KARLA SAWADA TODA OTI

**Associação entre polimorfismos do gene da
proteína desacopladora 3 (UCP3) com doença hepática
gordurosa não alcoólica e síndrome metabólica**

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. Cláudia Pinto Marques
Souza de Oliveira

Coorientador: Dr. José Tadeu Stefano

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 01 de novembro de 2011.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Toda Oti, Karla Sawada

Associação entre polimorfismos do gene da proteína
desacopladora 3 (UCP3) com doença hepática
gordurosa não alcoólica e síndrome metabólica / Karla
Sawada Toda Oti. -- São Paulo, 2020.

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia.

Orientadora: Cláudia Pinto Marques Souza de
Oliveira.

Coorientador: José Tadeu Stefano.

Descritores: 1.Proteína desacopladora 3
2.Polimorfismo de nucleotídeo único 3.Haplótipos
4.Hepatopatia gordurosa não alcoólica 5.Síndrome
metabólica

USP/FM/DBD-310/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico esta tese:

*A meus pais, **Roberto** e **Helena**, que sempre foram e são
minha fonte de inspiração e incentivo; que me ensinaram
que sou capaz de me superar a cada novo desafio.*

*A meu marido, **Thiago**, meu porto seguro, meu
inestimado companheiro; que caminha a meu lado nas
aventuras e batalhas desta vida.*

*A meu filho, **Thomas**, que personificou o amor e me faz
querer ser uma pessoa melhor a cada dia!*

AGRADECIMENTOS

Durante a elaboração desta tese, tive apoio em diversos sentidos, de diferentes pessoas e grupos com quem trabalho e, com certeza, acima de tudo, tive o apoio de Deus.

Agradeço imensamente a minha querida orientadora Prof^a. Dr^a. Cláudia Oliveira, que constantemente me inspira na vida científica, acadêmica e, sobretudo, como ser humano.

Agradeço com o mesmo carinho e intensidade a meu coorientador Dr. José Tadeu Stefano, que participou ativamente de todas as etapas deste estudo com grande dedicação e foi essencial para seu desenvolvimento e conclusão.

A toda a equipe do Ambulatório de Doença hepática gordurosa não alcoólica do HC-FMUSP, que é/será como uma eterna família, onde aprendi que crescemos e evoluímos ajudando uns aos outros. É um valor que carregarei em minha profissão e filosofia de vida.

Às equipes do LIM-07 e LIM-18, que possibilitaram a execução das etapas fundamentais deste estudo, com extremo profissionalismo.

A minha banca de qualificação – Professores e Doutores Daniel Mazo, Sandra Villares e Mário Pessoa – que contribuíram fortemente com suas considerações para este estudo e para meu desenvolvimento pessoal acadêmico.

Ao Thiago Patente, biomédico com grande experiência bioestatística, que realizou as análises estatísticas e auxiliou-me formidavelmente na elaboração da tese e do artigo.

Em conclusão, agradeço a minha amada família, que compreendeu os meus momentos de ausência/dedicação e sempre apoiou meu crescimento profissional.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. 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 abreviaturas

Lista de figuras e gráficos

Lista de tabelas

Lista de quadros

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Fisiopatogenia da DHGNA	4
1.1.1.	Disfunção mitocondrial e estresse oxidativo na DHGNA	9
1.2.	Genética na DHGNA	11
1.3.	Proteínas desacopladoras mitocondriais	17
1.3.1.	Aspectos gerais	17
1.3.2.	Proteína desacopladora 3 (UCP3)	20
1.3.2.1.	Caracterização estrutural e genética	20
1.3.2.2.	Expressão da UCP3 ao nível do RNAm	20
1.3.2.3.	Funções biológicas	21
1.3.2.3.1.	Regulação de EROs	21
1.3.2.3.2.	Exportação de ânions de AGs	22
1.3.2.4.	Regulação da expressão genética de UCP3	24
1.3.2.5.	Implicações metabólicas	24
1.3.3.	Polimorfismos genéticos do gene UCP3	26
1.4	Escolha dos polimorfismos do gene UCP3	29
1.5	Justificativa	30
2	OBJETIVOS	32
2.1.	Objetivo geral	33
2.2.	Objetivos específicos	33
3	MÉTODOS	34
3.1.	Casuística	35
3.2.	Considerações éticas	35

3.3.	Critérios de inclusão	36
3.4.	Critérios de exclusão	36
3.5.	Coleta de dados	37
3.6.	Definição da síndrome metabólica (SM) e resistência à insulina (RI)	37
3.7.	Exames bioquímicos	38
3.8.	Polimorfismos do gene UCP3	38
3.8.1.	Extração de DNA	38
3.8.2.	Genotipagem dos polimorfismos rs1726745, rs3781907 e rs11235972 do gene UCP3	39
3.9.	Análise histológica	40
3.10.	Análise estatística	42
4	RESULTADOS	44
4.1	Características dos pacientes com DHGNA, conforme a presença de EHNA	47
4.2	Características dos pacientes com DHGNA, conforme a presença de SM	49
4.3	Distribuição genotípica dos polimorfismos do gene UCP3	51
4.4	Análises individuais dos polimorfismos do gene UCP3	52
4.4.1	De acordo com a presença de EHNA e SM	52
4.4.2	De acordo com as características clínico-laboratoriais.....	54
4.4.3	De acordo com as variáveis histológicas.....	59
4.5	Desequilíbrio de ligação	65
4.6	Análise dos haplótipos dos polimorfismos do gene UCP3	66
5	DISCUSSÃO	68
6	CONCLUSÃO	80
7	ANEXOS	83
	Anexo A – Aprovação do projeto pelo CEP do HC-FMUSP	84
8	REFERÊNCIAS	87

LISTAS

LISTA DE ABREVIATURAS

A	adenina
AGs	ácidos graxos
AGCL	ácidos graxos de cadeia longa
AGL	ácidos graxos livres
ALT	alanino aminotransferase
AST	aspartato aminotransferase
ATP	adenosina trifosfato
AVE	acidente vascular encefálico
C	citossina
CHC	carcinoma hepatocelular
coA	coenzima A
CTE	cadeia transportadora de elétrons
CTP	carnitina palmitoiltransferase
DAC	doença arterial coronariana
DAMPS	padrões moleculares associados a danos
DCV	doença cardiovascular
DHGNA	doença hepática gordurosa não alcoólica
DL	desequilíbrio de ligação
DP	desvio padrão
DMT2	diabetes mellitus tipo 2
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EHNA	esteato-hepatite não alcoólica
EHW	equilíbrio de Hardy-Weinberg
EROs	espécies reativas de oxigênio
EWAS	<i>Exome-Wide Association Studies</i>
FA	fosfatase alcalina
FAD+	dinucleótido de flavina e adenina

FADH	dinucleótido de flavina e adenina (reduzido)
FDR	Taxa de falsa descoberta
FPP	força de preensão palmar
G	guanina
GGT	gama-glutamil transferase
GJ	glicemia de jejum
GWAS	<i>Genome-Wide Association Studies</i>
H ⁺	hidrogênio
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HAS	hipertensão arterial sistêmica
Hba1c	hemoglobina glicada
HDL	lipoproteína de alta densidade
HOMA-IR	<i>Homeostatic Model of Assessment</i>
HNE	4-hidroxi-2-nonenal
HAS	hipertensão arterial sistêmica
IC	intervalo de confiança
IL	interleucina
IMC	índice de massa corporal
LDN	lipogênese <i>de novo</i>
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LPS	lipopolissacarídeos
MAF	frequência do menor alelo
MDA	malondialdeído
MI	microbiota intestinal
NAD ⁺	dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NADH	dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (reduzido)
NAFLD	<i>Nonalcoholic fatty liver disease</i>
NAS	<i>NAFLD Activity Score</i>
NASH	<i>Nonalcoholic steatohepatitis</i>
O ₂ ⁻	superóxido
OR	<i>odds ratio</i>
PAMPS	padrões moleculares associados a patógenos
PNPLA3	<i>patatin-like phospholipase domain-containing 3</i>
PPAR	receptores ativados por proliferadores do peroxissoma

RCV	risco cardiovascular
RE	retículo endoplasmático
RI	resistência a insulina
RM	ressonância magnética
RNA _m	ácido ribonucleico mensageiro
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa
SM	síndrome metabólica
SNP	polimorfismo de nucleotídeo único
SOD	superóxido dismutase
TAM	tecido adiposo marrom
T	timina
TE	Tris EDTA
TG	triglicerídeos
TM6SF2	<i>transmembrane 6 superfamily member 2</i>
TLR	receptores “ <i>toll-like</i> ”
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
UCP	proteína desacopladora
UPR	resposta proteica desdobrada
USG	ultrassonografia
VLDL	lipoproteína de muito baixa densidade

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1 -	Patogênese da doença hepática gordurosa não alcoólica: de dois para múltiplos <i>hits</i> paralelos	5
Figura 2 -	Hipótese dos múltiplos <i>hits</i> para a progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e história natural da DHGNA	8
Figura 3 -	Participação da disfunção mitocondrial e estresse oxidativo na patogênese da doença hepática gordurosa não alcoólica e progressão para esteato-hepatite não alcoólica.....	10
Figura 4 -	Comunalidade genética entre a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e síndrome metabólica (SM): uma rede de conectividade baseada em genes	13
Figura 5 -	Miríade de estudos com diferentes abordagens explorando a doença hepática gordurosa não alcoólica como uma doença poligênica e hereditária	14
Figura 6 -	Visão geral das principais variantes genéticas envolvidas na susceptibilidade e progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica / esteato-hepatite não alcoólica	16
Figura 7 -	Fosforilação oxidativa e participação das proteínas desacopladoras no desacoplamento mitocondrial	18
Figura 8 -	Representação esquemática do gene da proteína desacopladora 3 (UCP3)	20
Figura 9 -	Potenciais papéis da proteína desacopladora 3 (UCP3)	23
Figura 10 -	Possíveis vias e reações influenciadas pela proteína desacopladora 3 (UCP3)	25
Figura 11 -	Representação do gene da proteína desacopladora 3 (UCP3) com os polimorfismos selecionados para o estudo	29
Figura 12 -	Fluxograma de seleção e categorização dos pacientes com Doença hepática gordurosa não alcoólica no estudo.....	46
Figura 13 -	Desequilíbrio de ligação (métrica r^2) entre os SNPs do gene UCP3, representado pelo mapa de calor (<i>heatmap</i>)	65

Gráfico 1 - Representação da associação do alelo T (CX vs TT) do polimorfismo rs1726745 do gene UCP3 com o índice de massa corporal (IMC) na amostra geral (A) e no grupo esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Estudos de associação de polimorfismos do gene UCP3 com fatores de risco metabólicos e doença hepática gordurosa não alcoólica	27
Tabela 2 -	Distribuição populacional da frequência do menor alelo (MAF) dos polimorfismos rs1726745, rs3781907 e rs11235972 do gene UCP3, conforme o projeto 1000 Genomes.....	30
Tabela 3 -	Características demográficas, clínicas e bioquímicas dos pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica de acordo com a presença de esteato-hepatite não alcoólica (EHNA)	48
Tabela 4 -	Características demográficas, clínicas e bioquímicas dos pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica de acordo com a presença de síndrome metabólica (SM)	50
Tabela 5 -	Distribuição das frequências dos genótipos e alelos dos polimorfismos do gene UCP3 no presente estudo	51
Tabela 6 -	Frequências dos genótipos dos polimorfismos do gene UCP3, de acordo com a presença de esteato-hepatite não alcoólica (EHNA)	52
Tabela 7 -	Frequências dos genótipos dos polimorfismos do gene UCP3, de acordo com a presença de síndrome metabólica (SM)	53
Tabela 8 -	Associações entre genótipos do polimorfismo rs1726745 do gene UCP3 e variáveis bioquímicas.....	56
Tabela 9 -	Associações entre genótipos do polimorfismo rs3781907 do gene UCP3 e variáveis bioquímicas.....	57
Tabela 10 -	Associações entre genótipos do polimorfismo rs11235972 do gene UCP3 e variáveis bioquímicas.....	58
Tabela 11 -	Frequências dos genótipos dos polimorfismos do gene UCP3, de acordo com a ausência ou presença de fibrose hepática	60
Tabela 12 -	Frequências dos genótipos dos polimorfismos do gene UCP3, de acordo com presença de fibrose hepática avançada (F3-F4)	61

Tabela 13 -	Caracterização das variáveis histológicas dos pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica de acordo com os genótipos do polimorfismo rs1726745 do gene UCP3	62
Tabela 14 -	Caracterização das variáveis histológicas dos pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica de acordo com os genótipos do polimorfismo rs3781907 do gene UCP3	63
Tabela 15 -	Caracterização das variáveis histológicas dos pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica de acordo com os genótipos do polimorfismo rs11235972 do gene UCP3	64
Tabela 16 -	Análise dos haplótipos dos polimorfismos do gene UCP3, de acordo com a esteato-hepatite não alcoólica (EHNA)	66
Tabela 17 -	Análise dos haplótipos dos polimorfismos do gene UCP3, de acordo com a síndrome metabólica (SM)	66
Tabela 18 -	Análise dos haplótipos dos polimorfismos do gene UCP3 de acordo com a presença ou ausência de fibrose hepática	67
Tabela 19 -	Análise dos haplótipos dos polimorfismos do gene UCP3 de acordo com presença de fibrose hepática avançada (F3-F4)	67

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Critérios histológicos para DHGNA definido pelo *Pathology
Committe of the NASH Clinical Research Network* 41

RESUMO

Toda Oti KS. *Associação entre polimorfismos do gene da proteína desacopladora 3 (UCP3) com doença hepática gordurosa não alcoólica e síndrome metabólica* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

Introdução: A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) tem demonstrado um comportamento epidêmico. As variantes genéticas do gene da proteína desacopladora 3 (UCP3) foram associadas à obesidade, diabetes mellitus tipo 2 e perfil lipídico aterogênico, com resultados conflitantes. Nosso estudo avaliou a possível associação entre polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) do gene UCP3 com esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) e síndrome metabólica (SM) em pacientes com DHGNA. **Métodos:** Foram selecionados 158 pacientes com DHGNA comprovada por biópsia hepática acompanhados entre 2010 e 2019 no Ambulatório de Doença hepática gordurosa não alcoólica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo (HC-FMUSP). A partir de um banco de dados/DNA, os SNPs rs1726745, rs3781907 e rs11235972 do gene UCP3 foram genotipados. A amostra foi avaliada de acordo com a presença de esteatose ou EHNA e, de acordo com a presença de SM. A análise estatística foi realizada utilizando os *softwares* JMP, R e SHEsis. **Resultados:** A prevalência geral de SM foi 82,6% (n=128). Pacientes com EHNA (n=138) apresentaram maior frequência de SM (p=0,02), maior índice de massa corporal (IMC) (p=0,02) e maiores concentrações de aspartato aminotransferase (p=0,002). O genótipo TT do rs1726745 do gene UCP3 foi protetor para SM (OR=0,18; IC 95%=0,05-0,61; p=0,006) e associou-se à menor IMC na amostra geral (p=0,01) e no grupo EHNA (p=0,02). O alelo T do SNP rs1726745 associou-se com menores valores de AST (p=0,001), ALT (p=0,0002), TG (p=0,01) e colesterol total (p=0,02) na amostra geral. Na comparação entre grupos, houve menores valores de aminotransferases estritamente nos indivíduos com EHNA (AST, p=0,002; ALT, p=0,0007; vs esteatose) e com SM (AST, p=0,002; ALT, p=0,001; vs sem SM) e, menores valores de TG nos indivíduos com EHNA (p=0,02; vs esteatose). A presença do alelo G do SNP rs3781907 associou-se a menores valores de GGT (p=0,002) na amostra geral e nos grupos EHNA (p=0,004; vs esteatose) e com SM (p=0,003; vs sem SM) e com proteção para fibrose avançada (OR=0,25; IC 95%=0,08-0,69; p=0,01). O alelo A do SNP rs11235972 associou-se a menores valores de GGT (p=0,006) na amostra geral e nos grupos com EHNA (p=0,01; vs esteatose) e com SM (p=0,005; vs sem SM), com ausência de fibrose (OR=0,34; IC 95%=0,14-0,80; p=0,01) e proteção para fibrose avançada (OR=0,17; IC 95%=0,03-0,56; p=0,01). O haplótipo TAA (rs1726745, rs3781907, rs11235972) foi protetor para EHNA (OR=0,01; IC 95%=0,00-0,12; p=0,002) e o haplótipo TGG foi protetor para SM (OR=0,22; IC 95%=0,07-0,69; p=0,01). **Conclusão:** Variantes do gene UCP3 associaram-se à proteção para EHNA e SM, além de menores valores de enzimas hepáticas, perfil lipídico, IMC e menor gravidade da fibrose hepática na população estudada.

Descritores: Proteína desacopladora 3; Polimorfismo de nucleotídeo único; Haplótipos; Hepatopatía gordurosa não alcoólica; Síndrome metabólica.

ABSTRACT

Toda Oti KS. *Association between UCP3 gene polymorphisms and nonalcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2020.

