FABÍOLA RABELO

Associação dos polimorfismos nos genes *CYBA* e *NOX4* da NADPH oxidase e sua relação com síndrome metabólica na doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira

**São Paulo
2017**

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

Associação dos polimorfismos nos genes CYBA e NOX4 da NADPH oxidase e sua relação com síndrome metabólica na doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) / Fabíola Rabelo. -- São Paulo, 2017.

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia.

Orientadora: Cláudia Pinto Marques Souza de Oliveira.

Descritores: 1.Hepatopatia gordurosa não alcoólica 2.NADPH oxidase 3.Síndrome X metabólica 4.Polimorfismo de nucleotídeo único 5.Estresse oxidativo

USP/FM/DBD-518/17

*Aos meus pais, Paulo e Adelaide, que além
de todo o amor envolvido, me ensinaram que a educação é um
dos principais pilares do ser humano.*

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes, razão e finalidade de toda fonte de estudo.

À Profa. Dra. Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira, minha orientadora, pelo exemplo de dedicação a pesquisa, e por acreditar em mim.

Ao Dr. José Tadeu Stefano, amigo, pela sua disponibilidade, paciência e ajuda imensurável na montagem desta Tese

A todos os membros do LIM-7 e da Gastroenterologia do HC-FMUSP por toda ajuda e apoio durante todo o processo, desde o início.

A todos do LIM-25 e da Endocrinologia do HC-FMUSP, em nome da Dra. Maria Lucia Corrêa Giannella, cuja colaboração foi essencial na pesquisa e elaboração da tese e artigo.

Aos Professores Titulares e Chefes de Departamento da FMUSP, Prof. Dr. Flair José Carrilho e Prof. Dr. Luiz Carneiro D’Albuquerque, pela oportunidade e apoio a pesquisa

Ao Dr. Jukemura, por seu empenho em incentivar a pesquisa científica.

À Profa. Dra Wanda Regina Caly, pela dedicação constante a profissão, aos alunos e aos pacientes, mas principalmente pelo exemplo de ser humano

À Profa. Dra. Ehel Zimberg Chehter, pelo apoio, pelas histórias e momentos descontraídos

Ao Professor Titular e Chefe do Departamento da FMABC, Prof. Dr. Wilson Roberto Catapani, pelo apoio a pesquisa

Ao Prof. Dr. Daniel Ferraz Mazo, colega de pós-graduação, pelo exemplo de profissional

Aos residentes de gastroenterologia da FMABC que nos estimulam a estar sempre aprendendo e discutindo os casos.

Aos alunos da FMABC pela oportunidade de sempre voltar às bases da hepatologia.

Ao Dr. Luiz Gustavo Leite de Oliveira e Dra. Queila Daniela Alzira Gorgulho, irmãos de alma, que sempre me incentivaram a ir mais longe no caminho da pesquisa.

Aos meus amigos de toda a vida, da Faculdade de Medicina de Itajubá, pelos momentos de descontração e alegria.

Aos meus tios queridos Leila e José Eduardo, por tantos momentos alegres.

A todos os Rabelos e Guimarães, que sempre torceram por mim e me fizeram ser uma pessoa melhor.

Aos meus irmãos Vinicius, Fabio e Leandro, por fazerem parte dessa história, pelos momentos difíceis, mas também pelos felizes.

Às eternas crianças da minha vida Victor, Julia, Heitor, Alice, Francisco e Isabel.

Ao meu querido Adriano, pelo apoio incondicional, compreensão, amor companheirismo e pela reprodução das figuras desta tese.

***“Ninguém comete erro maior do que não fazer
nada, porque só pode fazer um pouco”.***

Edmund Burke

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação ou 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. Divisão 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 Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Aspectos gerais	2
1.2 Fisiopatogênese da DHGNA	4
1.3 DHGNA e genética	8
1.4 Sistema NADPH oxidase	11
1.5 Polimorfismo da NADPH oxidase	13
1.6 NADPH e DHGNA	15
1.7 Fibrogênese hepática e NADPH.....	16
2 JUSTIFICATIVA.....	19
3 OBJETIVOS.....	21
4 MÉTODOS	23
4.1 Desenho do estudo	23
4.2 Critérios de inclusão	23
4.3 Critérios de exclusão	24
4.4 Avaliação clínica.....	24
4.5 Determinações bioquímicas.....	24
4.6 Polimorfismo nos genes da NADPH oxidase	25
4.6.1 Extração do DNA genômico	25
4.6.2 Genotipagem dos polimorfismos –1435 C/A no gene NOX4.....	26
4.7 Análise histológica.....	26
4.8 Questões éticas.....	28
4.9 Análise estatística	29

5 RESULTADOS.....	31
5.1 Caracterização dos pacientes de acordo com a presença de EHNA.....	31
5.2 Caracterização dos pacientes de acordo com a presença de SM	32
5.3 Análise dos polimorfismos nos genes NOX4 e CYBA, de acordo com a presença de SM.....	33
5.4 Análise do polimorfismo no gene CYBA.....	34
5.5 Análise do polimorfismo no gene NOX4	36
6 DISCUSSÃO	39
6.1 Polimorfismos	39
6.2 Achados Clínicos	42
7 CONCLUSÃO	46
8 ANEXOS	48
8.1 Anexo A - Ficha individual de coleta de dados.....	48
9 REFERÊNCIAS	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGL	Ácidos graxos livres
AG	Ácidos graxos
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATP III	<i>Adult Treatment Panel III</i>
CHC	Carcinoma hepatocelular
DHGN	Doença hepática gordurosa não-alcóolica
DM	Diabetes mellitus tipo 2
EHNA	Esteato-hepatite não alcoólica
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FA	Fosfatase alcalina
GGT	Gama-glutamil transferase
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HCV	Virus da Hepatite C
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HE	Hematoxilina-eosina
HOMA-IR	<i>Homeostasis model assessment</i>
IKK β	<i>Inhibitor Kappa beta Kinase</i>
IL-10	Interleucina-10
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de massa corpórea
IRS	<i>Insulin- receptor substrate family</i>
JNK	<i>Jun N-terminal Kinase</i>
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
NAFLD	<i>Nonalcoholic fatty liver disease</i>
NAS	<i>NAFLD activity score</i>
NASH	<i>Nonalcoholic steatohepatitis</i>
NF-K β	Fator nuclear kappa beta
PCR	Proteína C reativa

PPAR α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptors alfa</i>
SREBP-1	<i>Sterol regulatory element binding protein-1c</i>
TNF α	Fator de necrose tumoral α
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
CE	Células endoteliais
ChREBP	<i>Carbohydrate response element-binding protein</i>
CPT-1	<i>Carnitina palmitoil-transferase 1</i>
CT	Colestetol total
DCV	Doenças Cardiovasculares
DNL	Lipogênese <i>de novo</i>
EO	Estresse oxidativo
ER	Retículo endoplasmático
EWAS	<i>Exome-wide association studies</i>
GWAS	<i>Genome-wide association studies</i>
HE	Hematoxilina-eosina
HIF	<i>Hypoxia inducible factor-1</i>
HSCs	Células estreladas hepáticas
JAK	Janus quinase
Log	Logaritmo
LPS	Lipopolisacárides
MAF	<i>Minor alelo frequency</i>
MEC	Matriz extra-celular
MnSOD	Superóxido dismutase de manganês
NaCl	Cloreto de Sódio
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NAS	<i>NAFLD Activity Score</i>
NEFA	Ácidos graxos não esterificados
OR	<i>Odds ratio</i>
phox	Phagocytic oxidase
PNPLA3	<i>Patatin-like phospholipase domain-containing 3</i>
PUFAs	Ácidos graxos poliinsaturados
RFLP	Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição
RI	Resistência insulínica

RM	Ressonância nuclear magnética
SM	Síndrome metabólica
SNPs	Polimorfismos de um único nucleotídeo
SOCS	Sinalizador da supressão de citocinas
TE	Tris EDTA
TGFβ	Fator de crescimento transformante-beta
TGL	Triglicérides
TIMPS	Inibidores teciduais metaloproteinases
TM6SF2	<i>Transmembrane 6 superfamily member 2</i>
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE SÍMBOLOS

%	por cento
<	menor que
=	igual
>	maior que
≤	menor ou igual que
≥	maior ou igual que
μL	Microlitros
dL	decilitros
g	gramas
Kg	quilogramas
min	minutos
mL	mililitros
mmHg	milímetros de mercúrio
°C	Graus <i>Celcius</i>
UI	unidades internacionais
vs	<i>versus</i>

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Componentes da SM, segundo critérios da NCEP-ATP III [<i>Adult Treatment Panel III</i>].....	3
Quadro 2 -	Escore da atividade da DGHNA – <i>NAFLD Activity Score</i> (NAS) definida pelo <i>Pathology Committee of the NASH Clinical Research Network</i>	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Múltiplas hipóteses para o desenvolvimento da DHGNA	7
Figura 2 -	DHGNA como doença poligênica e hereditária.	8
Figura 3 -	Sequência de passos da fisiopatologia da DHGNA e os genes envolvidos em cada evento.....	10
Figura 4 -	Equação da produção de superóxido a partir da redução de NADPH realizado pela NADPH oxidase.....	11
Figura 5 -	Sistema NADPH oxidase 1 e 2.....	13
Figura 6 -	Distribuição celular das isoformas de NOX no fígado.....	15
Figura 7 -	Grupos de pacientes incluídos no estudo.....	23
Figura 8 -	Características laboratoriais de pacientes portadores de DHGNA, de acordo com o SNP no gene - 675 T/A <i>CYBA</i> e níveis de HDL.....	35
Figura 9 -	Características laboratoriais de pacientes com DHGNA, de acordo com o SNP no gene -675 T/A <i>CYBA</i> e níveis de TGL.....	36
Figura 10 -	Características laboratoriais de pacientes, com DHGNA, de acordo com o SNP no NOX4 (rs 3017887) e níveis de ALT.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes com DHGNA de acordo com a presença de esteatose ou EHNA.....	31
Tabela 2 -	Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes com DHGNA de acordo com a presença ou ausência de SM.....	33
Tabela 3 -	Frequências genotípicas dos polimorfismos do <i>CYBA</i> e Nox4 de acordo com a presença ou ausência de SM em pacientes com DHGNA.	34
Tabela 4 -	Frequência genotípica do polimorfismo no gene <i>CYBA</i> de acordo com a presença ou ausência de EHNA.....	34
Tabela 5 -	Frequência genotípica do polimorfismo no gene NOX4 de acordo com a presença ou ausência de EHNA.....	37

RESUMO

Rabelo F. *Associação dos polimorfismos nos genes CYBA e NOX4 da NADPH oxidase e sua relação com síndrome metabólica e doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Introdução & Objetivos: A Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é claramente marcada por influência ambiental, no entanto, fatores genéticos têm sido associados a progressão para formas mais graves de DHGNA. O estresse oxidativo tem sido cada vez mais enfatizado nesta evolução e o sistema NADPH parece ser uma importante fonte de produção de espécies reativas de oxigênio. O papel dos polimorfismos do sistema NADPH nessa população e sua possível relação com progressão de doença e síndrome metabólica são desconhecidos. Desta maneira, investigamos dois polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) na região reguladora dos genes que codificam a NADPH oxidase 4 subunidade catalítica (NOX4) e sua subunidade regulatória p22phox (CYBA) e sua relação com variáveis histológicas e bioquímicas em pacientes com DHGNA. **Métodos:** 207 pacientes com DHGNA com biópsia hepática (esteatose=27; esteato-hepatite=180), sendo (70% do sexo feminino), foram genotipados para SNPs da Nox4 (rs3017887) e CYBA -675 T/A. O DNA genômico foi extraído a partir de células do sangue periférico e a genotipagem foi realizada utilizando *primers* específicos e sondas fluorescentes marcadas por sequenciamento. A análise histológica foi baseada na classificação de Kleiner et al (2005). Todos os pacientes eram negativos para os marcadores de hepatites virais, doença de Wilson, hemocromatose, doenças auto-imunes e tinham ingestão diária de álcool <100 g/semana. **Resultados:** Associação do CYBA -675 T/A com triglicérides foi observada: $176,87 \pm 12,93$ (TT) versus $228,70 \pm 21,66$ (XA), $p = 0,007$. Quando a população é estratificada, a associação aparece apenas entre os pacientes que possuem esteatohepatite não alcoólica (EHNA). Foi observada uma associação do CYBA-675 T / A com HDL: $48,05 \pm 1,71$ (TT) vs $41,70 \pm 2,91$ (TA) vs $28,03 \pm 9,47$ mg / dL (AA), $p = 0,001$. Quando a população é estratificada, a associação aparece apenas entre os pacientes que possuem EHNA. Quando se estudou o SNP no gene da NOX4, observou-se associação com ALT (CA + AA: $60,10 \pm 6,01$ U/L vs CC: $44,23 \pm 4,36$ U/L; $P = 0,02$). Porém, quando a população foi estratificada em esteatose e EHNA não se verificou diferença estatisticamente significativa na frequência dos genótipos. Não houve associação de SNPs de genes que codificam proteínas do sistema NADPH oxidase nos genes CYBA (não registrado) e Nox4 (rs 3017887) e a presença de EHNA, nos portadores de DHGNA. Quanto aos resultados clínicos, observou-se que os graus de fibrose mais avançados ocorreram em pacientes com diagnóstico de Diabetes Mellitus tipo 2 (66,9% vs 37,5%; $p = 0,007$), além de serem mais obesos (32,2% vs 29%; $p = 0,003$). Além disso, os níveis séricos de glicose e insulina aumentaram significativamente, de acordo com a presença de EHNA. A frequência da SM foi significativamente maior em pacientes com EHNA. **Conclusões:** 1) Houve associação entre a presença do genótipo CC na Nox4 SNP com uma maior

concentração de ALT na população em geral 2) Houve associação entre a presença do genótipo AA no polimorfismo do gene -675 T/A *CYBA* com uma maior concentração de TGL e menor de HDL, nos pacientes com EHNA 3) Houve associação entre a presença de síndrome metabólica e graus avançados de fibrose hepática em portadores de DHGNA. No entanto, a amostra deve ser ampliada para confirmar estas associações, bem como, para melhor explorar possíveis relações com escores de fibrose e inflamação.

Descritores: hepatopatia gordurosa não alcoólica; NADPH oxidase; síndrome X metabólica; polimorfismo de nucleotídeo único; estresse oxidativo.

ABSTRACT

Rabelo F. *Association of polymorphisms in CYBA and NOX4 genes of NADPH oxidase and its relation with metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)* [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017.

