Yamaguchi K, Yang L, McCall S, Huang J, Yu XX, Pandey SK, Bhanot S, Monia BP, Li YX, Diehl AM. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2007;45(6):1366–74.
90. Exel E, Gussekloo J, Craen AJM, Frolich M, Wiel AB, Westendorp RGJ. Low production capacity of interleukin-10 associates with the metabolic syndrome and type 2 diabetes the Leiden 85-plus study. *Diabetes*. 2002;51:1088-92.
-