Introduction: Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) has shown an epidemic behavior. Genetic variants in the uncoupling protein 3 (UCP3) gene have been associated with obesity, type 2 diabetes and atherogenic lipid profile, with conflicting results. Our study evaluated the possible association between UCP3 gene single nucleotide polymorphisms (SNPs) with nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and metabolic syndrome (MetS) in NAFLD patients. **Methods:** UCP3 SNPs rs1726745, rs3781907 and rs11235972 were genotyped in 158 biopsy-proven NAFLD patients. Subsequently, patients were evaluated according to the presence of nonalcoholic fatty liver (NAFL) or NASH and, according to the absence or presence of MetS. Statistics were performed with JMP, R and SHEsis software's. **Results:** The overall prevalence of MetS was 82.6% (n=128). NASH patients (n=138) had a higher MetS frequency (p=0.02), higher body mass index (BMI) (p=0.02) and higher concentrations of aspartate aminotransferase (AST) (p=0.002). The TT genotype of rs1726745 was protective for MetS (OR=0.18; 95% CI=0.05-0.61; p=0.006) and was associated with lower body mass index (BMI) in the general sample (p=0.01) and in the NASH group (p=0.02). The T allele of rs1726745 was associated with lower values of AST (p=0.001), ALT (p=0.0002), TG (p=0.01) and total cholesterol (p=0.02) in the general sample. In comparison between groups, there were lower values of aminotransferases strictly in individuals with NASH (AST, p=0.002; ALT, p=0.0007; vs NAFL) and with MetS (AST, p=0.002; ALT, p=0.001; vs without MetS). The G allele of rs3781907 was associated with lower GGT values (p=0.002) in the general sample and in the NASH group (p=0.004; vs NAFL) and with MetS group (p=0.003; vs without MetS) and, with protection for advanced fibrosis (OR=0.25; 95% CI=0.08-0.69; p=0.01). The A allele of rs11235972 was associated with lower GGT values (p=0.006) in the general sample and in the NASH group (p=0.01; vs NAFL) and with MetS group (p=0.005; vs without MetS), with fibrosis absence (OR=0.34; 95% CI=0.14-0.80; p=0.01) and protection for advanced fibrosis (OR=0.17; 95% CI=0.03-0.56; p=0.01). The TAA haplotype (rs1726745, rs3781907, rs11235972) was protective for NASH (OR=0.01; 95% CI=0.00-0.12; p=0.002) and TGG haplotype was protective for MetS (OR=0.22; 95% CI=0.07-0.69; p=0.01). **Conclusion:** UCP3 gene variants were associated with protection against NASH and MetS, in addition to lower values of liver enzymes, lipid profile, BMI and, lesser fibrosis severity in the studied population.

Descriptors: Uncoupling protein 3; Polymorphism single nucleotide; Haplotypes; Non-alcoholic fatty liver disease; Metabolic syndrome.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é caracterizada pela deposição de triglicerídeos (TG) (>5%) nos hepatócitos em pacientes sem consumo significativo de álcool (<20 gramas de etanol/dia, em mulheres; <30 gramas de etanol/dia em homens) e sem outras causas de hepatopatia crônica⁽¹⁾. O espectro da DHGNA engloba a esteatose simples e a esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), na qual, em adição à esteatose, há inflamação lobular, balonização hepatocitária e fibrose, com risco de progressão para cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC)^(1, 2).

A DHGNA vem demonstrando um comportamento epidêmico, tornando-se, nos dias atuais, a doença hepática crônica mais comum no mundo⁽¹⁻³⁾. Possui forte associação com a síndrome metabólica (SM) e seus componentes, como a obesidade, resistência à insulina (RI), dislipidemia, intolerância a glicose ou diabetes mellitus tipo 2 (DMT2)⁽¹⁻⁴⁾. Estima-se que a DHGNA ocorra em 6,3% -33% da população em geral⁽⁵⁾, entretanto, na presença de fatores metabólicos, acomete 40% - 80% de pacientes com DMT2 e 30% - 90% de indivíduos obesos⁽⁶⁾, sendo a doença cardiovascular (DCV) a principal causa de morte em indivíduos com DHGNA^(7, 8).

A RI foi identificada como uma das condições críticas na patogênese da DHGNA e da SM^(9, 10). Caracteriza-se pela redução da sensibilidade à insulina no corpo inteiro, fígado e tecido adiposo e, geralmente, está associada à inflamação leve e crônica, em que numerosos mediadores liberados das

células imunes e adipócitos contribuem para o dano hepático e progressão da DHGNA⁽⁴⁾.

Estudos apontam que quase todos os pacientes (90%) com DHGNA possuem, ao menos, um fator de risco para a SM e cerca de um terço deles apresentam todas as características da SM^(4, 10, 11). Apesar de ainda indefinido se a DHGNA é uma causa ou consequência da SM, estudos mais recentes vêm sugerindo uma associação bidirecional com recíproca causalidade entre as duas condições^(10, 11).

Uma grande proporção da população está sob risco de desenvolver DHGNA e suas complicações (EHNA, fibrose avançada e cirrose) em razão de obesidade e RI, entretanto, somente uma minoria (20% - 30%) dos portadores da DHGNA progride para uma doença mais avançada^(1-3, 5). As razões para esta evolução seguem incompreendidas; no entanto, sabe-se que a DHGNA é uma doença complexa e multifatorial, influenciada por sutis variações interindividuais, incluindo fatores genéticos e ambientais, que interagem desencadeando o fenótipo da doença e determinando sua progressão⁽⁶⁾.

Nos últimos 10 anos, diferentes estudos, epidemiológicos, familiares e em gêmeos revelaram o papel de fatores genéticos no desenvolvimento de esteatose, fibrose, cirrose e CHC em pacientes com DHGNA^(12, 13). Em 2008, Romeo *et al.*⁽¹⁴⁾ (2008) publicaram o primeiro estudo de associação genômica ampla [*Genome-Wide Association Study* (GWAS)] e demonstraram forte associação genética entre a presença de esteatose hepática e o polimorfismo de nucleotídeo único [*single nucleotide polymorphism* (SNP)] do gene *patatin-like phospholipase domain containing 3* (PNPLA3), rs738409. Desde então,

novas variantes genéticas foram identificadas como fatores que influenciam a fisiopatologia da DHGNA, a exemplo do SNP rs58542926 do gene *transmembrane 6 superfamily member 2* (TM6SF2)^(12, 13).

A identificação de novas variantes genéticas na DHGNA é de grande importância, pois permite a identificação de indivíduos sob maior risco para a DHGNA e sua progressão, além de contribuir para o manejo clínico, prognóstico e desenvolvimento de novas terapias⁽¹²⁻¹⁵⁾.

1.1 Fisiopatogenia da DHGNA

Embora a DHGNA tenha sido documentada há mais de 40 anos, os exatos mecanismos que levam a doença são incertos até o momento^(3, 6). Em 1998, Day e James⁽¹⁶⁾ propuseram a “teoria dos dois *hits*” para o desenvolvimento de EHNA, onde o primeiro passo seria a presença de RI, gerando acúmulo de ácidos graxos (AGs) no fígado, e, a partir deste ponto, insultos adicionais induziriam a inflamação, fibrose e cirrose.

Ao longo dos anos, esta visão vem sendo aprimorada diante das evidências de participação de diversos fatores, tais como endotoxinas, hormônios secretados pelo tecido adiposo, microbiota intestinal (MI), RI e fatores nutricionais, que agem de forma concomitante para ocorrência da DHGNA em indivíduos geneticamente predispostos (teoria dos múltiplos *hits* paralelos)^(6, 15, 17) (Figura 1).

FONTE: Adaptado de Lonardo A *et al.*⁽¹⁷⁾, 2017.

ABREVIATURAS: EHNA, esteato-hepatite não alcoólica; TLRs, *toll-like receptors*.

Figura 1 - Patogênese da doença hepática gordurosa não alcoólica: de dois para múltiplos *hits* paralelos. Representação esquemática do crescente grau de complexidade adquirida ao passar de teorias anteriores para os mais atualizados paradigmas patogênicos. Topo: antiga hipótese de “dois *hits*”: esteatose, o primeiro “*hit*”, sensibiliza o fígado para o segundo e demais *hits*: estresse oxidativo, endotoxina, depleção de adenosina trifosfato (ATP). Abaixo: a hipótese de “múltiplos *hits*” considera os vários insultos agindo juntos em indivíduos geneticamente predispostos

A gordura acumula-se no fígado sobretudo na forma de TG^(6, 15-17). O acúmulo de TG na DHGNA é resultado da expansão do *pool* intra-hepático de AGs livres (AGL). O influxo de AGL é dependente da: (a) quantidade de AGL liberados pelo tecido adiposo devido a RI e excessiva lipólise (corresponde a mais da metade do *pool*); (b) gordura da dieta e (c) lipogênese *de novo*

(LDN)^(17, 18). Por outro lado, o fígado pode catabolizar os AGL, em especial, pela oxidação de AGs via β -oxidação mitocondrial, ou por meio da formação e exportação de TG, como lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL). Na DHGNA, há um desequilíbrio crítico entre o excessivo influxo de AGL e a capacidade de oxidação dos AGs, gerando a esteatose^(17, 18).

Hábitos da dieta, fatores ambientais e fatores genéticos propiciam o desenvolvimento de RI e obesidade com proliferação e disfunção de adipócitos, além de mudanças na MI⁽¹⁷⁻¹⁹⁾. A RI é um dos fatores-chave para o desenvolvimento da esteatose e EHNA, pois favorece a LDN hepática e lipólise, com consequente aumento do fluxo de AGs no fígado. A RI também promove uma disfunção do tecido adiposo com consequente alteração na produção e secreção de adipocinas e citocinas inflamatórias⁽¹⁷⁻¹⁹⁾.

A lipotoxicidade resultante dos altos níveis de AGL, colesterol livre e outros metabólitos lipídicos desencadeia, como consequência, estresse do retículo endoplasmático (RE) com ativação da resposta proteica desdobrada (UPR) e disfunção mitocondrial, com estresse oxidativo e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), gerando apoptose e inflamação⁽¹⁷⁻¹⁹⁾. Quando a função mitocondrial não tolera o aumento do influxo de AGL, há prejuízo na oxidação respiratória e homeostase lipídica, gerando metabólitos tóxicos derivados dos lipídios e superprodução de EROs. Todas estas moléculas ativam vias inflamatórias, contribuindo para a necroinflamação hepatocitária e piora do dano mitocondrial⁽¹⁷⁻²⁰⁾.

A disbiose intestinal parece contribuir para o desenvolvimento e progressão da DHGNA por desencadear, diretamente ou via produtos

bacterianos, diferentes vias de sinalização, aumentando a eficiência da extração calórica do alimento e por induzir a translocação de produtos bacterianos, em especial, lipopolissacarídeos (LPS) e peptidoglicanos, via aumento da permeabilidade intestinal⁽²¹⁾. Padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs) circulantes interagem com a família de receptores de reconhecimento de padrão *toll-like receptors* (TLRs) dentro do fígado e induzem diversas vias pró-inflamatórias, incluindo a expressão de citocinas, produção de EROS e ativação de inflamassomas, como os LPS⁽²²⁾.

Em indivíduos predispostos por fatores genéticos ou modificações epigenéticas^(20, 23), todos esses fatores geram um estado de inflamação hepática crônica, por meio de vias de dano hepatocelular, com possível progressão para a morte hepatocelular por toxicidade direta e mecanismos de ativação de apoptose, ativação de células hepáticas estreladas, deposição de fibrose e evolução para cirrose e CHC^(19, 24) (Figura 2).

FONTE: Adaptado de Chen W *et al.*⁽²⁴⁾, 2018.

ABREVIATURAS: LDN, lipogênese *de novo*; RI, resistência à insulina; RE, retículo endoplasmático; AGL, ácidos graxos livres; CHC, carcinoma hepatocelular; IL, interleucina; DHGNA, doença hepática gordurosa não alcoólica; EHNA, esteato-hepatite não alcoólica; EROS, espécies reativas de oxigênio; TG, triglicerídeos; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; UPR, resposta proteica desdobrada; VLDL, lipoproteína de muito baixa densidade.

Figura 2 - Hipótese dos múltiplos *hits* para a progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e história natural da DHGNA. Fatores da dieta, ambientais e genéticos resultam no desenvolvimento de resistência à insulina (RI), obesidade com proliferação e adipócitos e mudanças na microbiota intestinal (MI). A RI leva ao aumento da LDN hepática e disfunção do tecido adiposo e adipócitos. A gordura acumula no fígado na forma de TG. Contemporaneamente, isso ocorre com o aumento da lipotoxicidade por aumento dos níveis de AGL, colesterol livre e outros metabólitos lipídicos que induzem a disfunção mitocondrial com estresse oxidativo, produção de EROS e estresse do RE com ativação da UPR. Todos esses fatores levam a inflamação hepática, apoptose e fibrose. Também, a MI alterada resulta em maior produção de AGL e colesterol e aumenta a permeabilidade intestinal. O aumento na absorção de ácidos graxos causa a ativação de inflamassomas como LPS, e liberação de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 e TNF- α .

1.1.1 Disfunção mitocondrial e estresse oxidativo na DHGNA

A disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo desempenham um papel central na fisiopatologia da DHGNA/ EHNA⁽¹⁸⁻²⁰⁾.

Em condições fisiológicas, os AGL são depositados predominantemente via oxidação mitocondrial. O aumento significativo da oxidação mitocondrial é a principal fonte de EROs na DHGNA⁽²⁵⁾ (Figura 3). O prejuízo da função mitocondrial leva à inibição secundária da β -oxidação lipídica, aumentando a esteatose e iniciando um ciclo vicioso. Quando há o esgotamento da oxidação mitocondrial, outras vias de oxidação lipídica (via peroxissomal e microssomal) são ativadas, gerando mais EROs e aumentando o estresse oxidativo hepático^(25, 26).

FONTE: Adaptado de Ucar F *et al.*⁽²⁵⁾, 2013.

ABREVIATURAS: AGL, ácidos graxos livres; IL, interleucina; EROs, espécies reativas de oxigênio; HNE, 4-hidroxi-2-nonenal; MDA, malondialdeído; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa.

Figura 3 - Participação da disfunção mitocondrial e estresse oxidativo na patogênese da doença hepática gordurosa não alcoólica e progressão para esteato-hepatite não alcoólica

Desta forma, a disfunção mitocondrial gera superprodução de EROs, com aumento da peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e subsequentes: (a) formação de outros metabólitos reativos no fígado, como 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) e malondialdeído (MDA); (b) liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6, IL-8, Fas ligante e (c) ativação de células hepáticas estreladas, resultando tanto na ativação de fibroblastos, como no dano oxidativo, inflamação e morte celular^(25, 26).

As EROs e outros produtos da peroxidação lipídica prejudicam ainda a cadeia respiratória nos hepatócitos. O prejuízo da fosforilação oxidativa resulta

na redução de ATP sintase hepática e aumento da produção de EROs^(25, 26). A RI e a obesidade, com a liberação de adipocinas, atuam como fatores indutores e contribuintes do processo de disfunção mitocondrial e estresse oxidativo⁽²⁷⁾.

A interação de fatores genéticos e ambientais junto aos mecanismos supracitados atuam contribuindo para o desenvolvimento da DHGNA/EHNA e progressão da inflamação e fibrose.

1.2 Genética na DHGNA

Há uma considerável variação interindividual em termos de gravidade e risco de morbimortalidade associado à DHGNA⁽²³⁾. A patogênese da DHGNA é multifatorial e associada com hábitos de vida, fatores nutricionais e genéticos que interagem e expressam um determinado fenótipo⁽¹⁷⁻¹⁹⁾. Entretanto, a patogênese e o mecanismo subjacente no desenvolvimento da DHGNA causada pela genética permanecem não esclarecidos. A função de polimorfismos genéticos implicados na RI, metabolismo dos AGs, estresse oxidativo e hepatofibrogênese é implicada em todo o ciclo da patogênese da DHGNA^(12, 15, 28).

Diversos estudos epidemiológicos, familiares, em gêmeos e uma série de relato de casos demonstrando agrupamento familiar embasam um forte componente genético no desenvolvimento e progressão da DHGNA e da EHNA^(12, 13, 29).

Uma das primeiras evidências da herdabilidade da DHGNA foram obtidas pela avaliação de formas familiares de cirrose criptogênica. Struben, Hespenheide e Caldwell⁽³⁰⁾ (2000) avaliaram 18 membros da família de oito

pacientes com cirrose criptogênica, contendo dois ou mais membros afetados. Observaram a coexistência de EHNA com e sem cirrose e cirrose criptogênica nos parentes destes pacientes sugerindo uma patogênese comum e possível risco genético.

Estudo realizado com gêmeos adultos jovens mono e dizigóticos avaliou a herdabilidade da concentração sérica de alanino aminotransferase (ALT) e sua associação com o conteúdo de gordura hepática mensurado por ressonância magnética (RM)⁽³¹⁾. Os resultados sugerem que as concentrações de ALT correlacionaram-se com significativo conteúdo de gordura hepática e, aproximadamente, 60% da variação da enzima foi determinada geneticamente.