Background/Aims: Oxidative stress has been implicated in progression to severe forms of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). NADPH oxidase appears to be an important source of production of reactive oxygen species. We investigated by the first time two single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the regulatory region of genes encoding the NADPH oxidase 4 (NOX4) and p22phox (CYBA) in NAFLD. **Methods:** 207 biopsy-proven NAFLD patients (27 = steatosis; 180= NASH) were evaluated. Genomic DNA was extracted from peripheral blood cells and on Nox4 and CYBA polymorphisms were determined by direct sequencing of PCR. All the patients were negative for markers of viral hepatitis, Metabolic diseases, autoimmune diseases and had daily intake of alcohol <100 g/week. **Results:** An association of CYBA -675 T / A with triglycerides was observed: 176.87 ± 12.93 (TT) versus 228.70 ± 21.66 (XA), mean $\pm$ SEM, $p = 0.007$. When the population is stratified, the association appears only among patients who have non-alcoholic steatohepatitis (NASH). An association of CYBA-675 T / A with HDL was observed: 48.05 ± 1.71 (TT) vs 41.70 ± 2.91 (TA) vs 28.03 ± 9.47 mg / dL (AA), mean $\pm$ SEM, $p = 0.001$. When the population is stratified, the association appears only among patients who have NASH. When the NOX4 (rs 3017887) gene was studied, there was association with ALT (CA + AA: 60.10 ± 6.01 U / L vs CC: 44.23 ± 4.36 U / L; $P = 0, 02$). However, when the population was stratified in steatosis and NASH, there was no statistically significant difference in the frequency of genotypes. There was no association of SNPs from genes encoding NADPH oxidase system proteins in the CYBA (unregistered) and Nox4 (rs 3017887) genes and the presence of NASH in the DHGNA carriers. Regarding the clinical results, it was observed that the most advanced degrees of fibrosis occurred in patients diagnosed with Type 2 Diabetes Mellitus (66.9% vs 37.5%, $p = 0.007$), in addition to being more obese (32.2% % vs 29%, $p = 0.003$). In addition, serum glucose and insulin levels increased significantly, according to the presence of NASH. The frequency of MS was significantly higher in patients with NASH. **Conclusions:** 1) There was an association between the presence of the CC genotype in the Nox4 SNP with a higher concentration of ALT in the general population. 2) There was an association between the presence of the AA genotype in the CYBA gene -675 T / A polymorphism with a higher concentration of TGL and lower HDL in patients with NASH. 3) There was an association between the presence of metabolic syndrome and advanced degrees of hepatic fibrosis in patients with NAFLD. However, the sample should be expanded to confirm these associations, as well as to better explore possible relationships with fibrosis and inflammation scores.

Descriptors: non-alcoholic fatty liver disease; NADPH oxidase; metabolic syndrome X; polymorphism, single nucleotide; oxidative stress.

1 INTRODUÇÃO

---

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais

A Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica (DHGNA) é uma entidade clínica patológica na qual ocorre excessivo depósito de lipídeos no hepatócito do parênquima hepático. O termo DHGNA refere-se a um espectro de doenças hepáticas, variando do acúmulo de gordura no fígado (esteatose simples ou, esteatose hepática não alcoólica), à forma potencialmente progressiva de esteatohepatite não alcoólica (EHNA), caracterizada, histologicamente, por balonização dos hepatócitos, inflamação, e frequentemente, associação com fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC).¹⁻³

Assim, reflete uma série de estados de doença, além de um espectro de severidade. A progressão da fibrose é caracteristicamente lenta com uma progressão de cada estágio, em média, de 7,7 anos. Entretanto, este tempo de progressão é duas vezes mais rápido na dependência de fatores genéticos e ambientais.⁴

Atualmente, é a forma mais comum de doença hepática nos países ocidentais e vem aumentando na Ásia. Estima-se que a prevalência de DHGNA seja entre 20%-30%, com aproximadamente 10-20% desses pacientes tendo EHNA.⁵⁻⁷ No Brasil, a frequência de EHNA entre indivíduos idosos e de meia idade encontra-se em torno de 35,2%.⁸ Outro estudo em nosso meio, realizado pela Sociedade Brasileira de Hepatologia avaliou as características clínico-epidemiológicas da DHGNA em 16 centros médicos distribuídos pelas cinco regiões do Brasil. Os dados deste estudo mostraram que a maioria dos indivíduos era do sexo masculino (53,3%), 85% eram assintomáticos e a maioria (58%) já apresentava EHNA e, desses, 27% apresentavam algum grau de fibrose, incluindo 15,4% de casos de cirrose. A síndrome metabólica (SM) estava presente em 41% dos casos de DHGNA neste estudo.⁹

Por outro lado, a prevalência de DHGNA varia drasticamente quando comparados indivíduos de diferentes raças e etnias, sendo mais prevalente em pacientes hispânicos comparados a não hispânicos brancos e afro-americanos.¹⁰ Tais diferenças raciais podem estar relacionadas a uma diferente distribuição do tecido adiposo, já que os hispânicos apresentam mais gordura visceral, se comparados aos

afro-americanos, para o mesmo índice de massa corpórea (IMC). Talvez haja uma influência genética.

Dados americanos sugerem que, em crianças, a prevalência de DHGNA mais que dobrou nas últimas duas décadas. E, atualmente, é a causa mais comum de doença hepática crônica, também nesta população, no mundo desenvolvido.¹¹

Apesar da escassez de dados relacionados à incidência da DHGNA, os principais fatores de risco, incluem: idade avançada, polimorfismo genético e fatores da SM. Esta tem um papel central na progressão da doença.¹² A síndrome metabólica é definida pela presença de dois ou mais das seguintes patologias: obesidade central, hipertensão arterial, hiperglicemia e dislipidemia.¹³ Conforme Quadro 1, abaixo:

Quadro 1 - Componentes da SM, segundo critérios da NCEP-ATP III [*Adult Treatment Panel III.*, 2001¹³].

Circunferência Abdominal	Homens > 94 cm; Mulheres > 80 cm
Triglicerídeos	≥ 150 mg/dL
HDL	Homens < 40 mg/dL Mulheres < 50 mg/dL
Pressão Arterial	≥ 135/80 mmHg ou uso de medicação
Glicemia de jejum	≥ 110 mg/dL ou uso de medicação

A obesidade está diretamente relacionada a presença e a severidade da DHGNA¹⁴⁻¹⁵. Diversas organizações de saúde, nacionais e internacionais relatam que a obesidade dobrou desde a década de 80. Em 2014, mais de 1,9 bilhões de adultos estavam acima do peso e desses, mais de 600 milhões eram obesos no mundo, traçando assim, um paralelo com a DHGNA.¹⁶⁻¹⁷

Apesar da DHGNA ser considerada um componente hepático da SM devido às suas fortes associações com a resistência à insulina (RI), e a obesidade visceral, a DHGNA é considerada uma condição multifatorial que leva não só ao aumento da mortalidade relacionada ao fígado, mas também, ao aumento do risco do desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 (DM) e doenças cardiovasculares (DCV).¹⁸

A DHGNA, incluindo a sua forma mais grave, a EHNA, é claramente marcada pela influência ambiental e padrões dietéticos, no entanto, a história natural e o impacto da morbimortalidade são altamente divergentes. Recentes estudos têm demonstrado que tanto a esteatose quanto a EHNA podem levar à progressão para fibrose. Além disso, tem se enfatizado a importância dos níveis de fibrose, em detrimento às outras características histológicas, como forte preditor de mortalidade e complicações da doença hepática.¹⁹⁻²¹ Embora o potencial da DHGNA progredir para cirrose e CHC seja bem reconhecido por décadas, dados mais recentes tem ajudado a definir a magnitude do risco de progressão e a entender que a DHGNA é a principal causa de cirrose criptogênica.²²⁻²³

Dentre os fatores preditores de progressão da DHGNA, tem-se dado grande importância à genética, tanto na susceptibilidade para o desenvolvimento da doença, quanto para a gravidade da lesão hepática. Crescentes evidências suportam o conceito que DHGNA é uma doença com algumas características hereditárias na qual, variações genéticas e ambientais interagem de perto para determinar o fenótipo da doença e a progressão para formas mais avançadas da doença.²⁴⁻²⁵

1.2 Fisiopatogênese da DHGNA

Embora já se reconheçam diversos fatores predisponentes da DHGNA, bem como aqueles associados à pior evolução da doença, a relação causal entre esteatose e EHNA, fibrogênese e cronicidade permanece pouco conhecida. Apesar das substanciais pesquisas, experimentais e clínicas, a patogênese não está ainda totalmente elucidada.

Hábitos alimentares, fatores ambientais e genéticos podem levar ao desenvolvimento de RI e obesidade, que são eventos iniciais no desenvolvimento da DHGNA, além da proliferação e mudanças na microbiota intestinal.²⁶ Juntas, a RI e a obesidade, estimulam a desregulação da lipólise periférica, que induz a produção de ácidos graxos não esterificados (NEFA) intra-hepáticos, além do aumento na lipogênese *de novo* (DNL) e inibição da lipólise.²⁷ Os ácidos graxos livres (AGL), oriundos dos não esterificados, deixam os hepatócitos sob uma carga metabólica

considerável, promovendo lipotoxicidade hepática, além de estresse do retículo endoplasmático (ER).²⁸ A RI também promove disfunção no tecido adiposo com a consequente produção e secreção alterada de adipocinas e citocinas inflamatórias.²⁹

A deposição de gordura no fígado ocorre sob a forma de triglicérides (TGL), provocando uma lipotoxicidade hepática, por meio dos altos níveis de AGL, colesterol livre e metabolitos lipídicos; com consequente disfunção mitocondrial, estresse oxidativo (EO) e produção de espécies reativas oxigênio (EROs).³⁰⁻³¹ Quando estes processos persistirem, ocorrerá a ativação de células estreladas, assim como a deposição de colágeno e a fibrose hepática.³²

A DHGNA tem sido considerada uma condição de múltiplos *hits*, ou seja, diversos estímulos interagindo entre eles formariam um círculo vicioso para o desenvolvimento e progressão da doença.³³ Essencialmente o primeiro estímulo (*first hit*) seria o desenvolvimento de esteatose hepática, via acúmulo de triglicérides (TGL) no interior dos hepatócitos, aumentando a vulnerabilidade hepática à vários possíveis outros estímulos (*second/ multiple hits*), que levariam a inflamação, fibrose e morte celular, características da EHNA.³⁴ Em pacientes com esteatose hepática, a maioria da gordura hepática vem do excesso de NEFA (59%); seguido pela DNL (26%), que está aumentada na DHGNA e, finalmente da alimentação (15%).³⁵

A sinalização à insulina fica prejudicada no tecido adiposo e hepático, favorecendo a lipogênese e inibindo a lipólise intra-hepáticas, aumentando de maneira excessiva o aporte de ácidos graxos (AG) a esse órgão, gerando lipotoxicidade. Ainda, á nível periférico, o acúmulo de gordura na musculatura esquelética, prejudica a sinalização de insulina, prejudicando a captação de glicose. Este cenário leva ao desenvolvimento de RI periférica e hiperinsulinemia compensatória, resultando também, no aumento de oferta de AG para o fígado. A hiperinsulinemia leva a superestimulação dos fatores de transcrição *Sterol regulatory element binding protein-1c* (SREBP-1) e *Carbohydrate response element-binding protein* (ChREBP), estimulando a DNL. A gliconeogênese não é suprimida, apesar da hiperinsulinemia, proporcionando ainda mais substrato para a DNL.³⁶

Por outro lado, a lipotoxicidade gera na mitocôndria um esgotamento da β -oxidação. A SREBP-1 ativa a *acetil-CoA carboxilase 2* (ACC2) resultando num aumento dos níveis de malonil-CoA, o que diminui β -oxidação via redução da

entrada de AGL na mitocôndria, por inibição da *carnitina palmitoil-transferase 1* (CPT-1).³⁷⁻³⁸

Além disso, a RI também bloqueia a exportação de TGL dos hepatócitos por degradar e impedir a produção de lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL).³⁹ Na depleção da oxidação mitocondrial ocorre a ativação de vias alternativas, como as vias microssomal e peroxissomal, resultando na formação adicional de EROs.⁴⁰ Ao mesmo tempo, a peroxidação lipídica de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) gera subprodutos tóxicos, incluindo; malondialdeído e hidroxinonenal, ainda mais tóxicos que as EROs, e por isso pode danificar mais organelas intracelulares distantes, causando morte celular.⁴¹ O EO é definido como um desbalanço entre a produção de EROs e os antioxidantes protetores e, é o caminho final da lipotoxicidade pelos AGL.⁴²

O ER, por sua vez também sofre com o excesso de AGL, podendo ocorrer uma formação incorreta das proteínas normalmente secretadas. Essas formam agregadas e, um mecanismo adaptativo denominada resposta proteica mal enovelada (UPR), que seria desencadeado podendo levar a indução de autofagia.⁴³

Assim, a persistência dos efeitos combinados descritos anteriormente, bioquímicos e imunológicos, levam à ativação das células estreladas hepáticas (HSCs), deposição de colágeno e formação de fibrose.⁴⁴⁻⁴⁵

Desta forma, a progressão de esteatose para EHNA e fibrose poderia ocorrer por três mecanismos principais: peroxidação lipídica, indução de citocinas pró-inflamatórias e também indução de ligantes Fas (e apoptose). A peroxidação de lípidos deflagrada pelas EROs causa necrose celular ou induz apoptose que podem se ligar a proteínas hepatocitárias (formando neoantígenos e iniciando uma resposta imune potencialmente danosa), gerar citoqueratinas de ligação cruzada para formar corpúsculos hialino de Mallory ou ativar HSCs promovendo síntese de colágeno e estímulo de quimiotaxia de neutrófilos⁴⁶ (Figura 1).

As alterações histológicas que distinguem um potencial para progressão da EHNA de formas relativamente estáveis são: balonização, inflamação e fibrose. A balonização celular não é específica da EHNA, mas pode ser vista como um processo de “falência de multiorganelas”, começando com a geração de superóxidos e com subsequente injúria oxidativa, além de um ambiente rico em gordura. Esses eventos levam a ativação do sistema imunológico.⁴⁷

Figura 1 - Múltiplas hipóteses para o desenvolvimento da DHGNA [Adaptado de Buzzetti e cols., 2016⁴⁶].

Outros fatores podem estar envolvidos na fisiopatogênese da DHGNA. Tem sido descrito a importância da ativação no eixo intestino-gordura-fígado. Assim, um aumento das endotoxinas derivadas da permeabilidade intestinal teriam um papel crucial no desenvolvimento e na progressão da DHGNA. Alteração da flora intestinal leva a maior produção de AG no intestino, aumento da permeabilidade do intestino delgado e assim aumento da absorção de AG com elevação nos níveis circulantes de moléculas que contribuem para a ativação da atividade inflamatória e caminhos e Fator de necrose tumoral α (TNF- α).⁴⁸

Embora trabalhos anteriores tenham argumentado que a esteatose sempre precederia a inflamação, reconhece-se agora a EHNA, pode ser a lesão hepática inicial: a combinação genética, eventos externos e intracelulares, ao invés da soma simples de insultos hepáticos, podem resultar em diferentes caminhos que conduzem a esteatose ou EHNA.⁴⁹

1.3 DHGNA e genética

A DHGNA é uma entidade complexa, e com desenvolvimento e progressão variados entre os indivíduos. A razão para essas diversidades não é totalmente conhecida, porém, a influência ambiental; como os hábitos alimentares, a microbiota intestinal, além de múltiplos fatores genéticos já foram descritos.⁵⁰⁻⁵²

Acredita-se que os fatores genéticos contribuam em 30-50% no risco em casos de doença de alta prevalência, como obesidade, DCV e cirrose.⁵³ Com relação a DHGNA, diferentes abordagens já foram utilizadas para explorar a genética, conforme a Figura 2, abaixo:

Figura 2 - DHGNA como doença poligênica e hereditária. GWAS: *genome wide association*, EWAS: *Exome Wide Association Study* [Sookoian e cols., 2017⁵⁴].

Os estudos funcionais e experimentais visam fornecer informações mecanicistas sobre o papel de uma variante ou *locus* de interesse no fenótipo explorado.

Estudos de agregação familiar são tipicamente conduzidos para identificar o componente genético de doenças complexas; com o objetivo de avaliar o agrupamento da doença dentro das famílias. Além disso, estudos de grandes registros com gêmeos, são recursos altamente benéficos para comparar o risco genético de uma doença entre monozigóticos e gêmeos dizigóticos. Há grande concordância para o avanço maior da DHGNA entre gêmeos monozigóticos, comparados à dizigóticos com uma estimativa de 50% de contribuição da hereditabilidade na variabilidade.⁵⁵⁻⁵⁶ Schwimmer e colaboradores (2009), estudaram crianças obesas, das quais 33 tinham EHNA

confirmado histologicamente, e 11 não tinham esteatose hepática. Estudando seus familiares de 1º, 2º e 3º graus, encontraram um forte traço hereditário, isto é, uma grande fração da variação total do fenótipo atribuível a fatores genéticos, com uma prevalência de EHNA de 59% nos irmãos e 78% nos pais de crianças com EHNA, comparativamente a, respectivamente, 17 e 37% nos controles.⁵⁷

Outra evidência da influência genética para o desenvolvimento de DHGNA é a diferente prevalência destas condições em indivíduos de diferentes etnias.⁵⁸⁻⁵⁹ Em uma coorte não selecionada de 2.349 adultos norte-americanos, 45% dos latino-americanos, 33% dos brancos e 24% dos negros apresentavam DHGNA. Uma justificativa para esta variação entre as raças, além da possível associação genética, seria os fatores de risco metabólicos e as características socioeconômicas associadas à DHGNA, que diferem entre estes grupos, tornando difícil a interpretação dos dados. No entanto, as diferenças na distribuição no acúmulo de gordura, e a incidência de RI terem sido relatadas, demonstra a variabilidade.⁶⁰⁻⁶¹ Romero e colaboradores (2008) demonstraram que o aumento na prevalência de um polimorfismo genético conferiu maior susceptibilidade para DHGNA entre os latino-americanos.⁶²

Um estudo do nosso grupo, em coparticipação com Universidade Santa Maria (Portugal), sobre a contribuição da ancestralidade genética na DHGNA, mostrou que ambas as coortes foram similares para Esteatose e EHNA.⁶³

Não existe um único gene suficiente para determinar o resultado, principalmente em doenças complexas como a DHGNA. Assim, a susceptibilidade é determinada pelos efeitos combinados de múltiplos polimorfismos relativamente comuns (menor frequência do alelo, 1-5%), cada um faz uma pequena contribuição no risco global de ter a doença.⁶⁴

Aproximadamente 0,1% da sequência do genoma diferem entre os seres humanos e a maioria dessas diferenças corresponde a polimorfismos (ou seja, variações presentes em mais de 1% da população). A forma mais comum de polimorfismo é conhecida por *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs), na qual há troca, inserção ou deleção de um único nucleotídeo na molécula de DNA. A maioria dos polimorfismos não tem repercussão funcional. Alguns polimorfismos, no entanto, são considerados funcionais por serem capazes de influenciar a expressão gênica,

aumentando ou diminuindo a quantidade final da proteína codificada por aquele gene.⁶⁵

Com a maior compreensão do genoma após a conclusão do projeto *HapMap* e outros recursos semelhantes, uma série de estudos de perfis de expressão gênica, de associação genômica ampla (do inglês: *Genome Wide Association Study* - GWAS) e de *Exome Wide Association Study* (EWAS) têm identificado polimorfismos em genes que afetam o metabolismo lipídico, citocinas, mediadores de fibrose e estresse oxidativo, bem como, novas vias moleculares relacionadas à EHNA e/ou fibrose, e que podem ser potenciais biomarcadores de progressão da DHGNA⁶⁶⁻⁶⁷ (Figura 3).

Figura 3 - Sequência de passos da fisiopatologia da DHGNA e os genes envolvidos em cada evento. FFA: free fatty acids, EO: estresse oxidativo, TGL: triglicérides [Adaptado de Mehta e cols., 2014⁶⁸].

Dentre os genes conhecidos, o *patatin-like phospholipase domain-containing 3* (PNPLA3), e o *transmembrane 6 superfamily member 2* (TM6SF2), são os mais bem caracterizados até o momento.⁶⁹⁻⁷⁰

OS GWAS e EWAS, incluem uma pesquisa global de variantes de sequência em todo o genoma ou variantes nas regiões de codificação, respectivamente. Os estudos são focados em *loci* selecionados com base em sua função conhecida ou presumida ou em sua plausibilidade biológica na fisiopatologia da doença.

A natureza poligênica da DHGNA, que é determinada pela interação entre fatores ambientais e SNPs em genes de susceptibilidade, torna sua investigação muito difícil por várias razões: (1) grande número de SNPs no genoma humano (aproximadamente 10 milhões); (2) múltiplos genes influenciando a expressão da doença, cada um deles com um efeito relativamente fraco; (3) interação entre os genes e (4) participação dos fatores ambientais modulando o efeito genético. Além disso, características étnicas e geográficas influenciam a frequência dos SNPs, de maneira que a associação de polimorfismo com um traço fenotípico em determinada população pode não se reproduzir em outras⁷¹.

1.4 Sistema NADPH Oxidase

As *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH) oxidases, também conhecidas como NOX, são proteínas que transferem elétrons por meio de membranas e catalisam a redução dependente de NADPH de O₂ a em O₂⁻, gerando EROS⁷² (Figura 4).

Figura 4 - Equação da produção de Superóxido a partir da redução de NADPH realizado pela NADPH oxidase (Bedard *et al.*, 2007)⁷².

Desde as observações de Baehner *et al.* (1970), há mais de 40 anos, que permitiram a descoberta da NADPH oxidase, vários estudos têm sido desenvolvidos, para compreender a relação deste complexo enzimático e o EO.⁷³

As EROs são moléculas que reagem muito rapidamente umas com as outras. Se por um lado a participação de oxigênio nesses processos de oxi-redução é fundamental para a vida, por outro pode resultar na formação excessiva de EROs a qual precisa ser

controlada para evitar o estresse oxidativo. Assim, o Sistema NADPH pode desempenhar papel tanto de defesa contra vírus, bactérias, como atuar como agente pró inflamatório por meio da produção excessiva de EROs. O EO se estabelece quando as defesas intracelulares antioxidantes são insuficientes para detoxificar as EROs ou, também, quando há produção excessiva de EROs.⁷³

O complexo NADPH foi primeiramente descrito em neutrófilos, liberando superóxido em atividades fagocíticas.⁷⁴ Atualmente, se conhecem, entre os humanos, quatro proteínas homólogas adicionais (NOX1, NOX3, NOX4 e NOX5) e duas enzimas relacionadas (DUOX1 e DUOX2) que podem funcionar em não fagócitos. O sistema NADPH oxidase é um complexo enzimático, com componentes localizados na membrana celular, no citosol e também no substrato, formando heterodímeros que se estabilizam mutuamente. Entre os sete membros da família NOX, a NOX1 é estruturalmente e funcionalmente similar à NOX2. O clássico complexo NOX fagocítico consiste da subunidade catalítica gp91^{phox} (o termo “phox” deriva de “phagocytic oxidase”), renomeada NOX2, junto com a subunidade regulatória p22^{phox} localizadas na membrana. Este conjunto é denominado b558. Os outros componentes regulatórios são; p47^{phox}, p40^{phox}, p67^{phox} e a pequena GTPase Rac, e estão normalmente localizados no citoplasma. Após um estímulo, as subunidades citosólicas translocam para a membrana, onde eles interagem com o citocromo b558, levando à atividade enzimática⁷⁵. Enquanto a NOX1 é também p22^{phox}-dependente, a NOX 1 pode usar a NOXO1 (homóloga da p47^{phox}) para organizar a montagem (*assembly*) das enzimas e a NOXA1 (homóloga da p67^{phox}) para a ativação enzimática⁷⁶. Em contraste, a NOX4 requer apenas a p22^{phox} sem o recrutamento dos componentes regulatórios citosólicos para exercer sua atividade enzimática.⁷⁷

Todas as enzimas NOX são capazes de catalisar a redução do oxigênio molecular para superóxido, mas elas apresentam diferenças chave nas suas ativações, composições de subunidade, localizações e expressões.⁷⁸⁻⁷⁹ Os complexos NADPH fagocítico e não fagocítico são estruturalmente e funcionalmente similares, reduzindo moléculas de oxigênio e gerando superóxido. Os complexos não fagocíticos da NADPH oxidase são constitucionalmente ativos, produzindo níveis relativamente baixos de EROs e gerando altos níveis de oxidantes em resposta às citocinas. Outra

importante diferença está relacionada aos múltiplos homólogos que são capazes de substituir os componentes clássicos.⁸⁰

A Figura 5 exemplifica o complexo fagocítico NOX2 e o complexo não-fagocítico NOX1.

Figura 5 - Sistema NADPH oxidase 1 e 2. As subunidades catalíticas (NOX-1 e NOX-2 ou gp91phox), a subunidade regulatória (p22phox), os componentes citosólicos (p40phox, p47phox, p67phox, NOXO1 e NOXA1), o substrato Rac2, o doador de elétron NADPH e o FAD, que participa da transferência de elétrons, estão demonstrados. [Adaptado de Newsholme e cols.⁸¹].

No fígado, a NOX é expressa funcionalmente tanto na forma fagocítica (Células de Kupffer) como não fagocítica (Células estreladas), sugerindo o envolvimento da NADPH na ativação das HSC. Estudos experimentais demonstram que os componentes da NOX fagocítica como a NOX2, p40^{phox}, p47^{phox} e p67^{phox} são principalmente expressos nas células de Kupffer, enquanto os componentes não fagocíticos incluindo NOX1, NOXO1 e NOXA1 são expressos nas HSCs e células endoteliais.⁸²

1.5 Polimorfismo da NADPH oxidase

A proteína p22phox é codificada pelo gene *CYBA* (citocromo b-245α), localizado no cromossomo 16q24 e contém seis éxons. A p22phox requer a presença

de uma isoforma da NOX, e vice-versa para expressão, visto que elas agem para estabilizar mutuamente uma a outra na membrana. Assim, variação na estrutura ou função da p22phox tem o potencial de influenciar a atividade de um número de isoformas da NOX, e isto poderia influenciar a geração de EROS em diversos tecidos e em diversas condições.⁸³

Dentre os componentes do sistema NADPH oxidase, a p22phox foi a que despertou o maior interesse da comunidade científica. Vários polimorfismos já foram descritos na região promotora e na região codificadora do gene *CYBA* e alguns deles são capazes de influenciar a expressão gênica, o que resulta em variação funcional significativa no nível de estresse oxidativo entre indivíduos. Alguns polimorfismos também já foram associados com hipertensão arterial sistêmica (HAS), doença arterial coronariana, infarto do miocárdio e nefropatia diabética e não diabética.⁸⁴⁻⁸⁵

Um polimorfismo importante é o C242T, resultante da substituição da histidina por tirosina na posição de aminoácido 72, um potencial sítio de ligação do heme. O polimorfismo C242T tem uma forte influência na modulação da expressão da p22phox, atividade da NADPH oxidase e geração vascular de O₂. Isto leva a uma variação funcional significativa no estresse oxidativo vascular entre os indivíduos, e desta maneira a uma variação na sua suscetibilidade para aterosclerose.⁸⁶

O polimorfismo -675 T/A (não registrado) é uma variação genética recentemente estudada. Se localiza na região promotora (88718096) do gene *CYBA*, no braço longo do cromossomo 16 (16q24), em um sítio de potencial ligação ao fator de transcrição induzido por hipóxia-1 (HIF-1 α). Foi recentemente identificado em um estudo espanhol caso-controle, o papel de risco do alelo T para a presença de HAS. Assim, a presença do alelo A foi associada a menor atividade do gene em questão.⁸⁷

O gene NOX4 está localizado no cromossomo 11 e contém 19 éxons.

Recentemente, nosso grupo observou em pacientes portadores de vírus da hepatite C (HCV) uma associação entre polimorfismo da NOX 4 e SM. Os resultados sugerem que os polimorfismos da NOX 4 e *CYBA* avaliados não são, no entanto, o polimorfismo rs3017887 da NOX 4 poderia influenciar indiretamente fibrose, dando susceptibilidade a SM devido à sua associação inversa com SM, em pacientes do sexo masculino.⁸⁸

1.6 NADPH e DHGNA

Evidências bem fundamentadas relacionam o papel do EO na evolução de esteatose para EHNA e fibrose.⁸⁹ Diversos sistemas enzimáticos, em diferentes localizações, podem contribuir para a formação de EROs no fígado, incluindo células endoteliais que sintetizam óxido nítrico, citocromo P450, monoxigenases, e o sistema NADPH. O acúmulo de EROs nos hepatócitos pode causar morte celular, que estimula as células de Kupffer a recrutar as células imunológicas para produzir mediadores pró-fibrogênicos, entre eles os miofibroblastos. Assim, as EROs são vitais para ativação das células estreladas, resultando em início da fibrose.⁹⁰

Diversas células hepáticas podem expressar diferentes membros da “família NOX”. Entretanto, há poucas informações sobre as isoformas de NOX especificamente presentes em cada célula do fígado.⁹¹ As principais isoformas expressas no fígado são NOX1, NOX2, NOX4, DUOX1 e DUOX2. A NOX 1 é expressa nos sinusóides de células endoteliais (CE), células de Kupffer, HSCs, hepatócitos e infiltrando leucócitos no fígado⁹² (Figura 6).