Outro estudo de coorte com gêmeos mono e dizigóticos avaliou a esteatose e fibrose por RM e identificou que ambas se comportaram como características hereditárias em gêmeos monozigóticos, sugerindo que mecanismos geneticamente determinados poderiam induzir o desenvolvimento da doença e favorecer sua progressão⁽³²⁾.

Além disso, uma avaliação da covariância genética dos traços associados a SM em gêmeos revelou associação significativa entre esteatose hepática, índice de massa corporal (IMC) e hiperinsulinemia e, entre fibrose hepática e hemoglobina glicada (Hba1c), sugerindo uma base genética subjacente entre a esteatose, fibrose e fatores metabólicos⁽³³⁾. Cerca de 44% dos genes associados à DHGNA são compartilhados por outros componentes da SM e, aproximadamente, 14% com DMT2, obesidade e hipertensão arterial sistêmica (HAS) combinados⁽³⁴⁾ (Figura 4).

Rede de conectividade genética entre DHGNA e SM

FONTE: Adaptado de Sookian S e Pirola CJ⁽³⁴⁾, 2016.

ABREVIATURAS: HAS, hipertensão arterial sistêmica; DMT2, diabetes mellitus tipo 2.

Figura 4 - Comunidade genética entre a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e síndrome metabólica (SM): uma rede de conectividade baseada em genes. A figura mostra a ilustração da coocorrência gene/ proteína e sua relação com a DHGNA e doenças associadas a SM. A análise baseada nos genes sugere uma grande rede de interconectividade (círculo tracejado) que liga os pontos da DHGNA, obesidade, DMT2 e HAS. A entrada considerou as listas de múltiplos genes de relatórios existentes, incluindo 272 genes para hipertensão, 215 genes para obesidade, 222 genes para DMT2 e 232 genes para DHGNA. O diagrama de Venn (à esquerda) representa a fração de genes pertencentes a cada subcategoria, de acordo com os maiores componentes da SM; 130 genes são exclusivamente associados com DHGNA, mas 102 são compartilhados com outros componentes da SM, 32 dos quais são compartilhados com DMT2, obesidade e HAS. À direita, a rede está demonstrada como um gráfico *Cytoscape*

Em consonância com um forte papel da genética na DHGNA, diferenças raciais e étnicas vêm sendo relatadas na prevalência e gravidade da DHGNA⁽¹⁵⁾. Uma metanálise realizada, em 2018, avaliou disparidades raciais e étnicas na DHGNA e identificou maior prevalência da DHGNA em hispânicos

(22,9%), intermediária em brancos (14,4%) e menor em negros (13,0%), além de menor gravidade e proporção de fibrose significativa em negros (13,1%)⁽³⁵⁾. Estudo realizado por Palmer *et al.*⁽³⁶⁾ (2013) avaliou a influência de variantes genéticas associadas à DHGNA de ascendência europeia em indivíduos de ascendência africana e hispânica e relatou diferenças nas estimativas de herdabilidade entre famílias hispano-americanas (34%) e africanas (20%).

O papel da variação genética na DHGNA vem sendo o foco de pesquisas extensas na última década, incluindo o clássico estudo de genes candidatos, assim como os novos estudos GWAS e estudos de associação do exoma [*Exome-Wide Association Study* (EWAS)]⁽²⁹⁾ (Figura 5).

FONTE: Adaptado de Sookoian S *et al.*⁽²⁹⁾, 2017.

ABREVIATURAS: GWAS, *Genome-Wide Association Study*; EWAS, *Exome-Wide Association Study*.

Figura 5 - Miríade de estudos com diferentes abordagens explorando a doença hepática gordurosa não alcoólica como uma doença poligênica e hereditária

Os estudos de genes candidatos e GWAS baseiam-se na associação estatística de marcadores genéticos e na doença (fenótipo) de interesse. Os marcadores genéticos mais comuns são os SNPs, definidos como a alteração de uma única base [adenina (A), timina (T), citosina (C) ou guanina (G)] em uma sequência do genoma, comum em mais de 1% da população^(13, 37).

O desenvolvimento da tecnologia de GWAS tem permitido a identificação de numerosos polimorfismos genéticos envolvidos na evolução das doenças, uma vez que eles podem alterar os estágios de desenvolvimento, susceptibilidade à doença, taxa de progressão e eficácia ao tratamento^(38, 39). Em 2008, o primeiro GWAS foi publicado em pacientes com DHGNA e 9.229 SNPs foram analisados em uma população de etnia variada, a fim de encontrar variantes genéticas associadas à doença⁽¹⁴⁾. Este estudo identificou que o SNP rs738409 do gene PNPLA3 estava fortemente associado ao acúmulo de gordura no hepatócito em uma coorte de mais de 2.000 pacientes etnicamente diversos. Esta associação permaneceu significativa mesmo depois de ter sido ajustada para o IMC, DMT2, ingestão de álcool e etnia⁽²³⁾.

Paralelamente, estudos de genes candidatos, aplicando a hipótese de múltiplos *hits*, estudaram os possíveis efeitos dos genes na DHGNA e sua progressão, baseando-se em diferentes, mas não mutuamente exclusivos, mecanismos: (a) genes envolvidos no metabolismo lipídico (síntese, armazenamento, exportação, oxidação); (b) genes implicados no metabolismo da glicose e sinalização de insulina; e (c) genes envolvidos no estresse oxidativo e inflamação⁽⁴⁰⁾ (Figura 6).

FONTE: Adaptado de Macaluso FS *et al.*⁽⁴⁰⁾, 2015.

ABREVIATURAS: GWAS, *Genome-Wide Association Study*; CHC, carcinoma hepatocelular.

Figura 6 - Visão geral das principais variantes genéticas envolvidas na susceptibilidade e progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica/esteato-hepatite não alcoólica

Apesar de crescentes e cumulativas evidências de uma base genética na DHGNA, alguns pontos limitantes merecem destaque. Primeiramente, as variantes genéticas associadas à DHGNA possuem um efeito bastante diversificado na susceptibilidade da DHGNA, desde intermediário (*odds ratio* 3,24) a baixo (*odds ratio* 1,2), o que resulta em uma frequência bastante

variável do alelo de risco, sendo este, frequentemente, o alelo de menor frequência⁽²⁹⁾. Além disso, há áreas em que o conhecimento do componente genético da DHGNA é insuficiente ou ausente, também referido como “*missing heritability*”, incluindo o papel de variantes raras, variações estruturais, interações entre genes e o ambiente, variações epigenéticas e variabilidades no DNA mitocondrial^(29, 38).

Diante das evidências da importância da disfunção mitocondrial na patogênese da DHGNA, considera-se que polimorfismos genéticos que influenciem o desempenho mitocondrial e estresse oxidativo possam contribuir no desenvolvimento e progressão da DHGNA^(41, 42). Uma das vias envolvidas nas alterações da funcionalidade mitocondrial corresponde às proteínas desacopladoras mitocondriais (UCPs), em especial, a proteína desacopladora mitocondrial 3 (UCP3)⁽⁴³⁾.

1.3 Proteínas desacopladoras mitocondriais

1.3.1 Aspectos gerais

A mitocôndria é a maior reguladora do metabolismo energético celular pela produção de ATP. Alterações na funcionalidade mitocondrial vêm sendo associadas à patogênese de algumas desordens metabólicas, incluindo a obesidade e DMT2^(44, 45).

O processo metabólico da respiração celular, como a glicólise, ciclo de Krebs, contribui com elétrons por meio dos carreadores dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD⁺) e dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD⁺) para a cadeia transportadora de elétrons (CTE) (Figura 7). A ação da CTE

(complexos I-IV) resulta no bombeamento de prótons de hidrogênio (H^+) por meio da membrana mitocondrial interna da matriz para o espaço intermembranas, estabelecendo um gradiente eletroquímico. Normalmente, essa força motora de prótons é aproveitada pela ATP sintase para produzir ATP. As UCPs fornecem um meio alternativo por meio do qual os prótons atravessam a membrana interna e dissipam a energia deste vazamento pela produção de calor, sendo, portanto, um processo desacoplado da produção de ATP⁽⁴⁶⁾. Os AGs podem ativar as UCPs por meio da ligação a uma bolsa hidrofóbica na proteína que aumenta a condutância de prótons, resultando, indiretamente, em maior oxidação de substratos energéticos, diminuindo a eficiência da síntese de ATP e produzindo mais calor, com implicações na regulação da temperatura, do gasto energético e do peso corporal⁽⁴⁷⁾.

FONTE: Adaptado de Fuller-Jackson J e Henry B ⁽⁴⁴⁾, 2018.

Figura 7 - Fosforilação oxidativa e participação das proteínas desacopladoras no desacoplamento mitocondrial

Os membros da família das UCPs em mamíferos incluem: UCP1, UCP2, UCP3, UCP4 e UCP5, com diferentes distribuições nos tecidos⁽⁴⁴⁾. O primeiro membro descrito foi a UCP1, expresso somente no tecido adiposo marrom (TAM), rico em mitocôndrias e gotículas de lipídios. Mamíferos, incluindo, recém-nascidos humanos usam o calor liberado para se proteger contra o frio; esse processo é referido como “termogênese sem tremor” (termogênese adaptativa)⁽⁴⁸⁾. Entretanto, o TAM praticamente desaparece após a infância, havendo mínima ou indetectável expressão da UCP1 em adultos⁽⁴⁹⁾. Mesmo na ausência da UCP1, identificava-se um vazamento de prótons pela membrana mitocondrial interna, o que motivou a busca de UCPs adicionais. Em 1997, foram descobertas as UCP2 e UCP3, proteínas homólogas à UCP1 (UCP2: 57% de homologia; UCP3: 73%), expressas em múltiplos tecidos e nos músculos esqueléticos⁽⁵⁰⁾, respectivamente. Posteriormente, UCP4 e UCP5 foram identificadas, sendo expressas no cérebro e com menor identificação de aminoácidos com a UCP1 (30% - 40%)⁽⁴⁹⁾.

Por muito tempo, a UCP3 foi tratada como similar à UCP2 em razão de sua homologia e história de sua descoberta. Entretanto, tornou-se claro que suas funções biológicas e de transporte diferem consideravelmente⁽⁵¹⁾. Estudos indicam um intrigante papel da UCP3 na regulação de diferentes desfechos metabólicos, incluindo a regulação da homeostase energética corporal, obesidade e regulação do metabolismo lipídico^(47, 49-51), motivando nosso particular interesse em sua investigação.

1.3.2 Proteína desacopladora 3 (UCP3)

1.3.2.1 Caracterização estrutural e genética

A UCP3 é uma típica proteína carreadora mitocondrial que apresenta cerca de 57% de homologia com UCP1 e 73% com a UCP2. Duas formas variantes foram descobertas em humanos: uma forma longa (UCP3L) com 312 aminoácidos e, uma forma curta (UCP3S) com 275 aminoácidos. Entretanto, a relevância entre essas variantes é incerta⁽⁵¹⁾.

O gene humano da UCP3 (gene UCP3) contém 7 éxons que estão distribuídos em cerca de 8,5 kilobytes (kB) e, está localizado no braço longo do cromossomo 11, região 1 e banda 3 (11q13)⁽⁵²⁾ (Figura 8).

FONTE: Adaptado de Van Abeelen AFM *et al.*⁽⁵²⁾, 2008.

Box cinza: região codificadora; box branco: *untranslated region* – UTR.

Figura 8 - Representação esquemática do gene da proteína desacopladora 3 (UCP3)

1.3.2.2 Expressão de UCP3 ao nível do RNAm

O principal sítio de expressão de UCP3 em humanos é o músculo esquelético, com alguns traços desta expressão no tecido cardíaco⁽⁴⁹⁻⁵¹⁾.

Por meio de modelos animais, foram identificados diferentes padrões de distribuição e expressão do RNAm de UCP3 em ratos⁽⁴⁹⁾, ocorrendo sobretudo no TAM, seguido por músculos com diferentes metabolismos (glicolítico, misto e oxidativo de contração lenta) e, em menores níveis, no coração, pulmões e tecido adiposo branco⁽⁵¹⁾.

1.3.2.3 Funções biológicas

Diante da localização da UCP3 no TAM e transporte de prótons, a hipótese inicial era de que atuasse com função termogênica, semelhante à UCP1⁽⁵⁰⁾. Entretanto, diversos estudos experimentais em camundongos transgênicos ou nocauteados para o gene UCP3 indicaram ausência de mudança na expressão fenotípica (ganho de peso/obesidade) e na taxa de gasto energético desses animais em relação a controles selvagens, questionando o papel termogênico da UCP3⁽⁵³⁻⁵⁵⁾. Diante disso, mecanismos adicionais da UCP3 foram explorados e, atualmente, a UCP3 parece estar envolvida em dois principais papéis que não são mutuamente exclusivos: (1) redução na produção de EROs e (2) exportação de ânions de AGs^(51, 56).

1.3.2.3.1 Regulação de EROs

Em condições fisiológicas, entre 0,02% e 2% dos elétrons da CTE não seguem a ordem normal e acabam vazando para fora da CTE e interagindo com o oxigênio, produzindo superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Os complexos I e III, especialmente, o complexo I, são considerados os principais sítios de produção de EROs na mitocôndria. O $O_2^{\cdot-}$ liberado no

espaço intermembranas pode ser convertido pela superóxido dismutase (SOD) para H_2O_2 , uma forma relativamente mais estável e com capacidade de se dispersar por meio da membrana externa mitocondrial, agindo como uma molécula de sinalização intracelular. Quando em grande quantidade, as EROs causam peroxidação lipídica com produção de HNE, dano ao DNA, oxidação de proteínas, dano irreversível mitocondrial, geração insuficiente de ATP e, eventualmente, morte celular^(53, 57).

Um dos possíveis papéis da UCP3 seria reduzir ou até inibir a produção de EROs na mitocôndria pela redução do gradiente transmembrana, via desacoplamento mitocondrial^(51, 57) (Figura 9). A redução do gradiente permite que a transferência de elétrons pela CTE possa ser acelerada e a probabilidade dos elétrons serem diretamente transferidos ao oxigênio é minimizada⁽⁵⁷⁾.

1.3.2.3.2 Exportação de ânions de AGs

Um outro cenário seria da UCP3 atuando como exportadora de ânions de AGs para o citoplasma, proporcionando proteção à mitocôndria contra o dano induzido pela peroxidação lipídica^(51, 57) (Figura 9).

Para sofrerem β -oxidação, os AGs são ativados pela ação das acil-CoA - sintetases, formando tioésteres (acil-CoA). Embora os AGs de cadeia curta e média atravessem livremente as membranas mitocondriais, o mesmo não ocorre com os AGs de cadeia longa (AGCL), que requerem o ciclo das carnitinas para seu transporte à matriz mitocondrial. Sob condições de elevado fluxo de AGs para dentro da mitocôndria via carnitina palmitoiltransferase 1

(CTP1), o acúmulo excessivo de moléculas acil-CoA seria prejudicial para o funcionamento mitocondrial, pois tais moléculas são fortes surfactantes, gerando dano às membranas; o excessivo sequestro de CoA pelos AGCL inibe a β -oxidação. A regulação positiva da tiosterase mitocondrial permitiria remover o acil-CoA dos AGCL, possibilitando a exportação dos ânions de AGs via UCP3 e o aumento da oxidação lipídica⁽⁴⁹⁾.

FONTE: Adaptado de Garvey WT⁽⁴⁹⁾, 2003.

ABREVIATURAS: AG: ácidos graxos; AG⁻, ânions de ácidos graxos; AGCL, ácidos graxos de cadeia longa; CPTI, carnitina palmitoiltransferase 1; CPTII, carnitina palmitoiltransferase 2; H⁺, hidrogênio; e⁻, elétron; Q, coenzima Q ou ubiquinona; C, citocromo C; UQ, ubesemiquinona; O₂^{•-}, superóxido; H₂O₂, peróxido de hidrogênio; EROs, espécies reativas de oxigênio; SOD, superóxido dismutase; F₀-F₁ ATPase, complexo transmembrana; ADP, adenosina difosfato; ATP, adenosina trifosfato; coA, coenzima A; NAD⁺, dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (oxidado); NADH, dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (reduzido); FAD⁺, dinucleotídeo de flavina e adenina (oxidado); FADH, dinucleotídeo de flavina e adenina (reduzido).

Figura 9 - Potenciais papéis da proteína desacopladora 3 (UCP3). À esquerda, atuando na exportação de ânions de AGs; à direita, via desacoplamento mitocondrial, contribuindo para a redução na formação de EROs pela redução do gradiente eletroquímico mitocondrial

1.3.2.4 Regulação da expressão genética de UCP3

O controle da transcrição da expressão genética das UCPs determina os níveis das proteínas correspondentes nos tecidos e células⁽⁵⁸⁾. Os maiores reguladores da expressão genética de UCP3 no músculo esquelético e no coração são os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR), em especial, os PPAR alfa (PPAR α) e PPAR delta (PPAR δ)^(48, 50).

O aumento de AGLs circulantes, seja pela lipólise (jejum ou exercício) ou pela dieta (rica em gordura), estimula a via dos receptores PPAR α e PPAR δ , induzindo uma maior expressão de UCP3 nos tecidos^(58, 59). Uma menor expressão de UCP3 ocorre em situações em que capacidade oxidativa é melhorada, como após um treinamento de resistência ou redução do peso⁽⁶⁰⁾.

Em modelos animais, foi possível identificar níveis elevados de expressão ectópica de UCP3 no fígado estimulada por uma dieta rica em gordura e/ou pelo uso de fenofibrato^(61, 62). A expressão *de novo* de UCP3 no fígado fornece evidências de que a UCP3 tenha participação na regulação do metabolismo de AGs e no aumento da dissipação de energia mitocondrial, com redução do dano oxidativo, porém, estudos adicionais são necessários para compreender a interferência desses fatores na regulação da expressão de UCP3 em humanos^(61, 62).

1.3.2.5 Implicações metabólicas

Características na disfunção mitocondrial muscular durante o DMT2 incluem altos níveis de peroxidação lipídica, redução do conteúdo mitocondrial e capacidade oxidativa, gerando um ambiente glicolipotóxico^(53, 63).

Estudos indicam níveis reduzidos de RNAm da UCP3 no músculo esquelético de pacientes com DMT2, em comparação com indivíduos controles saudáveis, sugerindo uma correlação positiva entre os níveis de UCP3 no músculo e as taxas de utilização de glicose estimulada por insulina^(51, 53, 64). Postula-se, assim, que maiores níveis de UCP3 poderiam ser protetores contra o desenvolvimento de RI, DMT2 e obesidade^(44, 64, 65) (Figura 10).

FONTE: Adaptado de Busiello RA *et al.*⁽⁴⁴⁾, 2015.

ABREVIATURAS: EROs, espécies reativas de oxigênio; LOOH, hidroperóxidos lipídicos; DMT2, diabetes mellitus tipo 2.

Figura 10 - Possíveis vias e reações influenciadas pela proteína desacopladora 3 (UCP3)

Dentro do contexto da DMT2, obesidade e UCPs, um maior gasto energético, a mobilização de depósitos de lipídios pelo aumento da lipólise e redução da lipogênese e dos níveis circulantes de TG auxiliariam a melhora do

estado inflamatório identificado nos tecidos adiposos de pacientes obesos. Tais fatores poderiam, assim, exercer um efeito protetor contra a DHGNA⁽⁶⁴⁾.

1.3.3 Polimorfismos genéticos do gene UCP3

Diversas variantes genéticas têm sido identificadas no gene UCP3. Entretanto, não é claro se isso acarreta diferenças funcionais na proteína UCP3, haja vista que seus mecanismos de ação seguem em discussão⁽⁴⁴⁾.

No geral, os estudos genéticos sugerem uma possível associação de SNPs do gene UCP3 com fatores e/ou desfechos de implicação metabólica, como gasto energético/funcionalidade muscular, RI, DMT2, HAS, variações no perfil lipídico, peso e/ou IMC, porém, com dados controversos (Tabela 1).

Teoricamente, diferentes variações nos genes candidatos relacionados à SM poderiam contribuir para a patogênese da DHGNA⁽⁶⁶⁾. Pelo impacto metabólico de SNPs da UCP3, alguns estudos foram realizados em pacientes com DHGNA (Tabela 1), porém, com as limitações de uma amostra restrita⁽⁶⁷⁾ ou de englobar apenas uma população pediátrica, com diagnóstico de DHGNA por ultrassonografia (USG)⁽⁶⁶⁾.

Tabela 1 - Estudos de associação de polimorfismos do gene UCP3 com fatores de riscos metabólicos e doença hepática gordurosa não alcoólica

Autores (Ano)	População/ Sujeitos	SNPs	Alelo (risco)	Associações
Van Abeelen <i>et al.</i> ⁽⁵²⁾ (2008)	Holanda 400, homens saudáveis	rs2075577	C	- rs647126, rs1685356, rs2075577: maior IMC - rs1685354: menos gordura visceral
		rs1685354	C	
		rs2632723	G	
		rs1685356	A	
		rs647126	A	
		rs7930460	G	
		rs1800849	T	
Salopuro <i>et al.</i> ⁽⁶⁸⁾ (2009)	Finlândia 507, adultos, sobrepeso: Intervenção (dieta e atividade física) vs cuidado padrão	rs15763	A	- rs3781907-G: maiores colesterol total e LDL, maior risco para DMT2 - Haplótipo 3781907-G, rs11235972-A, rs1800849-T: maiores colesterol total e LDL - Haplótipo AAT: maior redução do LDL (0-3 anos)
		rs1726745	T	
		rs3781907	G	
		rs11235972	A	
		rs1800849	T	
Aller <i>et al.</i> ⁽⁶⁷⁾ (2010)	Espanha	rs1800849	T	- Maior RI, menor adiponectina - Maior frequência de esteatose e inflamação (moderada-grave)
	39, adultos, sobrepeso, DHGNA/biópsia			
Dato <i>et al.</i> ⁽⁶⁹⁾ (2012)	Dinamarca 908, idosos 708, meia idade	rs3781907	G	- rs11235972-A: menor desempenho da FPP, maior taxa de mortalidade (10 anos)
		rs11235972	A	
		rs1685354	G	
		rs647126	A	
Xu <i>et al.</i> ⁽⁶⁶⁾ (2013)	China 250, DHGNA/USG 200, controles 6-16 anos	rs1726745	T	- rs11235972-GG (DHGNA): maior prevalência do genótipo - rs1800849-T (controles): menores valores de altura, cintura e quadril
		rs3781907	G	
		rs11235972	A	
		rs1800849	T	

continua

Tabela 1 - Estudos de associação de polimorfismos do gene UCP3 com fatores de riscos metabólicos e doença hepática gordurosa não alcoólica (conclusão)

Autores (Ano)	População/ Sujeitos	SNPs	Alelo (risco)	Associações
Sun <i>et al.</i> ⁽⁷⁰⁾ (2019)	China 1162, adultos, HAS 1045, adultos sadios	rs3781907	G	- Haplótipo com variantes UCP1/UCP2/UCP3: maior risco para HAS
Cruz ^{(71)*} (2019)	Brasil 159, adultos, 28,3% HAS: 49, homens vs 110, mulheres	rs1800849 rs15763 rs3781907 rs1685354 rs11235972 rs647126	T G G T A A	- Homens: maiores valores de altura, peso e FPP - Ausência de associação entre SNPs e variação da FPP
Domínguez-Cruz <i>et al.</i> ⁽⁷²⁾ (2020)	México 400, adultos, comunidade Maia: DMT2 vs sadios	rs3781907	G	- Maior IMC, mais DMT2

*Tese de doutorado.

ABREVIATURAS: SNPs, polimorfismos de nucleotídeos únicos; IMC, índice de massa corporal; LDL, lipoproteína de baixa densidade; DMT2, diabetes mellitus tipo 2; DHGNA, doença hepática gordurosa não alcoólica; RI, resistência a insulina; FPP, força de preensão palmar; USG, ultrassonografia; HAS, hipertensão arterial sistêmica; UCP, proteína desacopladora.

1.4 Escolha dos polimorfismos do gene UCP3

No presente estudo, foram selecionados 3 SNPs do gene UCP3 rs1726745, rs3781907 e rs11235972 (Figura 11), previamente investigados em estudos relacionados a fatores metabólicos e DHGNA^(66, 68).

FONTE: Adaptado de Van Abeelen AFM *et al.*⁽⁵²⁾, 2008 e Xu YP *et al.*⁽⁶⁶⁾, 2013.

Box cinza: região codificadora; box branco: *untranslated region* – UTR.

Figura 11 - Representação do gene da proteína desacopladora 3 (UCP3) com os polimorfismos selecionados para o estudo

Por meio do Banco de Dados do SNPs (dbSNP) do *National Center for Biotechnology Information* – NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>), foi possível identificar as frequências do menor alelo (MAF) dos SNPs do gene UCP3 selecionados para o presente estudo, conforme dados do projeto *1000 Genomes*, que é uma colaboração internacional que estabelece um catálogo detalhado de variações genéticas humanas, incluindo SNPs, variantes estruturais e seu contexto de haplótipos referentes a 26 populações, de diferentes localizações pelo mundo, agrupadas em 5 superpopulações

continentais: Leste-Asiática, Europeia, Africana, Americana e Sul-Asiática (Tabela 2)⁽⁷³⁾.

Tabela 2 - Distribuição populacional das frequências do menor alelo (MAF) dos polimorfismos rs1726745, rs3781907 e rs11235972 do gene UCP3, conforme o projeto *1000 Genomes*⁽⁷³⁾

População	Amostra	rs1726745 MAF	rs3781907 MAF	rs11235972 MAF
Leste-Asiática	1008	T=0,5794	G=0,3869	A=0,2768
Europeia	1006	T=0,4821	G=0,2684	A=0,2316
Africana	1322	T=0,3275	G=0,2935	A=0,0976
Americana	694	T=0,490	G=0,193	A=0,107
Sul-Asiática	978	T=0,509	G=0,254	A=0,223
Global	5008	T=0,4673	G=0,2855	A=0,1863

Até o presente momento, a potencial ação funcional dos SNPs rs1726745, rs3781907 e rs11235972 do gene UCP3 com a DHGNA e SM ainda não foi elucidada.

1.5 Justificativa

Estudos genéticos são úteis para o entendimento dos mecanismos moleculares relacionados com a patogênese de diversas doenças. Na DHGNA, tendo em vista a associação da doença fibrótica em portadores de DHGNA e o papel do estresse oxidativo nesta evolução, torna-se importante a busca por marcadores genéticos capazes de identificar os indivíduos com maior ou menor risco de progressão de doença⁽⁷⁴⁾.

A possível adaptação da UCP3 ao aumento da oxidação de AGs poderia conferir um benefício teórico na prevenção da esteatose hepática e, por meio do fluxo de elétrons da cadeia respiratória, poderia prevenir a redução de complexos respiratórios e formação excessiva de EROs, protegendo a célula contra a lipoperoxidação, diminuindo a necroinflamação e apoptose^(42, 64).

Os polimorfismos do gene UCP3 têm sido relacionados individualmente com fatores metabólicos em diferentes estudos e populações, porém, sem estudos que avaliem a possível relação entre SNPs do gene UCP3 com a gravidade da DHGNA e SM na população adulta, com uma amostra mais expressiva e o diagnóstico histológico da DHGNA. Desta maneira, idealizamos um estudo em humanos adultos que avalie, de forma transversal, a possível associação entre SNPs do gene UCP3 com a gravidade da DHGNA (esteatose *versus* EHNA) e SM.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar uma população de pacientes com DHGNA quanto à presença de EHNA e SM e avaliar a possível associação dessas condições com a frequência dos genótipos dos SNPs rs1726745, rs3781907 e rs11235972 do gene UCP3.

2.2 Objetivos específicos

- a)** Avaliar a possível associação dos SNPs rs1726745, rs3781907 e rs11235972 do gene UCP3 com a presença de EHNA nos pacientes com DHGNA;
- b)** Avaliar a possível associação dos SNPs rs1726745, rs3781907 e rs11235972 do gene UCP3 com a presença de SM nos pacientes com DHGNA;
- c)** Avaliar a possível associação dos SNPs rs1726745, rs3781907 e rs11235972 do gene UCP3 com as características clínico-laboratoriais nos pacientes com DHGNA;
- d)** Avaliar a possível associação dos SNPs rs1726745, rs3781907 e rs11235972 do gene UCP3 com a gravidade histológica nos pacientes com DHGNA.

3 MÉTODOS

3 MÉTODOS

3.1 Casuística

Foi realizado um estudo transversal, entre 2010 e 2019, que incluiu 158 em pacientes com DHGNA comprovada por biópsia hepática, matriculados no Ambulatório de Doença hepática gordurosa não alcoólica (A2MG700) da Disciplina de Gastroenterologia Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) situado no 5º andar do Prédio dos Ambulatórios do complexo HC-FMUSP.

Os pacientes foram pesquisados e incluídos a partir de um banco de dados do ambulatório A2MG700 do HC-FMUSP, sem necessidade adicional de coletas de sangue e/ou realização de biópsia hepática para fins deste estudo.

O material para análise dos polimorfismos foi obtido do banco de amostras de DNAs armazenado no Laboratório de Gastroenterologia Clínica e Experimental (LIM-07) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP. Este banco advém de pacientes do ambulatório A2MG700 que compareceram para a coleta de exames laboratoriais de rotina e concordaram, de forma livre e espontânea, que seu material/DNA fosse armazenado para futuras pesquisas.

3.2 Considerações Éticas

A dispensa da aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi obtida, pois a seleção dos pacientes ocorreu por meio de um

banco de dados existente do Ambulatório de Doença hepática gordurosa não alcoólica (A2MG700) da Disciplina de Gastroenterologia Clínica do HC-FMUSP, com amostras de DNA armazenadas com autorização prévia dos pacientes no ato da coleta. Este 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 julho de 2017, sob o Parecer 2.160.492 (Anexo A).

3.3 Critérios de inclusão

No estudo foram incluídos os pacientes com as seguintes características:

- Portadores de DHGNA confirmada por achados histológicos obtidos por biópsia hepática;
- Amostras de DNAs armazenadas no Laboratório de Gastroenterologia Clínica e Experimental (LIM-07) da FMUSP para análise dos polimorfismos;
- Idade entre 18 anos e 75 anos (faixa etária vigente no ambulatório A2MG700 do HC-FMUSP; pacientes <18 anos são seguidos pela Pediatria no Instituto da Criança do HC-FMUSP).

3.4 Critérios de exclusão

- Presença de outras etiologias de hepatopatia crônica, como: esquistossomose, hepatites virais, hepatite autoimune, doença de Wilson, deficiência de α -1 antitripsina, hemocromatose, etilismo

significativo (>30 g etanol/dia em homens, >20 g/dia em mulheres e/ou >100 g etanol/semana)⁽¹⁾;

- Uso prévio de medicações esteatogênicas (corticoides, amiodarona, metotrexato, tamoxifeno).

3.5 Coleta de dados

Por meio dos registros dos prontuários do ambulatório A2MG700 do HC-FMUSP, foram obtidos:

- Dados sociodemográficos (idade e gênero);
- Dados clínico-laboratoriais;
- Dados histopatológicos provenientes da biópsia hepática.

3.6 Definição da síndrome metabólica (SM) e resistência à insulina (RI)

Conforme o *National Cholesterol Education Program – Adult Treatment Panel III (NCEP-ATPIII)*⁽⁷⁵⁾, a SM é definida pela presença de 3 ou mais dos componentes: circunferência abdominal >102 cm em homens e >88 cm em mulheres; TG $\geq$ 150 mg/dL; HDL-colesterol <40 mg/dL em homens e <50 mg/dL em mulheres; glicemia de jejum $\geq$ 100 mg/dL ou uso de hipoglicemiante; pressão arterial sistólica $\geq$ 130/85 mmHg ou uso de anti-hipertensivo.

Para avaliação de RI, foi utilizado o *Homeostasis Model Assessment* (HOMA) (glicose de jejum [mg/dL] /18 x insulina de jejum [μ U/mL] /22,5). Foi utilizado como marcador de RI o índice HOMA, quando maior ou igual a 2,5⁽⁷⁵⁾.

3.7 Exames bioquímicos

Os exames bioquímicos foram realizados no Laboratório Central do HC-FMUSP. Tais exames foram indicados na rotina de acompanhamento dos pacientes do ambulatório A2MG700 do HC-FMUSP e efetuados, de forma protocolar, em todos os pacientes submetidos à biópsia hepática, dentro de um período de até 3 meses, anterior ou posterior ao procedimento.

Após jejum de 12 horas, foram realizados: hemograma, lipidograma, coagulograma, proteína total e frações, aspartato aminotransferase (AST), ALT, fosfatase alcalina (FA), gama-glutamil transferase (GGT), bilirrubina total e frações, glicemia, insulina, marcadores para hepatite B e C, autoanticorpos hepáticos, cobre e ceruloplasmina, perfil de ferro, α -1 antitripsina e anticorpos para doença celíaca.

3.8 Polimorfismos do gene UCP3

Os experimentos de biologia molecular dos polimorfismos rs1726745, rs3781907 e rs11235972 do gene UCP3 foram realizados no Laboratório de Carboidratos e Radioimunoensaios (LIM-18) da FMUSP.

3.8.1 Extração de DNA

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 1.500 g durante 5 minutos. 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. Esta lavagem foi repetida quatro vezes, até que o precipitado assumisse coloração esbranquiçada. Em seguida, foram adicionados ao precipitado:

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

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

Foram adicionados ao tubo 10 mL de etanol absoluto gelado, com posterior homogeneização 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 minutos. O precipitado foi ressuspenso em 50 - 500 µL H₂O miliQ estéril e incubado a 37 °C durante 15 minutos. A quantificação do DNA foi determinada por espectrofotometria (NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA). O DNA, assim obtido, foi armazenado à temperatura de -20 °C.

3.8.2 Genotipagem dos polimorfismos rs1726745, rs3781907 e rs11235972 do gene UCP3

Reações em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) foram realizadas no equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) para detecção das variantes alélicas de cada SNP.