A NOX 4 é expressa em hepatócitos, células de Kupffer e cultura ativada (mas não quiescente) de HSC de ratos⁹³. As funções fisiológicas das NOXs no fígado ainda são parcialmente compreendidas.

Figura 6 - Distribuição Celular das isoformas de NOX no Fígado [Adaptado Paik e cols., 2014⁹⁴].

Estudos experimentais e *in vivo*, recentes, demonstraram que um inibidor das NOX 1/4 pode diminuir a inflamação hepática, além da fibrose e melhorar a sensibilidade à insulina.⁹⁵⁻⁹⁶ Por outro lado, a hiperglicemia persistente pode estimular as HSC a proliferar e produzir matrix extracelular (MEC), por meio da ativação das NOXs.⁹⁷⁻⁹⁸ Carmiel-Haggá e colaboradores (2005) descreveram um aumento da atividade da NOX em ratos *fa/fa* com dieta rica em gordura onde houve correlação com o aumento da peroxidação lipídica.⁹⁹ Entretanto, ainda não está bem entendido qual o papel do NOX2 fagocítico na progressão da DHGNA. A ativação do NOX2 não fagocítico nas células de Kupffer, por exemplo, é um determinante importante da produção mediada por leptina de EROs e ativação de macrófagos.¹⁰⁰

A leptina é uma citocina pró-fibrogênica e pode induzir a ativação da NADPH nas HSC além de ser um importante fator de progressão de fibrose em EHNA.¹⁰¹⁻¹⁰²

Também é importante lembrar que as NOXs podem conferir uma sensibilidade individual à SM e EHNA, por polimorfismos associados à produção de ROS. Recentemente foi mostrado que um único polimorfismo de nucleotídeos, rs1836882 na região promotora do gene NOX4, foi associada a maior ingestão calórica e níveis de EROs.¹⁰³

Assim, pela participação na geração de EROS, os genes que codificam proteínas do sistema NADPH oxidase são potenciais genes candidatos que podem participar da susceptibilidade genética para o desenvolvimento da EHNA.

1.7 Fibrogênese hepática e NADPH

A fibrose hepática é o resultado de uma complexa interação entre diversas células, durante uma injúria hepática crônica, levando à ativação das HSCs, que estimulam os miofibroblastos. Estes, por sua vez, promovem a deposição de MEC, a qual é composta por colágenos, glicoproteínas, fatores de crescimento ligados à matriz, glicosaminoglicanas, proteoglicanas e proteínas. Esse conjunto forma o “arcabouço” tanto do fígado normal, quanto do fígado com fibrose¹⁰⁴⁻¹⁰⁵. Porém, quando a fibrose se desenvolve, há múltiplas mudanças neste conteúdo específico, com aumento de 3-

10 vezes no conteúdo de colágeno, além da proliferação de diversas estruturas celulares.

Com todas essas mudanças, há uma transição a partir da matriz de baixa densidade, no espaço subendotelial, que é encontrado no fígado normal para o tipo intersticial que é associado à disfunção de hepatócitos e ativação das HSCs, que são as principais fontes de MEC.¹⁰⁶ Assim, as HSCs passam de um estado de repouso para um estado de proliferação, tornando-se fibrogênica e estimulando a contração de miofibroblastos.¹⁰⁷

Embora a fibrose seja reversível em seus estágios iniciais, a fibrose progressiva pode levar à cirrose. O ponto exato em que a fibrose se torna irreversível não é completamente compreendido. No entanto, cada vez mais evidências sugerem que mesmo os estágios iniciais de cirrose podem ser reversíveis.¹⁰⁸

Recentemente, nosso grupo publicou dois estudos demonstrando que, em modelo experimental, todo o espectro da DHGNA, incluindo EHNA com balonização, fibrose, cirrose e CHC, auxiliando no entendimento das várias etapas de desenvolvimento da doença.¹⁰⁹⁻¹¹⁰

Diferentes estímulos podem ativar as NOX nas células estreladas. Primeiro os mediadores fibrogênicos como as Angiotensinas 2, ativando diretamente as NOXs a produzirem EROs, com o estímulo de diferentes sinalizadores intracelulares, como a MAP Kinases.¹¹¹ Então, as adipocitocinas usadas na fibrose hepática, como as leptinas, estimulam a NADPH a produzir EROs nas HSCs. E, finalmente, ocorre a fagocitose dos corpos apoptóticos, derivados do dano dos hepatócitos, pelas HSCs, resultando na ativação das NADPH oxidases.¹¹²

Assim, como não existem fatores preditivos para o desenvolvimento de EHNA em pacientes com DHGNA, com excessão da SM, a busca de marcadores genéticos se torna importante, pois poderia possibilitar o rastreamento dos pacientes com maior susceptibilidade para o desenvolvimento da EHNA, além de otimizar um tratamento nessa população.

2 JUSTIFICATIVA

---

2 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a associação da fibrose hepática em portadores de DHGNA e o papel do EO nesta evolução, torna-se importante a busca por marcadores genéticos capazes de identificar aqueles indivíduos com maior ou menor risco de progressão de doença. O sistema NADPH parece ser uma importante fonte de EROS, e estes estão relacionados com a evolução da doença inflamatória em pacientes com DHGNA. Porém, o papel dos polimorfismos do sistema NADPH nessa população e sua possível relação com progressão de doença e síndrome metabólica são desconhecidos. Desta maneira, idealizamos um estudo transversal que avaliasse a interferência desses polimorfismos em pacientes com EHNA.

Importante ressaltar que não existem estudos de SNPs em NADPH oxidases em pacientes com DHGNA no Brasil.

3 OBJETIVOS

---

3 OBJETIVOS

- 1) Avaliar a possível associação de SNPs de genes que codificam proteínas do sistema NADPH oxidase no gene *CYBA* (não registrado) e no gene *NOX4* (rs3017887), e a presença de EHNA, nos portadores de DHGNA;
- 2) Estimar a possível associação entre estes polimorfismos com fibrose hepática. RI, SM e EHNA.

4 MÉTODOS

---

4 MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Estudo transversal, avaliando pacientes com DHGNA, provenientes do Ambulatório de doença hepática gordurosa não alcoólica, do Serviço de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), entre janeiro de 2009 e agosto de 2012.

De um total de 360 pacientes acompanhados, 207 pacientes, foram selecionados (Figura 7).

Todos os pacientes foram avaliados por histologia hepática, por meio de biópsia hepática, sem complicações.

Figura 7 - Grupos de pacientes incluídos no estudo.

4.2 Critérios de inclusão

- Portador de DHGNA com idade de 18-75 anos, ambos os sexos;
- Biópsia hepática compatível com DHGNA;
- Consentimento informado assinado.

4.3 Critérios de exclusão

- Outras causas de hepatopatia crônica, como: esquistossomose, hepatites virais, hepatite autoimune, doença de Wilson, deficiência de alfa 1-antitripsina, hemocromatose e ingestão de álcool (> 100g etanol/ semana).
- Recusa em colaborar com a pesquisa

4.4 Avaliação clínica

No dia da realização da biópsia hepática ou próximo a realização da biópsia (até 3 meses) foram obtidos os dados demográficos, como gênero e a presença de comorbidades, tais como DM e dislipidemia, definidas segundo ATP III (Hipertrigliceridemia: > 150 mg/ dL; HDL colesterol: < 40 mg/ dL em homens e < 50 mg/ dL em mulheres; Glicemia de jejum: >110 mg/ dL). Para avaliação de resistência insulínica foi usado o HOMA (*Homeostasis Model Assessment*) (glicose de jejum [mg/dL] /18 x insulina de jejum [μ U/ mL] / 22,5). Foi utilizado como marcador de RI o *Homeostasis Model Assessment* (HOMA), quando maior ou igual a 2,5.¹³

4.5 Determinações bioquímicas

Os exames séricos realizados já são protocolados de rotina nos pacientes que são submetidos à biópsia hepática. São os seguintes exames: 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, autoanticorpos hepáticos, cobre e ceruloplasmina sérica, perfil de ferro. Além disso, foram solicitados exame parasitológico de fezes e pesquisa de ovos de *Schistosoma mansoni* (Kato-Katz), caso ainda não tivessem sido realizados.

Amostras de sangue coletadas após o jejum de 12 horas foram centrifugadas em até uma hora após a coleta para a separação de plasma, soro e células leucocitárias e

armazenadas a -80°C . As análises bioquímicas foram realizadas no laboratório central do HCFMUSP. As concentrações de glicose foram determinadas pelo método enzimático da hexoquinase (Cobas, Roche, Suíça); a insulina, pelo método de quimioluminescência (Cobas, Roche, Suíça); o colesterol total, colesterol HDL e triglicerídeos, pelo método colorimétrico enzimático (Cobas, Roche, Suíça), e o colesterol LDL, pela equação de Friedwald.

4.6 Polimorfismo nos genes da NADPH oxidase

Os experimentos de biologia molecular relacionados ao polimorfismo nos genes que codificam proteínas do Sistema NADPH Oxidase foram realizados no Laboratório de Gastroenterologia Clínica Experimental (LIM/07) e no Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular (LIM/25) da FMUSP.

4.6.1 Extração do DNA genômico

Em um tubo graduado, foram acrescentados 15 mL de Tris EDTA (TE) (*Sigma Aldrich*, St. Louis, EUA) para cada 5 mL de sangue total. O tubo foi homogeneizado manualmente e, a seguir, centrifugado a 1.500g durante 5 min. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado formado foi lavado em 15 mL de TE até sua dissolução total. Após a lavagem, foi realizada nova centrifugação, e o sobrenadante foi desprezado. Essa lavagem foi repetida quatro vezes, até que o precipitado assumia coloração esbranquiçada. Em seguida, foram adicionados ao precipitado:

- 3 mL de Tampão A (25 mM de EDTA e 75 mM de NaCl)
- 200 μL de sódio dodecil sulfato (SDS) 10% (Sigma)
- 100 μL de Proteinase K (Sigma)

Essa solução foi incubada por 12 h a 37°C e, após esse intervalo, foi adicionado 1 mL de NaCl 5M. Após agitação vigorosa durante 30 min, o tubo foi centrifugado a 2.500g durante 15 minutos, o precipitado desprezado e o sobrenadante recolhido em novo tubo.

Dez mL de etanol absoluto gelado foram adicionados ao tubo, com posterior homogenização por inversão até o aparecimento de um precipitado fibrilar que foi transferido para novo tubo tipo *Eppendorff* 1,5 mL e seco em temperatura ambiente (TA) durante 30 min. O precipitado foi resuspendido em 50 – 200 µL H₂O miliQ estéril e incubado a 37 °C durante 15 min. A quantificação do DNA foi determinada por espectrofotometria (GeneQuant DNA/RNA Calculator, Pharmacia, LKC Biotechnology, Uppsala, Suécia). O DNA assim obtido foi armazenado à temperatura de -20 °C.

4.6.2 Genotipagem dos polimorfismos –1435 C/A no gene NOX4 (rs3017887) e -675 T/A no gene CYBA (não registrado)

Esses polimorfismos foram genotipados por PCR em tempo real, com a utilização de iniciadores específicos e sondas marcadas com os cromóforos VIC e FAM, que reconhecem cada um dos genótipos possíveis do polimorfismo. A PCR foi realizada com a utilização do *kit* comercial *StepOne Plus*, *Applied Biosystems* (*Applied Biosystems*, Foster City, California, USA), conforme as recomendações do fabricante.

4.7 Análise histológica

Fragmentos de tecido hepático previamente fixado em solução de formol a 4% foram processados e submetidos às colorações de hematoxilina-eosina (HE), Tricrômio de Masson e Perls para pigmentos. As amostras de fígado foram avaliadas de maneira cega por um patologista hepático experiente. Os seguintes parâmetros histológicos foram semi quantificados: balonização, esteatose micro e/ou macro, sua distribuição zonal, infiltrado inflamatório e sua distribuição zonal, fibrose portal e perivenular, necrose focal.

As variáveis histopatológicas para atividade foram graduadas de acordo com o escore da atividade da DGHNA – *NAFLD Activity Score* (NAS) definida pelo *Pathology Committee of the NASH Clinical Research Network*¹¹³ (Quadro 2), que incluem apenas características da lesão ativa e que reverte em curto espaço de tempo. O escore é definido pela soma dos graus de esteatose (0 a 3), inflamação lobular (0 a 3), e balonização (0 a 2). Os valores variam de 0 a 8. Os valores NAS ≥ 5 correlacionam-se com o diagnóstico de EHNA e o escore menor 3 diagnosticados não EHNA, e os valores de 3 e 4 podem ser alocados nas categorias de ausências, presença ou provável EHNA. A fibrose, que é menos reversível e resultante da atividade da doença, não está inclusa no escore. A separação da fibrose das outras variáveis histológicas facilita a compreensão quanto ao estadiamento (“grau de fibrose”) e o que indica a atividade necro-inflamatória (“escore”) na EHNA. Para a esteatose macro e microvesicular, tendo em vista a porcentagem de hepatócitos infiltrados, a intensidade considerada será: Grau 0, <5%; Grau I, >5% a 33%; Grau II, >33% e 66% e Grau III >66%.

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

O escore está representado no quadro 2, abaixo:

Quadro 2 - Escore da atividade da DGHNA – NAFLD *Activity Score* (NAS) definida pelo *Pathology Committee of the NASH Clinical Research Network* [Kleiner e cols., 2005¹¹³].