Para a preparação da reação, foi utilizado o reagente TaqMan Genotyping Master Mix e TaqMan SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), que contém duas sequências de *primers* específicos para amplificar o polimorfismo de interesse e duas sondas alelo-específicas para detectar os alelos do polimorfismo de interesse. A presença de duas sondas em cada reação permite a genotipagem de duas possíveis variantes do SNP: a sonda do alelo 1 é marcada com o *Reporter* VIC, e a sonda do alelo 2 é marcada com o *Reporter* FAM, que apresentam fluorescências diferentes durante a reação. Os números de identificação dos ensaios para os SNPs estudados foram: C__8751342_10 (rs1726745), C__25800726_10 (rs3781907) e C__25992010_10 (rs11235972).

3.9 Análise histológica

Os fragmentos de tecido hepático foram fixados em solução de formol a 4% e, posteriormente, submetidos às colorações de hematoxilina-eosina, Tricrômico de Masson e Picrosírius. A avaliação histológica foi realizada de maneira cega por um patologista com experiência em patologia hepática. Para a avaliação histológica da DHGNA, foram utilizados o sistema de pontuação dos critérios histológicos para DHGNA (Quadro 1) e o *NAFLD Activity Score* (NAS), definidos pelo *Pathology Committee of the NASH Clinical Research Network (NASH CRN)*⁽⁷⁶⁾. O NAS inclui somente características que são potencialmente reversíveis a curto prazo e é definido pelo somatório dos graus de esteatose (0 a 3), inflamação lobular (0 a 3) e balonização hepatocitária (0 a 2), variando de 0 - 8. Valor de NAS <3 afasta o diagnóstico de EHNA; NAS ≥5

sugere EHNA e, NAS 3 ou 4 é indeterminado entre 3 categorias (ausência, presença e provável EHNA). A fibrose, que é uma característica menos reversível e, geralmente, resultante da atividade da doença, não está incluída como componente do escore de atividade⁽⁷⁶⁾.

Quadro 1 - Critérios histológicos para DHGNA definidos pelo *Pathology Committee of the NASH Clinical Research Network*

Esteatose	Definição
0	<5%
1	5%-33%
2	>33%-66%
3	>66%
Inflamação lobular	Definição
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 hepatocitária	Definição
0	Ausente
1	Poucas células com balonização
2	Muitas células e/ou balonização intensa
Fibrose	Definição
0	Ausente
1	Perisinusoidal ou periportal
1A	Leve, zona 3, perisinusoidal
1B	Moderada, zona 3, perisinusoidal
1C	Portal/periportal
2	Perisinusoidal e portal/periportal
3	Fibrose em ponte
4	Cirrose

FONTE: Adaptado de Kleiner *et al.*⁽⁷⁶⁾, 2005.

INTERPRETAÇÃO: Somatório das pontuações dos 3 critérios: NAS <3, afasta esteato-hepatite não alcoólica (EHNA); NAS 3-4, *borderline* para EHNA; NAS ≥5, EHNA.

3.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP), exceto quando indicado de outra forma. As variáveis contínuas foram log-transformadas para as análises quando a normalidade da distribuição foi rejeitada pelo teste W de Shapiro-Wilk. Foram utilizados os testes de Qui-quadrado de Fisher, ANOVA (análise de variância) e ANCOVA (análise de covariância) para comparações entre os grupos.

As associações com DHGNA e SM foram avaliadas por modelos de regressão. Análises de regressão logística foram utilizadas para análises transversais. *Odds ratios* (OR) com os seus intervalos de confiança (IC) de 95% foram calculados para o menor alelo de cada SNP em um modelo codominante, dominante ou recessivo. Foram realizados ajustes para parâmetros clínicos e biológicos, incluindo-os como covariáveis no modelo regressivo.

A análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi realizada por meio da fórmula $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ (p: frequência do alelo dominante; q: frequência do alelo recessivo; p^2 : frequência do genótipo homozigoto dominante; $2pq$: frequência do genótipo heterozigoto; q^2 : frequência do genótipo homozigoto recessivo) ao nível $\alpha=0,05$; os SNPs que falharam neste teste e não foram utilizados nas análises de associação.

A correção para múltiplas comparações em razão dos múltiplos testes de SNP considerou o número efetivo de testes independentes (Meff) baseados no grau de desequilíbrio de ligação (DL) entre os SNPs. O poder para detectar as associações dos SNPs com a prevalência de SM e EHNA foi 0,20 e 0,25,

respectivamente, para $OR \geq 1,5$ e $\alpha = 0,05$. O valor de $p \leq 0,02$ foi considerado como significativo nas comparações relacionadas ao genótipo. Para as análises não relacionadas aos SNPs, o valor significativo de $p \leq 0,05$ foi aplicado.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os softwares JMP (SAS Institute Inc., Cary, NC), R (<http://www.R-project.org>) e SHEsis (<http://analysis.bio-x.cn/myAnalysis.php>).

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

Entre os anos de 2010 e 2019, 248 pacientes com DHGNA foram inicialmente avaliados, provenientes do Ambulatório de Doença hepática gordurosa não alcoólica (A2MG700) da Disciplina de Gastroenterologia Clínica do HC-FMUSP. Diante da ausência de amostra de DNA no Banco de amostras do Laboratório de Gastroenterologia Clínica e Experimental (LIM-07) da FMUSP (n=58) e/ou ausência de critérios histológicos compatíveis com DHGNA na biópsia hepática (n=32), 90 pacientes foram excluídos. Desta forma, um total de 158 pacientes foram selecionados e genotipados para os polimorfismos rs1726745, rs3781907 e rs11235972 do gene UCP3 e avaliados sob 2 critérios: (1) conforme a presença de EHNA pela biópsia hepática e (2) conforme a presença de SM (Figura 12). Devido a dados incompletos no prontuário relacionados aos critérios diagnósticos para a SM, 3 pacientes foram excluídos desta subanálise.

ABREVIATURAS: EHNA, esteato-hepatite não alcoólica; SM, síndrome metabólica.

Figura 12 - Fluxograma de seleção e categorização dos pacientes com Doença hepática gordurosa não alcoólica no estudo

4.1 Características dos pacientes com DHGNA, conforme a presença de EHNA

A média de idade ($56 \pm 9,5$ vs $53,8 \pm 11,9$ anos; $p=0,43$) foi similar entre os grupos EHNA ($n=138$) e esteatose ($n=20$), assim como a distribuição entre gêneros, com o sexo feminino sendo o mais prevalente em ambos os grupos. Os pacientes com EHNA apresentaram maior frequência de SM (85% vs 63%; $p=0,02$), maior IMC ($32,1 \pm 5,3$ vs $28,6 \pm 5,6$ kg/m²; $p=0,02$) e maiores concentrações de AST ($35,5 \pm 23,4$ vs $26,8 \pm 9,8$ U/L; $p=0,002$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Características demográficas, clínicas e bioquímicas dos pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica de acordo com a presença de esteato-hepatite não alcoólica (EHNA)

Variáveis	EHNA (n=138)	Esteatose (n=20)	p
Idade (anos)	56 ± 9,5	53,8 ± 11,9	0,43
Sexo H/M (%)	27,5/72,5	30/70	0,79
Dislipidemia (%)	74	65	0,43
Diabetes mellitus tipo 2 (%)	63	45	0,15
HAS (%)	70	72	0,84
Síndrome metabólica (%)	85	63	0,02*
IMC (kg/m²)	32,1 ± 5,3	28,6 ± 5,6	0,02*
Glicemia (mg/dL)	117 ± 41	115 ± 45	0,83
Insulina (μU/mL)	19,8 ± 13,4	19,9 ± 29,5	0,08
HOMA-IR	5,8 ± 4,6	6,9 ± 10	0,64
Colesterol total (mg/dL)	195 ± 45	199 ± 43	0,64
LDL (mg/dL)	115 ± 39	111 ± 37	0,63
HDL (mg/dL)	47 ± 14	49 ± 9	0,40
Triglicerídeos (mg/dL)	174 ± 106	190 ± 112	0,56
ALT (U/L)	46,5 ± 31,4	42,7 ± 23,5	0,54
AST (U/L)	35,5 ± 23,4	26,8 ± 9,8	0,002*
GGT (U/L)	82,8 ± 86,0	76,5 ± 91,2	0,77

Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão. Teste T de Student ou Teste U de Mann-Whitney foram aplicados para a análise de variáveis contínuas. Teste W de Shapiro Wilk foi realizado e as variáveis que falharam neste teste foram transformadas em log. Se a normalidade não foi verificada, foram aplicados testes não paramétricos para essas variáveis. *p≤0,05.

ABREVIATURAS: HAS, hipertensão arterial sistêmica; IMC, índice de massa corporal; HOMA-IR, *homeostatic model of assessment*; LDL, lipoproteína de baixa densidade; HDL, lipoproteína de alta densidade; ALT, alanino aminotransferase; AST, aspartato aminotransferase; GGT, gama-glutamil transferase.

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).

4.2 Características dos pacientes com DHGNA, conforme a presença de SM

A prevalência geral de SM foi 82,6% (n=128), com predomínio no sexo feminino em ambos os grupos. A presença de SM mostrou forte associação com dislipidemia ($p=0,0003$), DMT2 ($p<0,0001$), HAS ($p<0,0001$), EHNA ($p=0,01$), IMC ($p<0,0001$), glicemia ($p<0,0001$), insulina ($p=0,0002$) e HOMA-IR ($p<0,0001$) (Tabela 4).

Tabela 4 - Características demográficas, clínicas e bioquímicas dos pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica de acordo com a presença de síndrome metabólica (SM)

Variáveis	Com SM (n=128)	Sem SM (n=27)	p
Idade (anos)	56,6 ± 9,5	52,5 ± 11,1	0,08
Sexo H/M (%)	26/74	37/63	0,23
Dislipidemia (%)	79	44	0,0003*
Diabetes mellitus tipo 2 (%)	71	18,5	<0,0001*
HAS (%)	80	23	<0,0001*
EHNA (%)	90,6	74	0,01*
IMC (kg/m²)	32,5 ± 5,6	27,7 ± 4,8	<0,0001*
Glicemia (mg/dL)	121,8 ± 44,1	95,0 ± 9,9	<0,0001*
Insulina (μU/mL)	21,2 ± 17,1	13,3 ± 5,8	0,0002*
HOMA-IR	6,5 ± 5,83	3,4 ± 1,5	<0,0001*
Colesterol total (mg/dL)	195,7 ± 46,0	191,9 ± 36,9	0,65
LDL (mg/dL)	115,3 ± 39,8	113,5 ± 36,1	0,82
HDL (mg/dL)	46,6 ± 12,2	49,8 ± 18,5	0,41
Triglicerídeos (mg/dL)	181,7 ± 112,6	153,5 ± 69,9	0,11
ALT (U/L)	44,5 ± 29,7	50,8 ± 34,9	0,40
AST (U/L)	35,2 ± 23,6	35,6 ± 17,0	0,33
GGT (U/L)	83,0 ± 85,9	73,5 ± 92,4	0,39

Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão. Teste T de Student ou Teste U de Mann-Whitney foram aplicados para a análise de variáveis contínuas. Teste W de Shapiro Wilk foi realizado e as variáveis que falharam neste teste foram transformadas em log. Se a normalidade não foi verificada, foram aplicados testes não paramétricos para essas variáveis. *p≤0,05.

ABREVIATURAS: HAS, hipertensão arterial sistêmica; EHNA, esteato-hepatite não alcoólica; IMC, índice de massa corporal; HOMA-IR, *homeostatic model of assessment*; LDL, lipoproteína de baixa densidade; HDL, lipoproteína de alta densidade; ALT, alanino aminotransferase; AST, aspartato aminotransferase; GGT, gama-glutamil transferase.

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).

4.3 Distribuição genotípica dos polimorfismos do gene UCP3

Todos os genótipos dos polimorfismos rs1726745, rs3781907 e rs11235972 do gene UCP3 estavam de acordo com o EHW (Tabela 5).

Tabela 5 - Distribuição das frequências dos genótipos e alelos dos polimorfismos do gene UCP3 no presente estudo

SNPs	Genótipos % (n)			Alelos % (n)		EHW p
rs1726745 [#]	CC	CT	TT	C	T	
(n=156)	31,4 (49)	44,9 (70)	23,7 (37)	53,8 (168)	46,2 (144)	0,22
rs3781907	AA	AG	GG	A	G	
(n=158)	59,5 (94)	31,6 (50)	8,9 (14)	75,3 (238)	24,7 (78)	0,06
rs11235972 [#]	GG	GA	AA	G	A	
(n=156)	71,8 (112)	25 (39)	3,2 (5)	84,2 (263)	15,7 (49)	0,49

[#]genotipagem não foi obtida em dois indivíduos.

Representação dos genótipos: maior/menor alelos.

ABREVIATURAS: UCP3, proteína desacopladora 3; SNPs, polimorfismos de nucleotídeos únicos; EHW, equilíbrio de Hardy-Weinberg.

4.4 Análises individuais dos polimorfismos do gene UCP3

4.4.1 De acordo com a presença de EHNA e SM

Os polimorfismos foram avaliados conforme a categorização da amostra (Figura 12). Não houve associação dos SNPs com esteatose ou EHNA (Tabela 6), entretanto, quanto à presença de SM (Tabela 7), o genótipo TT do rs1726745 foi protetor para SM (OR=0,18; IC 95%=0,05-0,61; p=0,006).

Tabela 6 - Frequências dos genótipos dos polimorfismos do gene UCP3, de acordo com a presença de esteato-hepatite não alcoólica (EHNA)

UCP3 SNPs 5'→3'	EHNA (n=138)	Esteatose (n=20)	OR (IC 95%)	p
rs11235972			1,03 (0,38 – 3,40)	0,95
GG	0,728 (99)	0,650 (13)		
GA	0,235 (32)	0,350 (7)		
AA	0,037 (5)	0,000 (0)		
MAF	0,154	0,175		
rs3781907			1,16 (0,48 – 3,10)	0,75
AA	0,601 (83)	0,550 (11)		
AG	0,312 (43)	0,350 (7)		
GG	0,087 (12)	0,100 (2)		
MAF	0,244	0,275		
rs1726745			0,57 (0,24 – 1,28)	0,18
CC	0,321 (44)	0,263 (5)		
CT	0,453 (61)	0,421 (9)		
TT	0,226 (31)	0,316 (6)		
MAF	0,452	0,526		

OR (*odds ratio*) para o menor alelo em um modelo codominante obtido por análise de regressão logística ajustada para sexo, idade, DMT2, HAS, AST e HOMA-IR. *p≤0,02.

ABREVIATURAS: UCP3, proteína desacopladora 3; SNPs, polimorfismos de nucleotídeos únicos; IC, intervalo de confiança; MAF, frequência do menor alelo.

Tabela 7 - Frequências dos genótipos dos polimorfismos do gene UCP3, de acordo com a presença de síndrome metabólica (SM)

UCP3 SNPs 5'→3'	Com SM (n=128)	Sem SM (n=27)	OR (IC 95%)	p
rs11235972			–**	0,99
GG	0,706 (90)	0,815 (22)		
GA	0,254 (33)	0,185 (5)		
AA	0,040 (5)	0,000 (0)		
MAF	0,167	0,092		
rs3781907			0,51 (0,05 – 3,88)	0,52
AA	0,609 (78)	0,556 (15)		
AG	0,313 (40)	0,333 (9)		
GG	0,078 (10)	0,111 (3)		
MAF	0,234	0,277		
rs1726745			0,18 (0,05 – 0,61)	0,006*
CC	0,323 (41)	0,231 (6)		
CT	0,472 (60)	0,346 (10)		
TT	0,205 (27)	0,423 (11)		
MAF	0,441	0,596		

OR (*odds ratio*) para o menor alelo em um modelo recessivo obtido por análise de regressão logística ajustada para sexo, idade, DMT2 e dislipidemia. * $p \leq 0,02$.

**Não foi possível calcular o OR [2428148 (9,9x10¹⁵ – -)] devido a ausência de genótipo AA entre indivíduos sem SM.

ABREVIATURAS: UCP3, proteína desacopladora 3; SNPs, polimorfismos de nucleotídeos únicos; IC, intervalo de confiança; MAF, frequência do menor alelo.

4.4.2 De acordo com as características clínico-laboratoriais

O alelo T do SNP rs1726745, em homozigose, associou-se com menores valores de IMC na amostral geral [CX=31,53 $\pm$ 0,56 vs TT=29,21 $\pm$ 0,84 kg/m²; média $\pm$ erro padrão da média (EPM); p=0,01] e no grupo EHNA (CX=31,86 $\pm$ 0,61 vs TT=29,65 $\pm$ 0,95 kg/m²; média $\pm$ EPM; p=0,02) vs grupo esteatose (CX=28,52 $\pm$ 1,56 vs TT=27,21 $\pm$ 2,05 kg/m²; média $\pm$ EPM; p=0,65), conforme os dados do Gráfico 1.

Gráfico 1 - Representação da associação do alelo T (CX vs TT) do polimorfismo rs1726745 do gene UCP3 com o índice de massa corporal (IMC) na amostra geral (A) e no grupo esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) (B). *p $\leq$ 0,02

Em relação às variáveis bioquímicas, a presença do alelo T do SNP rs1726745 associou-se com menores valores de AST ($p=0,001$), ALT ($p=0,0002$), TG ($p=0,01$) e colesterol total ($p=0,02$) na amostra geral (Tabela 8). Na comparação entre grupos, houve menores valores de aminotransferases estritamente nos indivíduos com EHNA (AST, $p=0,002$; ALT, $p=0,0007$; vs esteatose) e com SM (AST, $p=0,002$; ALT, $p=0,001$; vs sem SM) e, menores valores de TG nos indivíduos com EHNA ($p=0,02$; vs esteatose) (Tabela 8).

A presença do alelo G do SNP rs3781907 associou-se a menores valores de GGT ($p=0,002$) na amostra geral e, especialmente, nos indivíduos com EHNA ($p=0,004$; vs esteatose) e com SM ($p=0,003$; vs sem SM) (Tabela 9). Da mesma forma, o alelo A do SNP rs11235972 associou-se a menores valores de GGT ($p=0,006$) na amostra geral e nos grupos com EHNA ($p=0,01$; vs esteatose) e com SM ($p=0,05$; vs sem SM) (Tabela 10).

Tabela 8 - Associações entre genótipos do polimorfismo rs1726745 do gene UCP3 e variáveis bioquímicas

Variáveis	SNP rs1726745		p
	CC média ± EPM (n)	XT (CT + TT) média ± EPM (n)	
AST (U/L)	43,6 ± 3,5 (49)	30,7 ± 2,5 (107)	0,001*
Esteatose	25,3 ± 12,9 (5)	23,55 ± 6,4 (14)	0,67
EHNA	45,0 ± 3,6 (44)	31,6 ± 2,6 (93)	0,002*
Sem SM	52,5 ± 11,3 (8)	33,1 ± 5,9 (21)	0,20
Com SM	42,4 ± 3,7 (41)	30,1 ± 2,8 (86)	0,002*
ALT (U/L)	61,3 ± 4,3	41,3 ± 3,3	0,0002*
Esteatose	57,1 ± 16,9	36,5 ± 8,4	0,22
EHNA	61,6 ± 4,7	42,0 ± 3,5	0,0007*
Sem SM	88,7 ± 14,6	43,4 ± 7,6	0,05
Com SM	58,0 ± 4,8	40,6 ± 3,6	0,001*
Triglicerídeos (mg/dL)	216,1 ± 16,9	162,7 ± 12,1	0,01*
Esteatose	289,4 ± 62,8	171,2 ± 31,0	0,11
EHNA	210,8 ± 17,5	161,9 ± 12,8	0,02*
Sem SM	190,2 ± 54,6	122,5 ± 28,3	0,14
Com SM	221,1 ± 18	172,4 ± 13,6	0,04
Colesterol total (mg/dL)	208,1 ± 6,9	188,5 ± 5,0	0,02*
Esteatose	235,1 ± 25,7	188,0 ± 12,7	0,12
EHNA	206,2 ± 7,1	188,7 ± 5,3	0,05
Sem SM	191,7 ± 22,3	173,7 ± 11,6	0,37
Com SM	210,7 ± 7,4	192,1 ± 5,5	0,04
GGT (U/L)	69,4 ± 0,13	52,9 ± 0,10	0,08
Esteatose	56,2 ± 0,29	45,2 ± 0,17	0,51
EHNA	73,8 ± 0,15	56,3 ± 0,11	0,13
Sem SM	67,7 ± 0,44	46,7 ± 0,23	0,43
Com SM	70,1 ± 0,14	54,5 ± 0,11	0,13

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM), com comparações feitas por ANCOVA, ajustadas para sexo, idade, IMC e DMT2. *p≤0,02.

ABREVIATURAS: UCP3, proteína desacopladora 3; SNP, polimorfismo de nucleotídeo único; EHNA, esteato-hepatite não alcoólica; SM, síndrome metabólica; GGT, gama-glutamyl transferase.

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).

Tabela 9 - Associações entre genótipos do polimorfismo rs3781907 do gene UCP3 e variáveis bioquímicas

Variáveis	SNP rs3781907		p
	AA média ± EPM (n)	XG (AG + GG) média ± EPM (n)	
AST (U/L)	31,6 ± 0,07 (94)	29,0 ± 0,08 (64)	0,39
Esteatose	25,9 ± 0,13 (11)	23,7 ± 0,13 (9)	0,64
EHNA	33,9 ± 0,07 (83)	32,5 ± 0,09 (55)	0,72
Sem SM	34,5 ± 0,18 (16)	31,3 ± 0,19 (14)	0,69
Com SM	31,04 ± 0,07 (78)	28,5 ± 0,09 (50)	0,43
ALT (U/L)	40,8 ± 0,07	37,1 ± 0,09	0,41
Esteatose	35,4 ± 0,15	32,8 ± 0,15	0,73
EHNA	42,7 ± 0,09	39,8 ± 0,11	0,60
Sem SM	41,0 ± 0,20	43,9 ± 0,22	0,81
Com SM	40,5 ± 0,08	35,7 ± 0,10	0,30
Triglicerídeos (mg/dL)	160,5 ± 0,05	156,3 ± 0,06	0,75
Esteatose	163,2 ± 0,11	177,0 ± 0,11	0,60
EHNA	158,7 ± 0,06	146,3 ± 0,08	0,40
Sem SM	137,7 ± 0,14	128,5 ± 0,15	0,73
Com SM	165,8 ± 0,06	164,1 ± 0,07	0,90
Colesterol total (mg/dL)	186,7 ± 0,03	190,7 ± 0,03	0,60
Esteatose	191,5 ± 0,05	190,5 ± 0,05	0,94
EHNA	185,3 ± 0,03	190,6 ± 0,04	0,55
Sem SM	170,3 ± 0,07	179,5 ± 0,07	0,60
Com SM	190,1 ± 0,03	193,7 ± 0,04	0,67
GGT (U/L)	95,2 ± 9,5	57,9 ± 11,4	0,002*
Esteatose	69,0 ± 26,9	57,5 ± 31,5	0,74
EHNA	98,3 ± 10,0	58,3 ± 12,0	0,004*
Sem SM	65,8 ± 25,0	57,8 ± 26,8	0,52
Com SM	100,8 ± 10,5	58,4 ± 12,8	0,003*

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM), com comparações feitas por ANCOVA, ajustadas para sexo, idade, IMC e DMT2. *p≤0,02.

ABREVIATURAS: UCP3, proteína desacopladora 3; SNP, polimorfismo de nucleotídeo único; EHNA, esteato-hepatite não alcoólica; SM, síndrome metabólica; GGT, gama-glutamil transferase.

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).

Tabela 10 - Associações entre genótipos do polimorfismo rs11235972 do gene UCP3 e variáveis bioquímicas

Variáveis	SNP rs11235972		p
	GG média ± EPM (n)	XA (GA + AA) média ± EPM (n)	
AST (U/L)	31,4 ± 0,06 (112)	29,0 ± 0,10 (44)	0,47
Esteatose	24,3 ± 0,11 (99)	26,0 ± 0,15 (37)	0,71
EHNA	34,4 ± 0,07 (13)	31,4 ± 0,12 (7)	0,48
Sem SM	33,2 ± 0,15 (23)	35,2 ± 0,33 (7)	0,87
Com SM	30,9 ± 0,07 (89)	28,5 ± 0,10 (37)	0,49
ALT (U/L)	39,8 ± 0,06	39,2 ± 0,11	0,90
Esteatose	33,4 ± 0,13	36,1 ± 0,18	0,72
EHNA	43,4 ± 0,08	41,5 ± 0,14	0,89
Sem SM	42,3 ± 0,17	50,9 ± 0,38	0,66
Com SM	39,1 ± 0,08	38,2 ± 0,12	0,86
Triglicerídeos (mg/dL)	160,5 ± 0,05	156,3 ± 0,08	0,77
Esteatose	162,7 ± 0,10	184,3 ± 0,013	0,43
EHNA	159,0 ± 0,06	141,8 ± 0,10	0,30
Sem SM	134,1 ± 0,12	132,8 ± 0,3	0,97
Com SM	168,3 ± 0,06	159,4 ± 0,08	0,57
Colesterol total (mg/dL)	189,5 ± 0,02	185,9 ± 0,04	0,66
Esteatose	193,2 ± 0,05	187,6 ± 0,06	0,71
EHNA	188,2 ± 0,03	184,7 ± 0,05	0,73
Sem SM	173,8 ± 0,05	181,0 ± 0,13	0,78
Com SM	192,7 ± 0,03	186,7 ± 0,04	0,43
GGT (U/L)	93,0 ± 9,7	61,2 ± 14,2	0,006*
Esteatose	87,3 ± 25	59,5 ± 33,0	0,38
EHNA	93,8 ± 10,3	61,7 ± 15,4	0,01*
Sem SM	62,3 ± 21,1	47,0 ± 48,1	0,48
Com SM	95,7 ± 10,0	59,2 ± 14,8	0,005*

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM), com comparações feitas por ANCOVA, ajustadas para sexo, idade, IMC e DMT2. *p≤0,02.

ABREVIATURAS: UCP3, proteína desacopladora 3; SNP, polimorfismo de nucleotídeo único; EHNA, esteato-hepatite não alcoólica; SM, síndrome metabólica; GGT, gama-glutamyl transferase.

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).

4.4.3 De acordo com as variáveis histológicas

Na amostra geral, a distribuição da fibrose encontrada foi: fibrose 0 (F0=43), fibrose 1 (F1=56), fibrose 2 (F2=26), fibrose 3 (F3=26) e fibrose 4 (F4=7).

Em relação aos polimorfismos do gene UCP3, a presença do alelo A do rs11235972 associou-se com a ausência de fibrose (OR=0,34; IC 95%=0,14-0,80; p=0,01) (Tabela 11) e proteção contra fibrose avançada (OR=0,17; IC 95%=0,03-0,56; p=0,01) (Tabela 12). O alelo G do rs3781907 também se mostrou protetor contra fibrose avançada (OR=0,25; IC 95%=0,08-0,69; p=0,01) (Tabela 12).

Tabela 11 - Frequências dos genótipos dos polimorfismos do gene UCP3, de acordo com a presença e ausência de fibrose hepática

UCP3 SNPs 5'→3'	Com fibrose (n=115)	Sem fibrose (n=43)	OR (IC 95%)	p
rs11235972			0,34 (0,14 – 0,80)	0,01*
GG	0,759 (86)	0,605 (26)		
GA	0,205 (23)	0,372 (16)		
AA	0,036 (4)	0,023 (1)		
MAF	0,138	0,209		
rs3781907			0,44 (0,19 – 0,98)	0,05
AA	0,640 (74)	0,489 (21)		
AG	0,281 (32)	0,395 (17)		
GG	0,079 (9)	0,116 (5)		
MAF	0,219	0,313		
rs1726745			0,85 (0,34 – 2,03)	0,72
CC	0,316 (36)	0,293 (13)		
CT	0,420 (48)	0,522 (22)		
TT	0,254 (29)	0,195 (8)		
MAF	0,464	0,456		

OR (*odds ratio*) para o menor alelo em um modelo dominante obtido por análise de regressão logística, ajustada para sexo, idade, dislipidemia, SM e HOMA-IR. * $p \leq 0,02$.

ABREVIATURAS: UCP3, proteína desacopladora 3; SNPs, polimorfismos de nucleotídeos únicos; IC, intervalo de confiança; MAF, frequência do menor alelo.

Tabela 12 - Frequências dos genótipos dos polimorfismos do gene UCP3, de acordo com a presença de fibrose hepática avançada (F3-F4)

UCP3 SNPs 5'→3'	F3-F4 (n=33)	F0-F2 (n=125)	OR (IC 95%)	p
rs11235972			0,17 (0,03 – 0,56)	0,01*
GG	0,818 (27)	0,691 (85)		
GA	0,182 (6)	0,268 (33)		
AA	0,000 (0)	0,041 (5)		
MAF	0,091	0,175		
rs3781907			0,25 (0,08 – 0,69)	0,01*
AA	0,697 (23)	0,568 (71)		
AG	0,242 (8)	0,336 (42)		
GG	0,061 (2)	0,096 (12)		
MAF	0,182	0,264		
rs1726745			1,28 (0,49 – 3,53)	0,61
CC	0,303 (10)	0,317 (39)		
CT	0,333 (11)	0,480 (59)		
TT	0,364 (12)	0,203 (25)		
MAF	0,530	0,443		

OR (*odds ratio*) para o menor alelo em um modelo dominante obtido por análise de regressão logística, ajustada para sexo, idade, dislipidemia, SM e HOMA-IR. * $p \leq 0,02$.

ABREVIATURAS: UCP3, proteína desacopladora 3; SNPs, polimorfismos de nucleotídeos únicos; IC, intervalo de confiança; MAF, frequência do menor alelo.

Considerando-se a presença de fibrose significativa ($F \geq 2$), critérios histológicos para EHNA (esteatose, inflamação lobular, balonização hepatocitária) e escore NAS, não houve associação dessas variáveis com os genótipos dos SNPs rs1726745, rs3781907 e rs11235972 no presente estudo, conforme demonstrado nos dados das Tabelas 13, 14 e 15.

Tabela 13 - Caracterização das variáveis histológicas dos pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica de acordo com os genótipos do polimorfismo rs1726745 do gene UCP3

Variáveis		CC (n=49) % (n)	CT (n=70) % (n)	TT (n=37) % (n)	p
Grupo Esteatose		10,2 (5)	11,4 (8)	16,2 (6)	0,68
Grupo EHNA		89,8 (44)	88,6 (62)	83,8 (31)	0,69
SM		87,3 (41)	87,0 (60)	70,3 (26)	0,06
NAS		4,8 ± 1,6	4,8 ± 1,5	4,5 ± 1,9	0,74
NAS ≥ 4		81,6 (40)	80 (56)	73,0 (27)	0,59
NAS ≥ 5		53,1 (27)	64,3 (45)	56,7 (21)	0,45
Esteatose	1	26,5 (13)	28,6 (20)	21,6 (8)	0,81
	2	38,8 (19)	40,0 (28)	35,1 (14)	
	3	34,7 (17)	31,4 (22)	43,2 (16)	
Inflamação	1	55,1 (27)	50,0 (35)	51,4 (19)	0,75
	2	24,5 (12)	31,4 (22)	27,0 (10)	
	3	8,16 (4)	8,6 (6)	2,7 (1)	
Balonização	1	36,7 (18)	34,3 (24)	45,9 (17)	0,36
	2	49,0 (24)	52,8 (37)	32,4 (12)	
Fibrose	0/1	57,1 (28)	67,1 (47)	59,5 (22)	0,50
	2/4	42,9 (21)	32,9 (23)	40,5 (15)	

Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão para NAS (One Way Anova). Teste qui-quadrado de Pearson foi aplicado para a análise das demais variáveis. * $p \leq 0,05$.

ABREVIATURAS: UCP3, proteína desacopladora 3; EHNA, esteato-hepatite não alcoólica; SM, síndrome metabólica; NAS, *NAFLD Activity Score*.

Tabela 14 - Caracterização das variáveis histológicas dos pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica de acordo com os genótipos do polimorfismo rs3781907 do gene UCP3

Variáveis		AA (n=94) % (n)	AG (n=50) % (n)	GG (n=14) % (n)	p
Grupo Esteatose		11,7 (11)	14,0 (7)	14,3 (2)	0,91
Grupo EHNA		88,3 (83)	86,0 (43)	85,7 (12)	0,91
SM		83,9 (78)	81,6 (40)	76,9 (10)	0,43
NAS		4,9 ± 1,7	4,4 ± 1,4	4,5 ± 1,7	0,14
NAS ≥ 4		79,8 (75)	76,0 (38)	78,5 (11)	0,87
NAS ≥ 5		61,7 (58)	56,0 (26)	50,0 (7)	0,63
Esteatose	1	25,5 (24)	22 (11)	42,9 (6)	0,18
	2	34,1 (32)	50,0 (25)	35,7 (5)	
	3	40,4 (38)	28,0 (14)	21,4 (3)	
Inflamação	1	47,9 (45)	29,8 (28)	8,5 (8)	0,87
	2	58,0 (29)	24,0 (12)	4,0 (2)	
	3	57,1 (8)	28,6 (4)	7,1 (1)	
Balonização	1	34,0 (32)	44,0 (22)	35,7 (5)	0,80
	2	50,0 (47)	40,0 (20)	50,0 (7)	
Fibrose	0/1	59,6 (56)	68,0 (34)	64,3 (9)	0,60
	2/4	40,4 (38)	32,0 (16)	35,7 (5)	

Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão para NAS (One Way Anova). Teste qui-quadrado de Pearson foi aplicado para a análise das demais variáveis. *p≤0,05.

ABREVIATURAS: UCP3, proteína desacopladora 3; EHNA, esteato-hepatite não alcoólica; SM, síndrome metabólica; NAS, *NAFLD Activity Score*.