ESTEATOSE	
0	<5%
1	5%-33%
2	>33%-66%
3	>66%
FIBROSE	
0	Ausente
1	Perissinusoidal ou periportal
1A	Moderada, zona 3, perissinusoidal
1B	Portal/periportal
1C	Perissinusoidal e portal/periportal
2	Pontes de fibrose
3	Cirrose
4	
INFILTRADO LOBULAR	
0	Sem foco
1	< 2 focos por campo de 200X
2	2-4 focos por campo de 200X
3	4 focos por campo de 200X
BALONIZAÇÃO	
0	Ausente
1	Poucas células com balonização
2	Muitas células / balonização proeminente

NAS <3: sem EHNA; NAS 3-4: Indeterminado; NAS>5: EHNA

4.8 Questões éticas

Todos os indivíduos que concordaram em participar do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em 6 de outubro de 2013, sob o protocolo de pesquisa 435.621.

4.9 Análise estatística

Dados quantitativos foram expressos como média $\pm$ DP, exceto quando indicado de outra forma. As variáveis contínuas foram transformadas em *log*, para as análises quando a normalidade da distribuição foi rejeitada pelo teste de Shapiro-Wilk W. Os testes qui-quadrado de Fisher, ANOVA e ANCOVA foram utilizados para comparações entre os grupos. As distribuições genótípicas observadas estavam em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (EHW). A associação entre SM e EHNA foi realizada por modelos de regressão. Análises de regressão logística foram utilizadas por análises transversais. O *Odds ratio* (OR), com seus intervalos de confiança de 95% (IC), foi calculado para o alelo menor de cada SNP em um modelo codominante ou dominante.

Ajustes para os parâmetros clínicos e laboratoriais foram realizados mediante a inclusão destas variáveis como covariáveis no modelo de regressão. A interação entre EHNA e genótipo (na análise *CYBA*) foi avaliada mediante a inclusão no modelo de regressão (ANOVA ou regressão logística) de uma covariável composta “cruzada” (EHNA/genótipo). Os efeitos relacionados a EHNA foram então realizadas pela “*nesting*” da variável genotípica dentro da variável EHNA no modelo de análise. Isso resulta no cálculo dos efeitos estatísticos para esteatose e EHNA separadamente e ajustados para comparações múltiplas devido à estratificação por esta variável.

Correção para comparações múltiplas devido a testes de múltipla SNP foram realizadas por correção de Bonferroni. Um valor de $p \leq 0.025$ foi considerado significativo para comparações relacionadas ao genótipo.

As análises estatísticas foram realizadas com o *software* JMP (*SAS Institute Inc.*, Cary, NC) e R (<http://www.R-project.org>) (Team RC, 2013).¹¹⁴

5 RESULTADOS

---

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização dos pacientes de acordo com a presença de EHNA

As características demográficas, clínicas e bioquímicas, de acordo com presença de Esteatose ou EHNA estão expostas na Tabela 1. Do total de 207 pacientes incluídos na avaliação, 180 (86,9%) apresentavam EHNA.

Observou-se que os graus de fibrose mais avançados ocorreram em pacientes com diagnóstico de DM (66,9% *vs* 37,5%; $p=0,007$), além de serem mais obesos (32,2% *vs* 29%; $p=0,003$). Também foi observado que os níveis séricos de glicose e insulina aumentaram significativamente, de acordo com a presença de EHNA. A frequência da SM foi significativamente maior em pacientes com EHNA (82,4% *vs* 62,5%; $p=0,03$).

As demais características não diferiram significativamente entre os pacientes com e sem EHNA.

Tabela 1 - Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes com DHGNA de acordo com a Presença de Esteatose ou EHNA.

	Esteatose	EHNA	P
N	27	180	
Idade (anos)	52.1 ± 12.6	56.0 ± 9.4	0.21
Sexo: H/M (%)	32 / 68	24 / 76	0.35
Dislipidemia (%)	66.7	72.9	0.62
Diabetes mellitus (%)*	37.5	66.9	0.007
HAS (%)	75.0	67.9	0.64
Síndrome Metabólica*	62.5	82.4	0.03
IMC*	29.0 ± 5.4	32.2 ± 5.2	0.003
Glicemia (mg/dL)*	106.8 ± 41.1	118.6 ± 39.9	0.02
Insulina*	15.4 ± 10.7	20.9 ± 15.3	0.02
HOMA*	5.0 ± 5.0	6.2 ± 5.2	0.06
Colesterol Total (mg/dL)	193.5 ± 43.7	197.2 ± 45.0	0.73

continua

			conclusão
	Esteatose	EHNA	P
LDL (mg/dL)	110.8 ± 38.0	117.0 ± 38.6	0.36
HDL (mg/dL)	48.0 ± 10.0	48.3 ± 14.9	0.81
Triglicérides (mg/dL)	168.0 ± 97.2	174.4 ± 100.5	0.59
ALT (U/L)	45.2 ± 29.3	56.7 ± 105.6	0.73
AST (U/L)	28.7 ± 12.7	39.2 ± 32.7	0.07
GGT (U/L)	68.0 ± 81.7	89.5 ± 94.8	0.59

AST: Aspartato Aminotransferase, ALT: Alanina Aminotransferase, GGT: Gama Glutamiltransferase, HDL: Lipoproteína de alta densidade, LDL: Lipoproteína de baixa densidade, IMC: índice de massa corpórea, HOMA: *Homeostasis model assessment*

Valores de referência: AST: homem (10 – 34 U/L), mulher (10 - 36 U/L); ALT: homem (10 - 44 U/L), mulher (10 - 36 U/L); GGT: homem (11 - 50 U/L), mulher (7 - 32 U/L)

p < 0,05 foi considerado significativo.

5.2 Caracterização dos pacientes de acordo com a presença de SM

As características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes com DHGNA, de acordo com a presença ou ausência de SM, estão descritas na Tabela 2.

Foi verificado que os pacientes com SM eram mais velhos (57,0 vs 51,4 anos; p= 0,003), apresentavam dislipidemia (79 vs 41 pacientes; p= 0.0001), além de DM (74 vs 20 pacientes; p=0,0001) e HAS (79 versus 26 pacientes; p= 0,0001). Além disso, pacientes com SM tinham IMC mais elevado (32,5 vs 28,8; p< 0,0001).

Os pacientes com SM tinham maior prevalência de EHNA (90 vs 76 pacientes; p=0,030).

Laboratorialmente, pacientes portadores da SM cursaram com níveis mais altos de glicemia, insulina e HOMA (6,6 vs 3,9; p= 0,004).

Tabela 2 - Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes com DHGNA de acordo com a presença ou ausência de SM.

	Com SM	Sem SM	P
N	152	39	
Idade (anos)*	57.0 ± 9.2	51.4 ± 10.9	0.003
Sexo: H/M (%)	77 / 23	64 / 36	0.10
Dislipidemia (%)*	79	41	0.0001
Diabetes mellitus (%)*	74	20	0.0001
HAS (%)*	79	26	0.0001
EHNA*	90	76	0.03
IMC*	32.5 ± 5.2	28.8 ± 5.1	<0.0001
Glicemia (mg/ dL)*	123.3 ± 43.4	98.8 ± 17.3	0.0004
Insulina*	21.4 ± 16.2	14.8 ± 8.2	0.02
HOMA*	6.6 ± 5.6	3.9 ± 2.5	0.004
Colesterol Total (mg/dL)	197.6 ± 46.8	193.7 ± 38.3	0.83
LDL (mg/dL)	116.7 ± 40.4	115.6 ± 35.9	0.89
HDL (mg/dL)	47,5 ± 12.8	49.4 ± 17.4	0.68
Triglicerídeos (mg/dL)	181.5 ± 107.8	154 ± 66.8	0.11
ALT (U/L)	44.4 ± 47.0	47.8 ± 33.0	0.51
AST (U/L)	36.8 ± 31.8	34.6 ± 20.5	0.70
GGT (U/L)	83.9 ± 86.3	77.5 ± 90.0	0.11

AST: Aspartato Aminotransferase, ALT: Alanina Aminotransferase, GGT: Gama Glutamilttransferase, HDL: Lipoproteína de alta densidade, LDL: Lipoproteína de baixa densidade, IMC: índice de massa corpórea, HOMA: *Homeostasis model assessment*

Valores de referência: AST: homem (10 – 34 U/L), mulher (10 - 36 U/L); ALT: homem (10 - 44 U/L), mulher (10 - 36 U/L); GGT: homem (11 - 50 U/L), mulher (7 - 32 U/L)

p <0,05 foi considerado significativo.

Resultados expressos como média ± DP

5.3 Análise dos polimorfismos nos genes NOX4 e CYBA, de acordo com a presença de SM

As frequências genotípicas dos SNPs nos Genes da NOX4 e CYBA, são referendadas na Tabela 3, de acordo com a presença ou não da SM na população do estudo.

Nenhuma associação foi encontrada entre os SNPs e a presença ou não da SM quando a população estudada foi estratificada.

Tabela 3 - Frequências genótípicas dos polimorfismos do *CYBA* e Nox4 de acordo com a presença ou ausência de SM em pacientes com DHGNA.

	Sem SM	Com SM	OR (IC 95%)	P
*CYBA			2.04 (0.64 – 7.85)	0.26
TT	0.865	0.835		
TA	0.108	0.159		
AA	0.027	0.006		
MAF	0.081	0.085		
#NOX4			0.54 (0.20 – 1.48)	0.23
CC	0.639	0.699		
CA	0.333	0.273		
AA	0.028	0.028		
MAF	0.194	0.164		

*OR (odds ratio) para o alelo menor em um modelo dominante obtidos em análises de regressão logística ajustada por sexo, idade, DM2.

#OR (Odds ratio) para o alelo menor em um modelo dominante obtidos em análises de regressão logística ajustada por sexo, idade, diabetes mellitus tipo 2 e dislipidemia. $p < 0,025$ foi considerado significativo

MAF: menor frequência do alelo

5.4 Análise do polimorfismo no gene *CYBA*

Não houve diferença estatisticamente significativa na frequência dos genótipos do polimorfismo -675 T/A → A (TT vs TA + AA) do gene *CYBA*, entre a população com esteatose e a população com EHNA (Tabela 4).

Tabela 4 - Frequência genotípica do polimorfismo no gene *CYBA* de acordo com a presença ou ausência de EHNA.

	Esteatose	EHNA	OR (IC 95%)	P
*CYBA			3.42 (0.84 – 25.97)	0.14
TT	0.923	0.837		
TA	0.077	0.151		
AA	0.000	0.012		
MAF	0.038	0.087		

* OR (odds ratio) para o alelo menor em um modelo dominante obtido em análises de regressão logística ajustada por sexo, idade, diabetes mellitus tipo 2, hipertensão.

MAF: frequência do alelo raro

Quando se analisou as variáveis clínicas para o gene *CYBA*, uma associação com HDL foi observada: 48.05 ± 1.71 (TT) vs 41.70 ± 2.91 (TA) vs 28.03 ± 9.47 mg / dL (TT), média $\pm$ SEM, $p = 0.001$ (comparações HDL feitas por ANCOVA, em um modelo codominante ajustado para sexo, idade, DM, HAS, EHNA e CT). Quando a população é estratificada, a associação aparece apenas entre os pacientes que possuem esteatohepatite (Figura 8).

Figura 8 - Características laboratoriais de pacientes portadores de DHGNA, de acordo com o SNP no gene - 675 T/A *CYBA* e níveis de HDL. Resultados são média $\pm$ erro padrão da média.

Quando se analisou as variáveis clínicas para o gene *CYBA*, uma associação com TGL foi observada: $176,87 \pm 12,93$ (TT) vs $228,70 \pm 21,66$ (XA), média $\pm$ SEM, $p = 0,007$ (comparações de triglicerídeos feitas por ANCOVA, em um modelo dominante ajustado para sexo, idade, DM, HAS, EHNA e CT). Quando a população é estratificada, a associação aparece apenas entre os pacientes que possuem esteatohepatite (Figura 9).

Figura 9 - Características laboratoriais de pacientes com DHGNA, de acordo com o SNP no gene -675 T/A *CYBA* e níveis de TGL. Resultados são média $\pm$ erro padrão da média. ANCOVA ajustado para sexo, idade, DM, HAS, EHNA e CT.

5.5 Análise do polimorfismo no gene NOX4

Não houve diferença estatisticamente significativa na frequência do polimorfismo do gene NOX4 rs3017887 (CC vs CA + AA) entre a população com esteatose e a população com EHNA (Tabela 5).

Tabela 5 - Frequência genotípica do polimorfismo no gene NOX4 de acordo com a presença ou ausência de EHNA.

	Esteatose	EHNA	OR (IC 95%)	P
#NOX4			0.43 (0.17 – 1.03)	0.06
CC	0.593	0.707		
CA	0.333	0.269		
AA	0.074	0.024		
MAF	0.240	0.158		

OR (*odds ratio*) para o alelo menor em um modelo codominante obtidos em análises de regressão logística ajustada por sexo, idade, diabetes mellitus tipo 2, hipertensão arterial, dislipidemia e IMC.

p < 0,025 foi considerado significativo

MAF: frequência do alelo raro

A análise das características bioquímicas dos pacientes com DHGNA, de acordo com o genótipo também foi realizada e demonstrou uma associação dos genótipos dos SNPs NOX4 (rs3017887) com ALT (Figura 10). Não houve diferença estatisticamente significativa na frequência dos genótipos quando a população foi estratificada por EHNA. As variáveis de ajuste foram gênero, idade, DM, HDL e GGT.

Figura 10 - Características laboratoriais de pacientes, com DHGNA, de acordo com o SNP no NOX4 (rs 3017887) e níveis de ALT. Resultados são média $\pm$ erro padrão da média. p=0.02. ANOVA ajustado para idade, gênero, DM, HDL e GGT.

6 DISCUSSÃO

---

6 DISCUSSÃO

6.1 Polimorfismos

Inicialmente, a proposta do nosso trabalho foi a de buscar SNPs e genes que pudessem estar relacionados com a DHGNA e suas formas mais avançadas da doença. Os polimorfismos estudados foram escolhidos por estarem em genes que codificam proteínas oxidantes, o que os torna potenciais candidatos a participarem da susceptibilidade para o desenvolvimento de EHNA e suas complicações.

No presente estudo se observou ausência de associação nas frequências genóticas dos polimorfismos da NADPH NOX4 (CC vs CA+AA) e *CYBA* (TT vs TA+ AA) entre os pacientes com esteatose e EHNA, nos portadores de DHGNA. Isto pode ser explicado pois, diferentemente das doenças monogênicas, nas quais uma mutação relativamente rara em um único gene confere alto risco para o desenvolvimento da doença, a DHGNA muito provavelmente resulta de variantes alélicas comuns em um grande número de genes que interagem entre si, e que isoladamente determinam um risco modesto além de sofrerem influências diversas, tais como, metabólicas, hemodinâmicas e ambientais. Por essas razões, a identificação dos fatores de susceptibilidade para a DHGNA constitui-se em um desafio semelhante ao das demais doenças poligênicas¹¹⁵.