Tabela 15 - Caracterização das variáveis histológicas dos pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica de acordo com os genótipos do polimorfismo rs11235972 do gene UCP3

Variáveis		GG (n=112) % (n)	GA (n=39) % (n)	AA (n=5) % (n)	p
Grupo Esteatose		11,6 (13)	17,9 (7)	0,0 (0)	0,40
Grupo EHNA		88,4 (99)	82,1 (32)	100,0 (5)	0,40
SM		80,2 (89)	86,5 (32)	100,0 (5)	0,40
NAS		4,9 ± 1,7	4,3 ± 1,5	5,2 ± 1,3	0,19
NAS ≥ 4		78,6 (88)	74,4 (29)	100 (5)	0,42
NAS ≥ 5		61,6 (69)	53,8 (21)	60,0 (3)	0,73
Esteatose	1	27,7 (31)	20,5 (8)	40,0 (2)	0,21
	2	33,9 (38)	53,9 (21)	20,0 (1)	
	3	38,4 (43)	25,6 (10)	40,0 (2)	
Inflamação	1	44,6 (50)	69,2 (27)	60,0 (3)	0,15
	2	32,1 (36)	17,9 (7)	20,0 (1)	
	3	8,0 (9)	2,6 (1)	20,0 (1)	
Balonização	1	34,8 (39)	41,0 (16)	40,0 (2)	0,91
	2	49,1 (55)	41,0 (16)	60,0 (3)	
Fibrose	0/1	61,6 (69)	64,1 (25)	60,0 (3)	0,77
	2/4	38,4 (43)	35,9 (14)	40,0 (2)	

Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão para NAS (One Way Anova). Teste qui-quadrado de Pearson foi aplicado para a análise das demais variáveis. *p≤0,05.

ABREVIATURAS: UCP3, proteína desacopladora 3; EHNA, esteato-hepatite não alcoólica; SM, síndrome metabólica; NAS, *NAFLD Activity Score*.

4.5 Desequilíbrio de ligação

No presente estudo, a avaliação do DL pela medida r^2 identificou um baixo DL entre os SNPs rs1726745, rs3781907 e rs11235972 do gene UCP3, conforme dados da Figura 13.

ABREVIATURA: kB, kilobytes.

Figura 13 - Desequilíbrio de ligação (métrica r^2) entre os SNPs do gene UCP3, representado pelo mapa de calor (*heatmap*). A cor vermelha representa um forte DL

4.6 Análise dos haplótipos dos polimorfismos do gene UCP3

De acordo com a presença de EHNA, o haplótipo TAA (rs1726745, rs3781907, rs11235972) foi protetor contra EHNA (OR=0,01; IC 95%=0,00-0,12; p=0,002) (Tabela 16). Em relação à presença de SM, o haplótipo TGG foi protetor contra SM (OR=0,22; IC 95%=0,07-0,69; p=0,01) (Tabela 17).

Tabela 16 - Análise de haplótipos dos polimorfismos do gene UCP3, de acordo com a presença de esteato-hepatite não alcoólica (EHNA)

Haplótipos	EHNA (n=138)	Esteatose (n=20)	OR (IC 95%) para EHNA	p
CAG	0,33	0,24	1,64 (0,75 – 3,59)	0,37
CGG	0,07	0,08	0,91 (0,26 – 3,23)	0,87
CGA	0,14	0,10	1,40 (0,47 – 4,14)	0,77
TAG	0,41	0,39	1,14 (0,57 – 2,25)	0,83
TGG	0,03	0,10	0,30 (0,09 – 1,03)	0,10
TAA	0,00	0,04	0,01 (0,00 – 0,12)	0,002*

Haplótipos representam os alelos de rs1726745, rs3781907 e rs11235972, respectivamente. Odds ratio (OR) e intervalo de confiança (IC) de 95% para EHNA para cada haplótipo. Valor de p ajustado para taxa de falsa descoberta (FDR), usando Benjamini-Hochberg. *p≤0,02.

Tabela 17 - Análise de haplótipos dos polimorfismos do gene UCP3 de acordo com a presença de síndrome metabólica (SM)

Haplótipos	Com SM (n=128)	Sem SM (n=27)	OR (IC 95%) para SM	p
CAG	0,34	0,21	1,93 (0,95 – 3,96)	0,11
CGG	0,06	0,10	0,65 (0,23 – 1,87)	0,42
CGA	0,14	0,08	1,98 (0,67 – 5,82)	0,29
TAG	0,41	0,48	0,75 (0,42 – 1,36)	0,41
TGG	0,03	0,11	0,22 (0,07 – 0,69)	0,01*

Haplótipos representam os alelos de rs1726745, rs3781907 e rs11235972, respectivamente. Odds ratio (OR) e intervalo de confiança (IC) de 95% para SM para cada haplótipo. Valor de p ajustado para taxa de falsa descoberta (FDR), usando Benjamini-Hochberg. *p≤0,02.

Nenhum dos haplótipos se associou com ausência vs presença de fibrose hepática ou com a presença de fibrose avançada (F3-F4), conforme os dados das Tabelas 18 e 19.

Tabela 18 - Análise de haplótipos dos polimorfismos do gene UCP3 de acordo com a presença ou ausência de fibrose hepática

Haplótipos	Com fibrose (n=115)	Sem fibrose (n=43)	OR (IC 95%) para fibrose	p
CAG	0,34	0,26	1,55 (0,88 – 2,72)	0,30
CGG	0,12	0,16	0,79 (0,39 – 1,60)	0,51
CGA	0,06	0,10	0,59 (0,23 – 1,47)	0,42
TAG	0,43	0,38	1,29 (0,77 – 2,15)	0,42
TGG	0,04	0,06	0,59 (0,19 – 1,85)	0,42

Haplótipos representam os alelos de rs1726745, rs3781907 e rs11235972, respectivamente. *Odds ratio* (OR) e intervalo de confiança (IC) de 95% para presença de fibrose para cada haplótipo. Valor de p ajustado para taxa de falsa descoberta (FDR), usando Benjamini-Hochberg. *p≤0,02.

Tabela 19 - Análise de haplótipos dos polimorfismos do gene UCP3 de acordo com a presença de fibrose hepática avançada (F3-F4)

Haplótipos	F3-F4 (n=33)	F0-F2 (n=125)	OR (IC 95%) para F3-F4	p
CAG	0,35	0,31	1,25 (0,70 – 2,21)	0,45
CGG	0,09	0,14	0,61 (0,24 – 1,53)	0,41
CGA	0,03	0,08	0,36 (0,08 – 1,58)	0,36
TAG	0,47	0,40	1,42 (0,82 – 2,45)	0,36
TGG	0,06	0,04	1,73 (0,51 – 5,79)	0,43

Haplótipos representam os alelos de rs1726745, rs3781907 e rs11235972, respectivamente. *Odds ratio* (OR) e intervalo de confiança (IC) de 95% para fibrose avançada para cada haplótipo. Valor de p ajustado para taxa de falsa descoberta (FDR), usando Benjamini-Hochberg. *p≤0,02.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, investigamos a possível associação de polimorfismos do gene UCP3 com a EHNA e SM em indivíduos adultos com DHGNA. Ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avaliou esta associação na população brasileira, com o criterioso diferencial do diagnóstico histológico da DHGNA.

Atualmente, estima-se uma prevalência global da DHGNA (diagnosticada por imagem) de 25,24% e, uma prevalência global de EHNA (diagnóstico histológico) de 59,10%, variando entre 60,64% e 69,25% em pacientes com DHGNA com indicação de biópsia (elevação de enzimas hepáticas, sinais clínicos de doença hepática ou avaliação retrospectiva de biópsia de centros de cuidados terciários) e, prevalência reduzida (6,67%) em pacientes sem indicação de biópsia (com base no desenho do estudo: oferecida a todos com DHGNA ou por seleção randomizada)⁽⁷⁷⁾. De forma semelhante, nosso estudo identificou uma elevada frequência de EHNA (87,3%), condizente com o perfil de pacientes com DHGNA provenientes de centro terciário e com indicação clínica de biópsia hepática. A média de idade ($53,8 \pm 11,9$ vs $56 \pm 9,5$ anos; $p=0,43$) foi similar entre os grupos esteatose e EHNA, assim como o padrão de distribuição entre gêneros, com o sexo feminino sendo mais prevalente em ambos os grupos. Tal achado é condizente com Lonardo *et al.*⁽⁷⁸⁾ (2019), que reportam maiores prevalência e incidência da DHGNA em mulheres após a menopausa ($\geq$ idade 50-60 anos), possivelmente,

pela perda do efeito protetor estrogênico contra a DHGNA, mudança no padrão de adiposidade regional e maior risco de SM.

Conforme esperado, a forte associação entre a DHGNA e componentes da SM foi observada neste estudo^(1-4, 79). A SM teve uma prevalência geral de 82,6%, predominando no grupo EHNA (85% vs 63%). De forma similar, a prevalência de EHNA foi maior nos portadores de SM (90,6% vs 74%). Tais achados não permitem definir se a DHGNA/EHNA é uma causa ou consequência da SM, mas reforçam a possível associação bidirecional com recíproca causalidade entre as duas condições^(10, 11). Cerca de 44% dos genes associados com os componentes da SM (aproximadamente, 14% com DMT2, obesidade e HAS combinados) estão compartilhados com a DHGNA e ambas as condições dependem não somente de fatores genéticos, mas também dos ambientais e da interação entre os dois⁽³⁴⁾.

Recentemente, um painel internacional de especialistas de 22 países⁽⁸⁰⁾ propôs a redefinição de critérios para a DHGNA associada com disfunção metabólica, incluindo a mudança da nomenclatura para doença hepática gordurosa associada à disfunção metabólica (MAFLD), de forma que os critérios propostos para o diagnóstico positivo de MAFLD baseiem-se na evidência histológica, por imagem ou por biomarcador sérico de esteatose hepática, em adição a um de três critérios: sobrepeso/obesidade, DMT2 ou evidência de desregulação metabólica⁽⁷⁹⁻⁸¹⁾. No presente estudo, mantivemos os critérios e a denominação de DHGNA, esteatose e EHNA, haja vista que o início da coleta e análise dos dados ocorreu em 2017 e, por meio da classificação histológica de Kleiner⁽⁷⁶⁾, escore NAS e graduação da fibrose, foi

possível avaliarmos criteriosamente os pacientes, além da classificação dicotômica esteatose vs EHNA. A progressão da doença em si, pelo caráter do estudo transversal, não pôde ser avaliada.

Na avaliação individual dos polimorfismos rs1726745, rs3781907 e rs11235972 do gene UCP3 com risco para esteatose ou EHNA, nosso estudo não identificou nenhuma associação. Contudo, na análise de haplótipos, o haplótipo TAA (rs1726745, rs3781907, rs11235972) mostrou-se protetor para a EHNA. Os SNPs (bialélicos), por vezes, capturam pouca informação sobre a variabilidade genética em determinadas regiões do genoma^(82, 83), enquanto que os haplótipos (multialélicos) apresentam uma maior possibilidade de detectar alterações fenotípicas em relação a SNPs isolados, fornecendo uma análise mais informativa e efetiva^(82, 83). Esse resultado também pode estar relacionado à patogênese multifatorial da DHGNA e seu comportamento poligênico^(23, 29). De acordo com a teoria dos múltiplos *hits*, a interação entre múltiplos insultos - RI, hormônios secretados pelo tecido adiposo, fatores nutricionais, MI e fatores genéticos - contribui para o desenvolvimento da DHGNA e progressão para EHNA⁽¹⁷⁻¹⁹⁾, sendo de difícil caracterização a existência de um fator genético específico⁽¹³⁾.

Na literatura, existem poucos estudos sobre os polimorfismos do gene UCP3 e DHGNA. Xu *et al.*⁽⁶⁶⁾ (2013) descreveram uma maior prevalência do genótipo GG do rs11235972 do gene UCP3 em pacientes pediátricos com DHGNA e, na análise de haplótipos de polimorfismos do gene UCP3 (rs1800849, rs11235972, rs3781907 e rs1726745), nenhuma associação significativa foi identificada⁽⁶⁶⁾. Diante da relevância clínica como fator protetor

contra EHNA, apesar de sua baixa frequência, o haplótipo TAA (rs1726745, rs3781907, rs11235972) foi considerado em nossa análise.

Em relação à SM, a análise dos polimorfismos rs1726745, rs3781907 e rs11235972 do gene UCP3 identificou o genótipo TT do rs1726745 (análise individual) e o haplótipo TGG (rs1726745, rs3781907, rs11235972) como protetores para a SM. Nosso resultado está em concordância com o defendido por Groop⁽⁸⁴⁾ (2000), que considerou, dentre os principais genes que contribuem para a SM e para a regulação da lipólise e/ou termogênese, o gene da UCP3 como um atrativo candidato. Entretanto, Meirhaeghe *et al.*⁽⁸⁵⁾ (2005) e de Luis *et al.*⁽⁸⁶⁾ (2012) não identificaram associação significativa entre um SNP do gene UCP3 (rs1800849) e SM, como entidade. Consideramos plausível uma possível redução no risco global da SM pela interação individual dos SNPs do gene UCP3 com os componentes da SM⁽⁸⁷⁾.

Diversos polimorfismos do gene UCP3 têm sido variavelmente associados com fenótipos relacionados à obesidade⁽⁸⁸⁾ e mudanças no IMC⁽⁸⁷⁾. Em razão de sua expressão altamente seletiva no músculo esquelético e a existência de vazamento de prótons mitocondriais nesse tecido, relatos iniciais propuseram que a UCP3 causaria um vazamento de prótons basais e aumentaria a termogênese^(44, 89), entretanto, diversos autores contestam essa hipótese com base em dados de expressão gênica e achados de estudos nocaute e superexpressão^(50, 56). No presente estudo, o genótipo TT do rs1726745 do gene UCP3 correlacionou-se com menores valores de IMC na amostra geral e no grupo EHNA (vs esteatose), reforçando a possível contribuição de SNPs do gene UCP3 na redução da prevalência da

obesidade^(90, 91), possivelmente, pelo aumento dos níveis de RNAm da UCP3⁽⁹²⁾ e, consequente aumento da oxidação de gordura e redução do IMC⁽⁹³⁾.

Xu *et al.*⁽⁶⁶⁾ (2013) não identificaram associação entre os polimorfismos do gene de UCP3 (rs1726745, rs3781907, rs11235972) e índices de obesidade, porém, outro SNP do gene UCP3 (rs1800849) relacionou-se com diferenças na altura corporal e na circunferência da cintura e do quadril em uma população pediátrica. Van Abeelen *et al.*⁽⁵²⁾ (2008) encontraram uma associação significativa entre homozigotos para o menor alelo dos polimorfismos rs647126 (alelo A), rs1685356 (alelo A) e rs2075577 (alelo G) do gene UCP3 e maior IMC em holandeses. Já uma metanálise identificou uma associação do genótipo TT do SNP rs1800849 do gene UCP3 com IMC elevado em asiáticos⁽⁹⁵⁾. Constata-se, assim, que a relação entre SNPs do gene UCP3 e obesidade é complexa, de forma que a variabilidade nos resultados dos estudos de SNPs do gene UCP3 com as mudanças no IMC parece estar relacionada de forma importante com a etnia, incluindo as diferenças nas frequências genotípicas populacionais, no estilo de vida e na distribuição do peso corporal entre as diferentes populações orientais e ocidentais^(91, 94).

Outro interessante achado em nosso estudo foi a associação do alelo T do rs1726745 do gene UCP3 com menores valores de colesterol total e TG na amostra geral e, menores valores de TG no grupo EHNA, corroborando o possível papel da UCP3 no metabolismo lipídico. A associação de SNPs do gene UCP3 a um melhor perfil lipídico, por meio de maiores valores de HDL⁽⁹²⁾ e/ou de menores valores de colesterol total e LDL⁽⁸⁶⁾, foi descrita na literatura.

Conjectura-se que a presença do alelo de risco do SNP do gene UCP3 poderia produzir um estado lipídico mais benéfico no tecido adiposo do músculo esquelético, pela modificação da taxa de consumo de AGs⁽⁸⁶⁾. De forma controversa, Salopuro *et al.*⁽⁶⁸⁾ (2009) descreveram uma associação dos polimorfismos rs3781907 (alelo G), rs1726745 (alelo G), rs11235972 (alelo A) e rs1800849 (alelo T) do gene UCP3 com maiores valores de colesterol total e LDL. Tais discordâncias nos resultados dos SNPs do gene UCP3 em relação ao perfil lipídico podem estar relacionadas às variações nas frequências alélicas e penetrância nas diferentes populações, particularmente, nos distintos grupos étnicos⁽⁹⁴⁾.

Em relação às variáveis bioquímicas, nosso estudo identificou uma associação significativa do alelo T do rs1726745 do gene UCP3 com menores valores de AST e ALT na amostra geral e nos grupos EHNA (vs esteatose) e com SM (vs sem SM). De acordo com Sanyal *et al.*⁽⁹⁵⁾ (2015), a elevação de enzimas hepáticas (ALT, AST e GGT) é um sinal de lesão hepática e pode ser considerada uma medida útil na avaliação da DHGNA, sendo raro que seus valores sejam superiores a três vezes o limite superior da normalidade⁽⁹⁶⁾. Uma possível explicação para este resultado seria a correlação deste alelo (rs1726745-T) com um melhor perfil metabólico (menores valores de colesterol total e TG e, em homozigose, menor IMC e proteção contra a SM) em nossa casuística, de forma que haveria uma redução na oferta de AGL e adipocinas, com consequentes menores lipotoxicidade, disfunção mitocondrial, produção de EROs, inflamação e morte celular. Entretanto, a interpretação da alteração de aminotransferases na DHGNA permanece incerta.