Por outro lado, um achado positivo do presente estudo foi a associação nominal do genótipo CA+ AA do NOX4 com níveis de ALT, que seria um marcador de atividade inflamatória. Importante ressaltar que não houve diferença estatisticamente significativa na frequência dos genótipos quando a população foi estratificada em esteatose e EHNA.

A associação do alelo A do gene NOX4 deve ser ocasionado pelo aumento da atividade necrótica no contexto de um maior EO.¹¹⁶ A enzima ALT elevada é considerada uma consequência dos danos causados ao hepatócito pela DHGNA. A RI, a produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias, o EO e a disfunção mitocondrial levam a danos ou destruição de hepatócitos. Embora o EO seja mais grave em

pacientes cirróticos, ele não é apenas um fenômeno de fase final, já que supostamente ocorre precocemente, quando os níveis das transaminases ainda estão elevados. Estes efeitos, por sua vez, podem explicar o fato de que os polimorfismos funcionais que modulam a inflamação e/ou o EO possam ser marcadores que são herdados em conjunto com outras variantes alélicas que predisõem ao EO e inflamação.

Song e colaboradores (2008), numa coorte de 903 mulheres coreanas com excesso de peso, verificaram que concentrações de ALT têm uma forte associação com acúmulo de gordura visceral, sendo o tecido adiposo visceral abdominal o principal preditor de elevação de ALT no contexto de DHGNA entre não-diabéticos.¹¹⁷ Sookoian e colaboradores (2012) relataram que as transaminases hepáticas não devem ser consideradas meros biomarcadores de danos no fígado, mas os pontos centrais na fisiopatologia da DHGNA em particular ou os componentes de SM em geral.¹¹⁸

Com relação a hereditariedade, Makkonen e colaboradores (2009), em estudo com gêmeos, confirmaram que níveis mais elevados de ALT eram um traço hereditário, com características genéticas que explicam até 60% da variabilidade.¹¹⁹

A participação da NOX4 na EHNA já foi demonstrada em modelos experimentais de DHGNA, por meio da sua ação profibrogênica, em HSCs.¹²¹⁻¹²² O NOX4, um homólogo de NOX não fagocítico, é expresso no fígado em hepatócitos, HSCs e células endoteliais. Jiang e colaboradores (2012) demonstraram que em ratos tratados com uma droga antifibrogênica (GKT137831), a qual levou a deleção de genes NOX1 e NOX4, inibiu múltiplos passos na patogênese da fibrose hepática.¹²³ Em nosso estudo o polimorfismo da NOX4 não demonstrou associação com fibrose hepática.

Nos hepatócitos, no entanto, o papel do NOX4 não é bem definido e apenas um estudo in vivo realizado, com uma casuística de 14 pacientes, demonstrou que os níveis de NOX4 eram mais elevados em pacientes com EHNA, quando comparados a pacientes sem DHGNA⁹⁶. Porém, a contribuição do gene NOX4 para a predisposição genética da EHNA, nunca foi explorada.

Com relação ao SNP - 675 T/A no gene *CYBA*, também analisado no presente estudo, não encontramos associação entre este polimorfismo e DHGNA. Sua implicação na fisiopatologia da DHGNA e as repercussões funcionais em hepatócitos foram pouco exploradas, contudo, um trabalho do nosso grupo, também demonstrou

ausência de associação do polimorfismo – 675 T/A no gene *CYBA* com a fibrose hepática em pacientes com VHC.¹²⁴

Este polimorfismo foi selecionado por ser sabidamente funcional, conforme demonstraram Moreno e colaboradores (2007) em um estudo com pacientes hipertensos.⁸⁷ Além disso, o SNP – 675 T/A foi avaliado em um estudo de pacientes com *Diabetes Mellitus* tipo 1 e demonstrou que a presença de pelo menos um alelo A no polimorfismo -675 T/A no gene *CYBA* confere proteção contra nefropatia diabética.⁷¹

No presente estudo, uma associação do SNP no gene *CYBA*, com altos níveis de TGL e baixos de HDL, foi observada entre os pacientes com EHNA.

Este perfil de dislipidemia é o mais comumente encontrado na DHGNA. A patogênese da dislipidemia em DHGNA não é bem compreendida e, provavelmente, está relacionada à superprodução hepática das partículas de VLDL além da liberação desregulada de lipoproteínas da circulação. A relação entre dislipidemia e desfecho desfavorável é inquestionável e independente de outros fatores de confusão.¹²⁵⁻¹²⁶

Um aspecto que torna complexa a avaliação da dislipidemia como fator de risco para EHNA, é que esta condição tanto pode influenciar no desenvolvimento e progressão da EHNA como podem ocorrer secundariamente a ela.

Diversos outros polimorfismos ligados ao EO e DHGNA já foram estudados, entre eles, superóxido dismutase de manganês (MnSOD), uma proteína mitocondrial codificada pela produção de EROS; o citocromo P4502E1, uma monoxigenase endoplasmática e a sobrecarga de ferro, pois este é um agente pró-oxidante notável e atua gerando radicais de hidroxilo.¹²⁷

Por se tratar de uma doença poligênica existe dificuldade de se correlacionar fatores genéticos à evolução da doença, embora se saiba que os mesmos são importantes quando associados a fatores ambientais. Entretanto, recentemente, com os estudos dos GWAS, dois genes foram associados à DHGNA: o PNPLA3 e o TM6SF2; sendo o primeiro reproduzido como marcador da presença da esteatose, fibrose mais avançada e risco para CHC.¹²⁸ Nosso grupo demonstrou uma associação entre o gene PNPLA3 e graus de fibrose em uma população de 213 pacientes com DHGNA.¹²⁹ Apesar da maioria dos estudos confirmar esta associação, os resultados são ainda controversos.¹³⁰ Considerando que os GWAS são caros, exigem milhares de

indivíduos e conhecimentos estatísticos e de genética populacional fortes, o uso de estudos de genes candidatos em DHGNA se tornam mais diretos e fáceis de implementar.¹³¹

Com relação a genotipagem, selecionou-se a técnica de *TaqMan*® *SNP Genotyping Assays*. Esta metodologia foi a escolhida, apesar do método RFLP (Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição) ainda ser utilizado (*Applied Biosystems, Foster City, EUA*), em PCR em tempo real. A metodologia Taqman garante maior precisão e eficiência que a técnica descrita acima, com obtenção de resultados num período de tempo consideravelmente curto. É menos trabalhosa, por eliminar etapas de manipulação de amostras amplificadas. Amplifica segmentos do gene muito menores que os exigidos por RFLP, o que possibilitou a genotipagem de amostras antigas e parcialmente degradadas. Os protocolos requerem menor quantidade de DNA. E a metodologia permite a paralelização de reações, por meio dos ensaios multiplex, em equipamentos de PCR em tempo real com mais de dois filtros.¹³²

Importante lembrar que os SNPs sofrem influência de fatores moleculares, como a presença de outros polimorfismos funcionais não identificados, que acentuam ou neutralizam o efeito da variante, o que justificaria os achados diferentes em termos de mecanismo de ação e em função na expressão gênico/protéica, além da interferência de fatores ambientais e da composição étnica da população, demonstrado nos resultados dos estudos em diferentes populações.

Devido à complexidade e limitação da pesquisa de polimorfismo genético em DHGNA, a maioria dos estudos encontra-se com a ausência de poder estatístico, replicação em várias coortes e a presença de heterogeneidades nos estágios da doença. Isso faz com que a pesquisa sobre os polimorfismos na DHGNA seja preenchida com desconhecidos e desafios.

6.2 Achados clínicos

A DHGNA é uma doença com prevalência considerável. Nos países industrializados, a DHGNA é considerada a causa mais comum de doença hepática crônica, sendo que sua prevalência na população adulta varia de 20 a 30%.¹³³

Em nossa casuística, do total de 207 pacientes incluídos na avaliação, 180 (86,9%) apresentavam EHNA e a frequência da SM foi significativamente maior em pacientes com EHNA (82,4% vs 62,5%; $p=0,03$).

Estudos demonstram associação entre fibrose hepática e SM, na DHGNA e descrevem os componentes da SM como fatores de risco independentes para a fibrose hepática¹³⁴⁻¹³⁵. No entanto, uma visão abrangente de mecanismos moleculares de ligação entre obesidade, DM e CHC associado a DHGNA, bem como sequência exata de eventos moleculares, ainda não é totalmente compreendido. A RI tem um importante papel na fibrogênese hepática pois a hiperinsulinemia pode estimular diretamente HSCs a produzir e a secretar matriz extracelular e, posteriormente, níveis elevados de glicose e insulina ativam o fator de crescimento do tecido conjuntivo, estimulando a fibrogênese hepática¹³⁶.

Além disso, a associação entre DHGNA e fatores metabólicos tem sido reconhecida como uma via de mão dupla. Se, por um lado, a DHGNA é capaz de induzir a RI e DM, por outro lado fatores metabólicos como a RI podem modular o curso clínico da DHGNA, aumentando assim a predisposição para fibrose hepática e CHC.¹³⁷ De acordo com estas observações, a SM foi significativamente mais frequente em pacientes com EHNA em nosso estudo.

O risco de desenvolver SM por uma mutação no gene codificador de uma proteína da família da NADPH oxidase é plausível, pois este sistema pró-oxidante é a principal fonte produtora de EROS nessa condição metabólica.¹³⁸

Jermendy e colaboradores (2011) demonstraram um papel de fatores genéticos na patogênese da DHGNA associados a alterações típicas da RI.¹³⁹

É importante ressaltar que nenhuma associação foi encontrada entre NOX4 rs3017887 e CYBA e qualquer componente da SM isoladamente, talvez porque o SNP exerce um efeito pleiotrópico fraco em cada componente da SM, que só fica evidente quando todos os componentes são considerados juntos. E também é possível que estes SNPs, em vez de ser o causador, seja apenas um marcador de outra variante funcional em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo.

Os resultados do presente estudo devem ser analisados com base nas limitações impostas pelo pequeno número da amostra em um estudo transversal, assim como o

baixo poder da estatística. Além disso, não foi utilizado um grupo controle de indivíduos sem DHGNA.

Em nossa revisão da literatura, este é o primeiro trabalho, que avalia a associação entre diferentes polimorfismos no gene da NADPH com parâmetros metabólicos entre os pacientes brasileiros com DHGNA.

A descoberta de marcadores de susceptibilidade permitiria a identificação dos pacientes em risco após o diagnóstico de DHGNA e não após o estabelecimento da EHNA, quando já existe o dano histológico e embasaria a adoção de medidas voltadas para a prevenção primária da DHGNA. Ainda, a descoberta de novos genes de susceptibilidade poderia contribuir para o melhor entendimento da fisiopatologia dessa complicação crônica e resultar no desenvolvimento de novas terapias.

7 CONCLUSÃO

---

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, na população com DHGNA, observou-se que:

- 1) Existe associação de risco entre a presença do alelo C no polimorfismo do gene NOX4 com uma maior concentração de ALT na população com DHGNA;
- 2) Existe associação de risco entre a presença do alelo A no polimorfismo do gene -675 T/A *CYBA* com uma maior concentração de TGL e menor de HDL, nos pacientes com EHNA;
- 3) Houve associação entre a presença de síndrome metabólica e graus avançados de fibrose hepática em portadores de DHGNA;
- 4) Não houve associação dos SNPs nos genes *CYBA* (não registrado) e NOX4 (rs 3017887) que codificam proteínas do sistema NADPH oxidase, e a presença de EHNA, nos pacientes com DHGNA.

8 ANEXOS

8.1 Anexo A - Ficha individual de coleta de dados

IDENTIFICAÇÃO

NOME: _____ REGISTRO _____

DATA DE NASCIMENTO. _____ SEXO ☐ M ☐ F COR ☐ B ☐ P ☐ M ☐ O

HISTÓRIA CLÍNICA

DIAGNÓSTICO ☐ critérios clínicos ☐ Por biópsia – (Data: _____)

Número da biópsia _____

CHILD-PUGH ☐ A ☐ B ☐ C Escore: _____

CONSUMO DE ÁLCOOL

Tipo de bebida _____

Quantidade/dia _____ Nos casos positivos ☐ atual ☐ passado

Abstinência alcoólica desde _____ TABAGISMO ☐ sim ☐ atual ☐ passado ☐

não. Nos casos positivos, quantidade/dia _____ Uso de drogas injetáveis: ☐

sim ☐ não. Nos casos positivos ☐ atual ☐ passado

TABAGISMO ☐ sim ☐ não

MACONHA: ☐ sim ☐ não. Nos casos positivos ☐ atual ☐ passado ☐ diário ☐ esporádico

USO DE DROGAS INJETÁVEIS ☐ sim ☐ não

DOENÇAS ASSOCIADAS: _____

CIRURGIAS: _____

HIPERTENSÃO ARTERIAL ☐ sim ☐ não

DIABETES MELITO ☐ sim ☐ não

DISLIPIDEMIA ☐ sim ☐ não

CARCINOMA HEPATOCELULAR ☐ sim ☐ não

História Familiar de DM: ( ) sim ( ) não

Mãe ( ) Irmão ( ) Tio ( ) Avós ( )

MEDICAÇÕES EM USO:

EXAME FÍSICO:

PESO: _____ ALTURA: _____ IMC: _____

CIRCUNF ABD: _____ ÍNDICE CINTURA QUADRIL: _____

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FÍSICA - anexar ficha do protocolo de reabilitação

LABORATÓRIO CONVENCIONAL –

Hb _____ Leucócitos _____ Plaquetas _____

Creat _____ Uréia _____ Proteína Total _____ Albumina _____

AP _____ RNI _____

FATOR ANTINUCLEAR _____ ANTIMUSCULO LISO _____ ANTIMITOCONDRIA

_____ IgG _____ FERRITINA _____ SATURAÇÃO DA TRANSFERRINA _____

HbsAG _____ AntiHBc _____ HBeAg _____ AntiHBe _____ HIV _____

AntiHCV _____

GLICEMIA DE JEJUM 1 _____; GLICEMIA DE JEJUM 2 _____

TESTE ORAL DE TOLERANCIA A GLICOSE _____; _____

INSULINA: _____ HOMA-IR _____ COLESTEROL _____ HDL-COLESTEROL _____

TRIGLICERÍDIOS _____ LDL _____

EXAMES DE IMAGEM:

Data

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 AP1

BAIRRO: ..... CIDA

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....

2. RESPONSÁVEL ..... LEG

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador e

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : .....SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....

ENDEREÇO: ..... Nº ..... AP'

BAIRRO: ..... CIDAI

CEP: ..... TELEFONE: D

(.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO: Influência dos Polimorfismos nos Genes CYBA da NADPH Oxidase p22phox e NOX4 na Fibrose Hepática e sua relação com Síndrome Metabólica e Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA)

PESQUISADOR : .PROF. DRA. Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira

CARGO/FUNÇÃO: .PROF. LIVRE DOCENTE DO DEPARTAMENTO DE GASTROENTEROLOGIA

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº .CRM 75499.

UNIDADE DO HCFMUSP: DEPARTAMENTO DE GASTROENTEROLOGIA.

Rubrica do sujeito de
pesquisa ou
responsável_____

Rubrica do
pesquisador_____

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

Convidamos o (a) senhor (a) para participar voluntariamente de projeto de pesquisa com objetivo de identificar que fatores clínicos e laboratoriais podem influenciar na Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (Gordura no seu fígado “fígado gorduroso”). Para tal serão avaliados exames de sangue de pacientes com “fígado gorduroso”, assim como tecido hepático obtido durante a biópsia hepática já realizada e no acompanhamento do paciente. Espera-se encontrar resultados que possibilitem prever fatores desencadeantes ou relacionados nos pacientes e a progressão da doença hepática, e, assim, permitir sua prevenção e tratamento adequados. Algumas características genéticas podem estar relacionadas com o “fígado gorduroso” e sua evolução, assim como fatores do metabolismo parecem importantes para a sua evolução, então este estudo também irá avaliar a frequência de manifestações metabólicas, como diabetes melito e resistência insulínica.

PROCEDIMENTOS

A rotina de atendimento no Ambulatório de continuará a mesma, através de consultas médicas e exames feitos como habitual para acompanhamento e tratamento. Estes procedimentos de rotina incluem exames de sangue, através de punção periférica de veia do antebraço, e biópsia de fígado já realizada previamente. Pedimos a permissão para utilização dessas informações no estudo em questão, através do armazenamento dos resultados dos exames, porém mantendo em sigilo a identificação do paciente. Além dos exames habituais, outros exames de caráter experimental serão solicitados. Para tal será necessária coleta de sangue por punção periférica de veia do antebraço, que será congelado para dosagem de algumas citocinas (substâncias produzidas em nosso organismo, e que regulam a inflamação) e avaliação de alterações genéticas que podem estar associadas com a progressão do “fígado gorduroso”.

DESCONFORTOS E RISCOS

A punção de veia periférica apresenta pequeno desconforto, e alguns riscos, como sangramento, hematoma, equimose, e dor local. As biópsias de fígado são procedimentos realizados sem necessidade de internação, sob anestesia local, e controle ecográfico. A biópsia pode provocar dor ou desconforto no local da punção, ou ainda no ombro. Há alguns riscos, como sangramento ou derramamento de bile dentro do fígado ou da cavidade peritoneal (dentro do abdome), porém estes eventos costumam ser bastante raros. Ainda mais rara é a necessidade de cirurgia para controle destas complicações. Pode ocorrer óbito por biópsia hepática, mas isto é extremamente raro.

A biópsia hepática é feita na rotina de seu acompanhamento, e não será feita exclusivamente para este estudo.

BENEFÍCIOS

A avaliação dos fatores associados à má-evolução da Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica poderá trazer informações importantes no que se refere ao prognóstico da sua doença, e auxiliar em uma estratégia de tratamento futuro. O diagnóstico de alterações metabólicas como resistência à insulina, síndrome metabólica ou diabetes mellitus, pode antecipar o seu tratamento, e ter impacto no controle da sua doença do fígado. Não haverá nenhum custo extra para o(a) senhor(a) pela sua participação nessa pesquisa. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se houver qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

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 Prof. Dra. Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira, que pode ser encontrada no endereço no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, telefone (s) 2661-7830. Se o senhor (a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contado 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@hcnnet.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 “Influência dos Polimorfismos nos Genes *CYBA* da NADPH Oxidase p22phox e NOX4 na Fibrose Hepática e sua relação com Síndrome Metabólica e Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA)”, 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, bem como 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 o Doutor (ra) _____ 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 garantias 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, analfabetos, semianalfabetos 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.

São Paulo, ____ de _____ de 201__.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____

9 REFERÊNCIAS

---

9 REFERÊNCIAS

1. Brunt EM. Histopathology of non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis.* 2009;13:533–44.
2. Burt AD, Lackner C, Tiniakos DG. Diagnosis and assessment of NAFLD: definitions and histopathological classification. *Semin Liver Dis.* 2015;35(3):207–20.
3. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, *et al.* The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Am J Gastroenterol.* 2012;107(6):811–26.
4. Singh S, Allen AM, Wang Z, Prokop LJ, Murad MH, Loomba R. Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver vs. nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2015;13(4):643–54.
5. Chitturi S, Wong VW. Nonalcoholic fatty liver in Asia: Firmly entrenched and rapidly gaining ground. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011;26(1):163–72.
6. Lazo MR, Hernaez MS, Eberhardt, Bonekamp S, Kamel I, Guallar E, *et al.* Prevalence of nonalcoholic Fatty liver disease in the United States: the third national health and nutrition examination survey, 1988-1994. *Am J Epidemiol.* 2013;178(1):38–45.
7. Sayiner M, Koenig A, Henry L, Younossi ZM. Epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis in the United States and the rest of the world. *Clin Liver Dis.* 2016 May;20(2):205-14.
8. Karnikowski M, Cordova C, Oliveira RJ, Karnikowski MGO, Nóbrea OT. Non-alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome in Brazilian middle-aged and older adults. *Sao Paulo Med J.* 2007;125(6):333-7.
9. Cotrim HP, Parise ER, Oliveira CP, Leite N, Martinelli A, Galizzi J, *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease in Brazil: clinical and histological profile. *Ann Hepatol.* 2011;10(1):33-7.
10. Kalia SH, Gaglio PJ. The prevalence and pathobiology of nonalcoholic fatty liver disease on patients of different races or ethnicities. *Clin Liver Dis.* 2016;20:215-24.

11. Kohli R, Sunduram S, Mouzaki M, Ali S, Sathya P, Abrams S, *et al.* Pediatric nonalcoholic fatty liver disease: a report from the Expert Committee on Nonalcoholic Fatty Liver Disease (ECON). *J Pediatr.* 2016;172:9-13.
12. Berlot LC, Adams LA. The natural course of non-alcoholic fatty liver disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2016;17(5):774-85.
13. International Diabetes Federation (IDF) (Executive summary or 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.
14. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Castiglione A, Crocè LS, Tiribelli C, *et al.* Incidence and natural course of fatty liver in the general population: the dionysos study. *Hepatology.* 2007;46(5):1387-91.
15. Pagadala MR, McCullough AJ. McCullough non-alcoholic fatty liver disease and obesity: not all about body mass index. *Am J Gastroenterol.* 2012;107(12):1859-61.
16. Ogden CL, Carroll MD, Flegal KM. Prevalence of obesity in the United States. *JAMA.* 2014;312(2):189-90.
17. NCD-RisC. Trends in adult body mass index in 200 countries from 1975 to 2014. *Lancet.* 2016;387(10026):1377-96.
18. Fargion S, Porzio M, Fracanzani AL. Nonalcoholic fatty liver disease and vascular disease: State-of-the-art. *World J Gastroenterol.* 2014;20(37):13306-24.
19. Younossi ZM, Stepanova M, Rafiq N, Makhlof H, Younoszai Z, Agrawal R, *et al.* Pathologic criteria for nonalcoholic steatohepatitis: Interprotocol agreement and ability to predict liver-related mortality. *Hepatology.* 2011;53(6):1874–82.
20. Angulo P, Kleiner DE, Dam-Larsen S, Adams L, Bjornsson ES, Charatcharoenwitthaya P, *et al.* Liver fibrosis, but no other histologic features, is associated with long-term outcomes of patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* 2015;149(2):389–97.
21. Ekstedt M, Hagstrom H, Nasr P, Fredrikson M, Kechagias S, Kechagias S, *et al.* Fibrosis stage is the strongest predictor for disease- specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatology.* 2015;61(5):1547-54.
22. Caldwell SH, Oelsner DH, Iezzoni JC, Hespenheide EE, Battle EH, Driscoll CJ. Cryptogenic cirrhosis: clinical characterization and risk factors for underlying disease. *Hepatology.* 1999;29(3):664–9.
23. Bugianesi E, Leone N, Vanni E, Marchesini G, Brunello F, Carucci P, *et al.* Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2002;123(1):134-140.

24. Wree A, Broderick L, Canbay A, Hoffman HM, Feldstein AE. From NAFLD to NASH to cirrhosis-new insights into disease mechanisms. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10(11):627–36.
25. Loomba R, Schork N, Chen CH, Bettencourt R, Bhatt A, Ang B, *et al*. Heritability of hepatic fibrosis and steatosis based on a prospective twin study. *Gastroenterology*. 2015;149(7):1784–93.
26. Duwaerts C, Maher JJ. Mechanisms of liver injury in non-alcoholic steatohepatitis. *Curr Hepatol Rep*. 2014;13(2):119-29.
27. Hardy T, Oakley F, Anstee Q. Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and disease spectrum. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2016;11:451-96.
28. Samuel VT, Petersen KF, Shulman GI. Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet*. 2010;375(9733):2267–77.
29. Day C. From fat to inflammation. *Gastroenterology*. 2006;130(1):207-10.
30. Cusi K. Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications. *Gastroenterology*. 2012;142(4):711-25.
31. Neuschwander-Tetri BA. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of non triglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology*. 2010;52(2):774-80.
32. Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Investig*. 2007;117(3):539-48.
33. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*. 2010;52(5):1836–46.
34. Yu J, Marsh S, Hu J, Feng W, Wu C. The pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease: interplay between diet, gut microbiota, and genetic background. *Gastroenterol Res Pract*. 2016; 2862173.
35. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Investig*. 2005;115(5):1343–51
36. George J, Liddle C. Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and potential for nuclear receptors as therapeutic targets. *Mol Pharm*. 2008;5(1):49–59.
37. Nassir F, Ibdah JA. Role of mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci*. 2014;15(5):8713-42.

38. Ress C, Kaser S. Mechanisms of intrahepatic triglyceride accumulation. *World J Gastroenterol*. 2016;22(4):1664-73.
39. Nagle CA, Klett EL, Coleman RA. Hepatic triacylglycerol accumulation and insulin resistance. *J Lipid Res*. 2009 Apr;50(Suppl S):74-9.
40. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*. 1998;114(4):842-5.
41. George J, Pera N, Phung N, Leclercq I, Yun Hou J, Farrell G. Lipid peroxidation, stellate cellactivation and hepatic fibrogenesis in a rat model of chronic steatohepatitis. *J Hepatol*. 2003;39(5):756-64.
42. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, *et al*. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology*. 2001;120(5):1183-92.
43. Todd DJ, Lee AH, Glimcher LH. The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(9):663-74.
44. Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in asolid organ. *J Clin Investig*. 2007;117(3):539-48.
45. Feldstein AE. Novel insights into the pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis*. 2010;30:391-401.
46. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*. 2016;65(8):1038-48.
47. Caldwell S. S3-4 - NASH (Nonalcoholic steatohepatitis): A case of multiorganelle failure. *Free Rad Biol Med*. 2014;75(1):S6.
48. Kirpich IA, Marsano LS, McClain CJ. Gut-liver axis, nutrition, and non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Biochem*. 2015;48(13-14):923-30.
49. Yilmaz Y. Review article: is non-alcoholic fatty liver disease a spectrum, or are steatosis and non-alcoholic steatohepatitis distinct conditions? *Aliment Pharmacol Ther*. 2012;36(9):815–23.
50. Parker HM, Johnson NA, Burdon CA, Cohn JS, O'Connor HT, George J. Omega-3supplementation and non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol*. 2012;56(4):944–51.
51. Quigley EM, Monsour HP. The gut microbiota and nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis*. 2015;35(3):262–9.
52. Oliveira CP, Stefano JT. Genetic polymorphisms and oxidative stress in non-alcoholic steatohepatitis (NASH): a mini review. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2015;39(Supl 1):S35-S40.

53. Hirschhorn JN, Gajdos ZK. Genome-wide association studies: results from the first few years and potential implications for clinical medicine. *Annu Rev Med.* 2011;62:11-24.
54. Sookoian S, Pirola CJ. Genetic predisposition in nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Mol Hepatol.* 2017;23(1):1-12.
55. Willner IR, Waters B, Patil SR, Reuben A, Morelli J, Riely CA. Ninety patients with nonalcoholic steatohepatitis: insulin resistance, familial tendency, and severity of disease. *Am J Gastroenterol.* 2001;96(10):2957-61.
56. Loomba R, Schork N, Chen CH, Bettencourt R, Bhatt A, Ang B, *et al.* Heritability of hepatic fibrosis and steatosis based on a prospective twin study. *Gastroenterology.* 2015;149(7):1784-93.
57. Schwimmer JB, Celedon MA, Lavine JE, Salem R, Campbell N, Schork NJ, *et al.* Heritability of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* 2009;136(5):1585-92.
58. Browning JD, Kumar KS, Saboorian MH, Thiele DL. Ethnic differences in the prevalence of cryptogenic cirrhosis. *Am J Gastroenterol.* 2004;99(2):292-8.
59. Bambha K, Belt P, Abraham M, Wilson LA, Pabst M, Ferrell L, *et al.* Ethnicity and nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2012;55(3):769-80.
60. Victor RG. The Dallas Heart Study: a population-based probability sample for the multidisciplinary study of ethnic differences in cardiovascular health. *Am J Cardiol.* 2004;93(12):1473-80.
61. Guerrero R, Vega GL, Grundy SM, Browning JD. Ethnic differences in hepatic steatosis: an insulin resistance paradox? *Hepatology.* 2009;49(3):791-801.
62. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, *et al.* Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Genet.* 2008;40(12):1461-5.
63. Cavalcante LN, Stefano JT, Machado MV, Mazo DF, Rabelo F, Sandes KA, *et al.* Genetic ancestry analysis in non-alcoholic fatty liver disease patients from Brazil and Portugal. *World J Hepatol.* 2015;7(10):1433-8.
64. Altshuler D, Daly MJ, Lander ES. Genetic mapping in human disease. *Science.* 2008;322(5903):881-8.
65. Cardon LR, Bell JL. Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet.* 2001;2(2):91-9.
66. Hardy J, Singleton A. Genome wide association studies and human disease. *N Engl J Med.* 2009;360(17):1759-68.

67. Anstee QM, Day CP. The genetics of NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10(11):645-55.
68. Mehta R, Birerdinc A, Younossi ZM. Host Genetic variants in obesity-related nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis*. 2014;18(1):249-67.
69. Anstee QM, Seth D, Day CP. Genetic factors that affect risk of alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2016;150(8):1728-44.
70. Sookoian S, Pirola CJ. Meta-analysis of the influence of I 148M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 genes (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2011;53(6):1883-94.
71. Giannella MLCC. *Polimorfismo de um único nucleotídeo na região promotora dos genes GCLC, CYBB e CYBA estão associados à diminuição da taxa de filtração glomerular em pacientes diabéticos tipo 1*. Tese de Livre Docência – São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 2011.
72. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2007;87(1):245-313.
73. Baehner RL, Gilman N, Karnovsky ML. Respiration and glucose oxidation in human and guinea pig leukocytes comparative studies. *J Clin Invest*. 1970;49(4):692-700.
74. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxyge. *Nature*. 2004;4(3):181-9.
75. Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood*. 1999;93(5):1464-76.
76. Bánfi B, Clark RA, Steger K, Krause KH. Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. *J Biol Chem*. 2003;278(6):3510-3.
77. Geiszt M, Kopp JB, Várnai P, Leto TL. Identification of renox, NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(14):8010-4.
78. Garrido AM, Griendling KK. NADPH oxidases and angiotensin IIreceptor signaling. *Mol Cell Endocrinol*. 2009;302(2):148-58.
79. Paik YH, Brenner DA. NADPH oxidase mediated oxidative stress in hepatic fibrogenesis. *Korean J Hepatol*. 2011;17(4):251-7.
80. De Minicis S, Bataller R, Brenner DA. NADPH oxidase in the liver: defensive, offensive, or fibrogenic? *Gastroenterology*. 2006;131(1):272-5.
81. Newsholme P, Morgan D, Rebelato E, Oliveira-Emilio HC, Procopio J, Curi R, et al. Insights into the critical role of NADPH oxidase(s) in the normal and dysregulated pancreatic beta cell. *Diabetologia*. 2009;52(12):2489-98.

82. Paik YH, Iwaisako K, Seki E, Inokuchi S, Schnabl B, Osterreicher CH, *et al.* The nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NOX) homologues NOX1 and NOX2/gp91(phox) mediate hepatic fibrosis in mice. *Hepatology*. 2011;53(5):1730-41.
83. Bedard K, Attar H, Bonnefont J, Jaquet V, Borel C, Plastre O, ET AL. Three common polymorphisms in the CYBA gene form a haplotype associated with decreased ROS generation. *Hum Mutat*. 2009;30(7):1123-33.
84. San José G, Fortuño A, Belouqui O, Díez J, Zalba G. NADPH oxidase CYBA polymorphisms, oxidative stress and cardiovascular diseases. *Clin Sci (Lond)*. 2008;114(3):173-82.
85. Hodgkinson AD, Millward BA, Demaine AG. Association of the p22phox component of NAD(P)H oxidase with susceptibility to diabetic nephropathy in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2003;26(11):3111-5.
86. Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, ET AL. Functional effect of the C242T polymorphism in the NAD(P)H oxidase p22phox gene on vascular superoxide production in atherosclerosis. *Circulation*. 2000;102(15):1744-7.
87. Moreno MU, San José G, Fortuño A, Belouqui O, Redón J, Chaves FJ, *et al.* A novel CYBA variant, the -675A/T polymorphism, is associated with essential hypertension. *J Hypertens*. 2007;25(8):1620-6.
88. Siqueira ER, Pereira LB, Stefano JT, Patente T, Oliveira CP, Vasconcelos RAS, *et al.* Association of a variant in the regulatory region of NADPH oxidase 4 genes and metabolic syndrome in patients with chronic hepatitis C. *Eur J Med Res*. 2015;28(1):45.
89. Koek GH, Liedorp PR, Bast A. The role of oxidative stress in non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Chim Acta*. 2011;412(15-16):1297-305
90. Liang S, Kisseleva T, Brenner DA The role of NADPH oxidase (NOXs) in liver fibrosis and the activation of myofibroblasts. *Frontiers Physiol*. 2016;7(17):1-10.
91. Guichard C, Moreau R, Pessayre D, Epperson TK, Krause KH. NOX family NADPH oxidases in liver and in pancreatic islets: a role on the metabolic syndrome and diabetes? *Biochem Soc Trans*. 2008;36(Pt 5):920-29.
92. De Minicis S, Seki E, Paik YH, Osterreicher CH, Kodama A, Kluwe J, *et al.* Role and cellular source of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in hepatic fibrosis. *Hepatology*. 2010;52(4):1420–30.
93. Reinehr R, Becker, S, Eberle, A, Grether-Beck S, Haussinger D. Involvement of NADPH oxidase isoforms and Src family kinases in CD95-dependent hepatocyte apoptosis. *J Biol Chem*. 2005;280:27179–94.

94. Paik YH, Kim J, Aoyama T, De Minicis S, Bataller R, Brenner DA. Role of NADPH oxidase in liver fibrosis. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(17):2854-72.
95. Aoyama T, Paik Y, Watanabe S, Laleu B, Gaggini F, Fioraso-Cartier L, *et al*. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NOX) in experimental liver fibrosis: GKT137831 as a novel potential therapeutic agent. *Hepatology*. 2012;56(6):2316-27.
96. Bettaieb A, Jiang JX, Sasaki Y, Chao TI, Kiss Z, Chen X, *et al*. Hepatocyte nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduce oxidase 4 regulates stress signalin, fibrosis and insulin sensitivity during development of steatohepatitis in mice. *Gastroenterology*. 2015;149(2):468-80.
97. Adachi T, Togashi H, Suzuki A, Kasai S, Ito J, Sugahara K, *et al*. NAD(P)H oxidase plays a crucial role in PDGF-induced proliferation of hepatic stellate cells. *Hepatology*. 2005;41(6):1272-81.
98. Sugimoto R, Enjoji M, Kohjima M, Tsuruta S, Fukushima M, Iwao M, *et al*. High glucose stimulates hepatic stellate cells to proliferate and to produce collagen through free radical production and activation of mitogen-activated protein kinase. *Liver Int*. 2005;25(5):1018-26.
99. Carmiel-Haggai M, Cederbaum AI, Nieto N. A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. *FASEB Journal*. 2005;19(1):136-8.
100. Chatterjee S, Ganini D, Tokar EJ, Kumar A, Das S, Corbett J, *et al*. Leptin is key to peroxynitrite-mediated oxidative stress and Kupffer cell activation in experimental non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*. 2013;58(4):778-84.
101. Jiang JX, Mikami K, Shah VH, Torok NJ. Leptin induces phagocytosis of apoptotic bodies by hepatic stellate cells via a Rho guanosine triphosphatase-dependent mechanism. *Hepatology*. 2008;48(5):1497-505.
102. de Minicis S, Seki E, Oesterreicher C, Schnabl B, Schwabe RF, Brenner DA. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase mediates fibrotic and inflammatory effects of leptin on hepatic stellate cells. *Hepatology*. 2008;48(6):2016-26.
103. Liu Q, Li H, Wang N, Chen H, Jin Q, Zhang R, *et al*. Polymorphism of rs1836882 in NOX4 gene modifies associations between dietary caloric intake and ROS levels in peripheral blood mononuclear cells. *PLoS ONE*. 2013;8(12):ID e85660.
104. Jian JX, Torok NJ. NADPH oxidases in chronic liver diseases. *Adv Hepatol*. 2014;30:1-13.
105. Friedman SL. Pathogenesis of hepatic fibrosis. In: Post TW (Ed); Waltham MA. *UpToDate*. (Accessed on March 23, 2016)

106. Noureddin M, Anstee QM, Loomba R. Review article: emerging anti-fibrotic therapies in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2016;43(11):1109-23.
107. Marra F, Aleffi S, Bertolani C, Petrai I, Vizzutti F. Review article: the pathogenesis of fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005;22(Suppl. 2):44–7.
108. Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology.* 2008;134(6):1655-69.
109. De Lima VM, Oliveira CP, Alves VA, Chammas MC, Oliveira EP, Stefano JT, *et al.* A rodent model of NASH with cirrhosis, oval cell proliferation and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 49(6):1055-61.
110. Mazo DF, de Oliveira MG, Pereira IV, Cogliati B, Stefano JT, Gabriela FP, *et al.* S-nitroso-N-acetylcysteine attenuates liver fibrosis in experimental nonalcoholic steatohepatitis. *Drug Des Devel Ther.* 2013;7:553-63.
111. Bataller R, Schwabe RF, Choi YH, Yang L, Paik YH, Lindquist J, *et al.* NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J Clin Invest.* 2003;112(9):1383–94.
112. Zhan SS, Jiang JX, Wu J, Halsted C, Friedman SL, Zern MA, *et al.* Phagocytosis of apoptotic bodies by hepatic stellate cells induces NADPH oxidase and is associated with liver fibrosis in vivo. *Hepatology.* 2006;43(3):435-43.
113. Kleiner DE, Brunt EM, Natta MV, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, *et al.* Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2005;41(6):1313-21.
114. Team RCR. *A language and environment for statistical computing.* R Development Core Team published. 2013.
115. Thomas DT. *Statistical methods in genetic epidemiology.* 1st ed. New York, USA: Oxford University Press; 2004.
116. Tariq Z, Green CJ, Hodson L. Are oxidative stress mechanisms the common denominator in the progression from hepatic steatosis towards non-alcoholic steatohepatitis (NASH)? *Liver Int.* 2014;34(7):e180-e90.
117. Song HR, Yun KE, Park HS. Relation between alanine aminotransferase concentrations and visceral fat accumulation among nondiabetic overweight Korean women. *Am J Clin Nutr.* 2008;88(1):16-21.
118. Sookoian S, Pirola CJ. Liver enzymes, metabolomics and genome-wide association studies: from systems biology to the personalized medicine. *World J Gastroenterol.* 2015;21(3):711-25.

119. Makkonen J, Pietilainen KH, Rissanen A, Kaprio J, Yki-Jarvinen H. Genetic factors contribute to variation in serum alanine aminotransferase activity independent of obesity and alcohol: a study in monozygotic and dizygotic twins. *J Hepatol*. 2009;50(5):1035-42.
120. Han CY. Roles of reactive oxygen species on insulin resistance in adipose tissue. *Diabetes Metab J*. 2016;40(4):272-9.
121. Lan T, Kisselev T, Brenner DA. Deficiency of NOX1 or NOX4 prevents liver inflammation and fibrosis in mice through inhibition of hepatic stellate cell activation. *PLoS One*. 2015;10(7):e0129743.
122. Sancho P, Mainez J, Crosas-Molist E, Roncero C, Fernández-Rodríguez CM, *et al*. NADPH oxidase NOX4 mediates stellate cell activation and hepatocyte cell death during liver fibrosis development. *PLoS One*. 2012;7(9):e45285.
123. Jiang JX, Chen X, Serizawa N, Szyndralewicz C, Page P, Schröder K, *et al*. Liver fibrosis and hepatocyte apoptosis are attenuated by GKT137831, a novel NOX4/NOX1 inhibitor in vivo. *Free Radic Biol Med*. 2012;53(2):289-96.
124. Pereira LB. *Influence of polymorphisms of the NADPH oxidase 4 gene in liver fibrosis and metabolic syndrome correlation in patients with hepatitis C* [Dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.
125. Cohen DE, Fisher EA. Lipoprotein metabolism, dyslipidemia, and nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis*. 2013 Nov;33(4):380-8.
126. Wu KT, Kuo PL, Su SB, Chen YY, Yeh ML, Huang CI, *et al*. Nonalcoholic fatty liver disease severity is associated with the ratios of total cholesterol and triglycerides to high-density lipoprotein cholesterol. *J Clin Lipidol*. 2016 Mar-Apr;10(2):420-5.
127. Wang C, Gong J, Wu H. Development of gene polymorphisms in meditations of nonalcoholic fatty liver disease (Review). *Biomed Rep*. 2017;7(2):95-104.
128. Zegers D, Verrijken A, Francque S, de Freitas F, Beckers S, Aerts E, *et al*. Screening for rare variants in the PNPLA3 gene in obese liver biopsy patients. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2016;40(6):715–21.
129. Mazo DF, Malta F, Stefano JT, Salles APM, Gouvea MSG, *et al*. PNPLA3 but not TM6SF2 polymorphisms were associated with higher degrees of steatosis and liver fibrosis among Brazilian NAFLD patients. *AASLD Meeting; 2017*. Poster, Control ID: 2780362.
130. Sanchez-Pulido L, Ponting CP. TM6SF2 and MBOAT7, new enzyme homologs in sterol metabolism and common metabolic disease. *Front Genet*. 2014;5:439.

131. Hernaeza R. Genetic factors associated with the presence and progression of nonalcoholic fatty liver disease: a narrative review. *Gastroenterol Hepatol*. 2012;35(1):32-41.
132. Nemati K, Golmoghaddam H, Hosseini SV, Ghaderi A, Doroudchi M. Interleukin-17FT7488 allele is associated with a decreased risk of colorectal cancer and tumor progression. *Gene*. 2015 Apr;561(1):88-94.
133. Neuschwander-Tetri BA. Fatty liver and the metabolic syndrome. *Curr Opin Gastroenterol*. 2007;23(2):193-8.
134. Byrne CD, Targher G. NAFLD: a multisystem disease. *J Hepatol*. 2015;62(1 Suppl):S47-64.
135. Streba LAM, Vere CC, Rogoveanu I, Streba CT. Nonalcoholic fatty liver disease, metabolic risk factors, and hepatocellular carcinoma: an open question. *World J Gastroenterol*. 2015;21(14):4103-10.
136. Bian Z, Xiong M. Liver fibrogenesis in non-alcoholic steatohepatitis. *Front Physiol*. 2012;3:248.
137. Yki-Järvinen H. Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014;2(11):901-10.
138. Elnakish MT, Hassanain HH, Janssen PM, Angelos MG, Khan M. Emerging role of oxidative stress in metabolic syndrome and cardiovascular diseases: important role of Rac/NADPH oxidase. *J Pathol*. 2013;231(3):290-300.
139. Jermendy G, Horvath T, Littvay L, Steinbach R, Jermendy AL, Tárnok AD, *et al*. Effect of genetic and environmental influences on cardiometabolic risk factors: a twin study. *Cardiovasc Diabetol*. 2011;10:96.