Mais de dois terços dos indivíduos possuem concentrações normais de aminotransferases, independente do espectro histológico da DHGNA⁽⁹⁷⁾. Mofrad *et al.*⁽⁹⁸⁾ (2003) reportaram que os valores de aminotransferases, em especial de ALT, não se correlacionam adequadamente com a gravidade histológica em indivíduos com doença hepática crônica, incluindo portadores de DHGNA. De forma semelhante, nosso estudo não identificou correlação entre menores valores de aminotransferases nos indivíduos com alelo T do rs1726745 do gene UCP3 e menor gravidade histológica, considerando-se os critérios para EHNA (esteatose, balonização, inflamação lobular), escore NAS e/ou estadiamento da fibrose.

Vários estudos reportaram uma associação, de forma independente, entre GGT e diversas condições patológicas⁽⁹⁹⁾, incluindo DCV⁽¹⁰⁰⁾, SM^(101, 102) e DHGNA^(17, 103). A GGT é uma enzima sintetizada pelos hepatócitos e células epiteliais dos ductos biliares intra-hepáticos e está envolvida no metabolismo da glutathiona, desempenhando um papel crítico nos processos de defesa antioxidante, detoxificação e inflamação⁽¹⁰¹⁾. Conforme Irie *et al.*⁽¹⁰⁴⁾ (2016), no estresse oxidativo, os níveis séricos de glutathiona oxidada aumentam, induzindo a GGT hepática, o que possibilita a conversão da glutathiona oxidada em glutathiona reduzida. Considera-se, assim, que a GGT desempenhe um papel importante no sistema de defesa antioxidante a nível celular, sendo um valioso marcador do estresse oxidativo na DHGNA^(104, 105). No presente estudo, identificamos a associação individual dos polimorfismos rs3781907 (alelo G) e rs11235972 (alelo A) com menores níveis de elevação de GGT na amostra geral e nos grupos EHNA (vs esteatose) e com SM (vs sem SM).

Nessa linha, alguns estudos sugerem que a GGT seja um significativo preditor de DHGNA⁽¹⁰⁶⁻¹⁰⁸⁾, e mais especificamente, que níveis elevados de GGT estejam associados a um espectro histológico mais grave da DHGNA (presença de EHNA e fibrose)⁽¹⁰⁹⁻¹¹¹⁾, e a redução nos níveis de GGT poderia prever a melhora histológica em pacientes com DHGNA, após cirurgia bariátrica⁽¹¹²⁾. Tahan *et al.*⁽¹¹¹⁾ (2008) reportaram um aumento significativo de fibrose em pacientes com DHGNA com elevação de GGT, sem detectar diferenças significativas em relação ao grau de necroinflamação e esteatose entre pacientes com GGT normal ou alterada. A apoptose de células hepáticas – avaliada pela expressão imuno-histoquímica de fator nuclear κ B ativado, caspase-3, capase-8 e Bcl-2 – correlacionou-se com ambos os aumentos de fibrose e GGT, sugerindo uma associação entre esses processos e, na análise de regressão logística multinominal, o aumento de GGT foi um fator de risco para fibrose avançada, com valor de corte para predição de fibrose avançada de 96,5 U/L nos pacientes com DHGNA (sensibilidade de 83% e especificidade de 69%)⁽¹¹¹⁾. No presente estudo, na análise individual dos SNPs com a fibrose, o polimorfismo rs3781907 (alelo G) associou-se à proteção para fibrose avançada e o rs11235972 (alelo A) associou-se à ausência de fibrose (vs presença de fibrose) e proteção para fibrose avançada; na análise de haplótipos, nenhuma associação significativa foi identificada. Assim, em nossa casuística, foi possível observar uma correlação entre menores níveis de elevação de GGT com menor gravidade histológica (fibrose) associada à presença do alelo de risco dos SNPs rs3781907 e rs11235972 do gene UCP3.

Uma possível explicação para esse achado seria a potencial influência dos polimorfismos rs3781907 e rs11235972 do gene UCP3 na redução da produção de EROs, com consequente redução do estresse oxidativo, apoptose, fibrogênese e níveis de GGT.

No estudo de Zhang *et al.*⁽¹¹⁾ (2015), a causalidade recíproca entre a DHGNA e SM em uma coorte longitudinal bidirecional (DHGNA como fator de risco para SM e, SM como fator de risco para DHGNA) e identificaram que, dentre 36 vias causais possíveis da evolução da DHGNA para SM, a mais importante ocorreu pela DHGNA gerando, inicialmente, aumento da GGT; posteriormente, dislipidemia, hipertensão e, finalmente, SM. Logo, indivíduos com elevação de GGT teriam risco aumentado para a SM em razão do aumento de estresse oxidativo, RI e esteatose hepática. Na causalidade inversa (SM como fator de risco para DHGNA), dentre 98 vias causais possíveis, a via dominante ocorreu, inicialmente, pela geração de dislipidemia e ao final, resultando na DHGNA. Dessa forma, o efeito da SM como fator risco para DHGNA foi superior ao da DHGNA para SM (risco atribuído de 19,92% vs 2,49%). Entretanto, em razão do caráter transversal do nosso estudo, não foi possível identificar o papel da GGT na temporalidade e/ou causalidade entre DHGNA e/ou SM.

Níveis elevados de GTT também têm sido associados com maior incidência de eventos cardiovasculares^(99, 113). Em uma metanálise, a elevação de GGT em 1 U/L (em escala logarítmica) associou-se ao aumento de 20% no risco para doença arterial coronariana (DAC), 54% de risco para acidente vascular encefálico (AVE) e 34% no risco para a combinação de DAC e

AVE⁽¹¹⁴⁾. Além disso, cada componente da SM é um fator de risco independente para DCV e a combinação desses riscos aumenta os índices e a gravidade da DAC, relacionada a um espectro de condições cardiovasculares, incluindo disfunção microvascular, calcificação e aterosclerose coronariana, disfunção cardíaca, infarto do miocárdio e falência cardíaca⁽¹¹⁵⁾. Na DHGNA, a RI, estresse oxidativo, piora do estado inflamatório e disfunção endotelial são fatores implicados na patogênese da DCV^(116, 117). Todavia, é precipitado inferir uma relação entre os menores níveis de GGT e redução de RCV em nossa amostra, de forma que estudos adicionais sejam necessários para investigar essa correlação.

Os resultados do presente estudo devem ser interpretados dentro das limitações de um estudo transversal, considerando-se as diferenças nas frequências alélicas e penetrância nos estudos com polimorfismos do gene UCP3 em diferentes etnias, além das variações no estilo de vida/dieta, uso de medicações e tamanhos amostrais que podem influenciar a expressão e o papel dos polimorfismos do gene UCP3⁽⁵⁶⁾.

O critério de inclusão de pacientes com diagnóstico histológico de DHGNA restringiu o tamanho amostral; em contrapartida, permitiu uma análise criteriosa das variáveis histológicas em relação aos polimorfismos do gene UCP3. A ausência de grupo controle não nos permite extrapolar os dados encontrados para a população em geral, já que a frequência dos polimorfismos do gene UCP3 estudados ainda é desconhecida na população brasileira. Logo, os efeitos dos polimorfismos rs1726745, rs3781907 e rs11235972 do gene

UCP3 na DHGNA e SM encontrados em nossa casuística devem ser validados em outras populações.

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Neste estudo, a caracterização dos pacientes com DHGNA demonstrou um predomínio de EHNA (vs esteatose) e de SM (vs ausência de SM) na população estudada. Avaliando-se a possível associação dessas condições com a frequência dos genótipos dos SNPs rs1726745, rs3781907 e rs11235972 do gene UCP3, conclui-se que:

- a) Nas análises individuais dos SNPs, não houve associação com a ocorrência de EHNA nos pacientes com DHGNA; contudo, o haplótipo TAA (rs1726745, rs3781907, rs11235972) demonstrou um efeito protetor para a EHNA;
- b) Nas análises individuais dos SNPs, o genótipo TT do rs1726745 demonstrou um efeito protetor para a SM, bem como o haplótipo TGG (rs1726745, rs3781907, rs11235972) nos pacientes com DHGNA;
- c) Em relação às características clínico-laboratoriais, o alelo T do SNP rs1726745 associou-se a menores valores de AST, ALT, TG e colesterol total na amostra geral. Na comparação entre grupos, houve menores valores de aminotransferases estritamente nos indivíduos com EHNA (vs esteatose) e com SM (vs sem SM) e, menores valores de TG nos indivíduos com EHNA (vs esteatose). Em análises individuais, o alelo G do rs3781907 e o alelo A do

rs11235972 associaram-se a menores valores de GGT na amostra geral e nos grupos EHNA (vs esteatose) e com SM (vs sem SM);

- d) Em relação à gravidade histológica, na análise individual dos SNPs com a fibrose, o alelo G do rs3781907 mostrou-se protetor para fibrose avançada e o alelo A do SNP rs11235972 associou-se à ausência de fibrose (vs presença de fibrose) e proteção para fibrose avançada.

7 ANEXOS

7 ANEXOS

Anexo A – Aprovação do projeto pelo CEP do HC-FMUSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Associação entre Polimorfismos do Gene da Proteína Desacopladora 3 (UCP3) com Doença Hepática Gordurosa Não-alcoólica e Síndrome Metabólica

Pesquisador: CLAUDIA PINTO MARQUES SOUZA DE OLIVEIRA

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 69427817.7.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.160.492

Apresentação do Projeto:

Estudo retrospectivo transversal com 280 sujeitos de uma população de pacientes com Doença Hepática Gordurosa Não-alcoólica obtidos de um banco de dados do Ambulatório de Doença Hepática Gordurosa Não alcoólica. Serão registrados dados antropométricos, clínico-laboratoriais e dados histológicos de biópsias hepática, avaliando-se três polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) não-sinônimos no gene da UCP3 rs11235972, rs3781907 e rs1726745 pelo método TaqMan. As amostras de sangue e de DNA serão obtidas em biorrepositórios, sendo que os doadores já tiveram assinado o consentimento para que seu material/DNA fosse armazenado e utilizado para futuras pesquisas.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a frequência dos polimorfismos de nucleotídeo único não-sinônimos rs1726745, rs3781907 e rs11235972 no gene da UCP3 e a associação com parâmetros clínicos, bioquímicos e histológicos em portadores de DHGNA - Doença Hepática Gordurosa Não-alcoólica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O tema é pertinente e o estudo está bem desenhado.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappelq.adm@hc.fm.usp.br

USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE

Continuação do Parecer: 2.160.492

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Adequada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_926724.pdf	07/06/2017 08:01:21		Aceito
Outros	CPM_ca_on.pdf	07/06/2017 07:58:27	CLAUDIA PINTO MARQUES SOUZA DE OLIVEIRA	Aceito
Folha de Rosto	CPM_FR.pdf	07/06/2017 07:56:50	CLAUDIA PINTO MARQUES SOUZA DE OLIVEIRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_UCP3_SM_NAFLD_versao_final2.docx	29/05/2017 09:59:27	CLAUDIA PINTO MARQUES SOUZA DE OLIVEIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Dispensa_TCLE.pdf	22/05/2017 15:21:26	CLAUDIA PINTO MARQUES SOUZA DE OLIVEIRA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 2.160.492

SAO PAULO, 06 de Julho de 2017

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. Perumpail BJ, Khan MA, Yoo ER, Cholankeril G, Kim D, Ahmed A. Clinical epidemiology and disease burden of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2017;23(47):8263-76.
2. Sharma M, Mitnala S, Vishnubhotla RK, Mukherjee R, Reddy DN, Rao PN. The Riddle of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Progression From Nonalcoholic Fatty Liver to Nonalcoholic Steatohepatitis. *J Clin Exp Hepatol*. 2015;5(2):147-58.
3. Li B, Zhang C, Zhan YT. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Cirrhosis: A Review of Its Epidemiology, Risk Factors, Clinical Presentation, Diagnosis, Management, and Prognosis. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2018;2018:2784537.
4. Coroian Aurelia SG. Is the Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Part of Metabolic Syndrome? *Journal of Diabetes and Metabolism*. 2015;06(04).
5. 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. *Hepatology*. 2012;55(6):2005-23.
6. Brunt EM, Wong VW, Nobili V, Day CP, Sookoian S, Maher JJ, *et al*. Nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15080.
7. Tana C, Ballestri S, Ricci F, Di Vincenzo A, Ticinesi A, Gallina S, *et al*. Cardiovascular Risk in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16(17).
8. Hagstrom H, Nasr P, Ekstedt M, Hammar U, Stal P, Askling J, *et al*. Cardiovascular risk factors in non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int*. 2019;39(1):197-204.
9. Pardhe BD, Shakya S, Bhetwal A, Mathias J, Khanal PR, Pandit R, *et al*. Metabolic syndrome and biochemical changes among non-alcoholic fatty liver disease patients attending a tertiary care hospital of Nepal. *BMC Gastroenterol*. 2018;18(1):109.
10. Lonardo A, Ballestri S, Marchesini G, Angulo P, Loria P. Nonalcoholic fatty liver disease: a precursor of the metabolic syndrome. *Dig Liver Dis*. 2015;47(3):181-90.

11. Zhang Y, Zhang T, Zhang C, Tang F, Zhong N, Li H, *et al.* Identification of reciprocal causality between non-alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome by a simplified Bayesian network in a Chinese population. *BMJ Open*. 2015;5(9):e008204.
12. Miyaaki H, Nakao K. Significance of genetic polymorphisms in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin J Gastroenterol*. 2017;10(3):201-7.
13. Hernaez R. Genetic factors associated with the presence and progression of nonalcoholic fatty liver disease: a narrative review. *Gastroenterol Hepatol*. 2012;35(1):32-41.
14. 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.
15. Dongiovanni P, Anstee QM, Valenti L. Genetic predisposition in NAFLD and NASH: impact on severity of liver disease and response to treatment. *Curr Pharm Des*. 2013;19(29):5219-38.
16. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*. 1998;114(4):842-5.
17. Lonardo A, Nascimbeni F, Maurantonio M, Marrazzo A, Rinaldi L, Adinolfi LE. Nonalcoholic fatty liver disease: Evolving paradigms. *World J Gastroenterol*. 2017;23(36):6571-92.
18. Marra F, Lotersztajn S. Pathophysiology of NASH: perspectives for a targeted treatment. *Curr Pharm Des*. 2013;19(29):5250-69.
19. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*. 2016;65(8):1038-48.
20. Nouredin M, Sanyal AJ. Pathogenesis of NASH: The Impact of Multiple Pathways. *Curr Hepatol Rep*. 2018;17(4):350-60.
21. Campo L, Eiseler S, Apfel T, Pyrsopoulos N. Fatty Liver Disease and Gut Microbiota: A Comprehensive Update. *J Clin Transl Hepatol*. 2019;7(1):56-60.
22. Jasirwan COM, Lesmana CRA, Hasan I, Sulaiman AS, Gani RA. The role of gut microbiota in non-alcoholic fatty liver disease: pathways of mechanisms. *Biosci Microbiota Food Health*. 2019;38(3):81-8.
23. Del Campo JA, Gallego-Duran R, Gallego P, Grande L. Genetic and Epigenetic Regulation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Int J Mol Sci*. 2018;19(3).

-
24. Chen W, Zhang J, Fan HN, Zhu JS. Function and therapeutic advances of chemokine and its receptor in nonalcoholic fatty liver disease. *Therap Adv Gastroenterol*. 2018;11:1756284818815184.
25. Ucar F, Sezer S, Erdogan S, Akyol S, Armutcu F, Akyol O. The relationship between oxidative stress and nonalcoholic fatty liver disease: Its effects on the development of nonalcoholic steatohepatitis. *Redox Rep*. 2013;18(4):127-33.
26. Gusdon AM, Song KX, Qu S. Nonalcoholic Fatty liver disease: pathogenesis and therapeutics from a mitochondria-centric perspective. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:637027.
27. Borrelli A, Bonelli P, Tuccillo FM, Goldfine ID, Evans JL, Buonaguro FM, *et al*. Role of gut microbiota and oxidative stress in the progression of non-alcoholic fatty liver disease to hepatocarcinoma: Current and innovative therapeutic approaches. *Redox Biol*. 2018;15:467-79.
28. Dongiovanni P, Romeo S, Valenti L. Genetic Factors in the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver and Steatohepatitis. *Biomed Res Int*. 2015;2015:460190.
29. Sookoian S, Pirola CJ. Genetic predisposition in nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Mol Hepatol*. 2017;23(1):1-12.
30. Struben VM, Hespenheide EE, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis and cryptogenic cirrhosis within kindreds. *Am J Med*. 2000;108(1):9-13.
31. 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.
32. 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.
33. Cui J, Chen CH, Lo MT, Schork N, Bettencourt R, Gonzalez MP, *et al*. Shared genetic effects between hepatic steatosis and fibrosis: A prospective twin study. *Hepatology*. 2016;64(5):1547-58.
34. Sookoian S, Pirola CJ. Nonalcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome: Shared genetic basis of pathogenesis. *Hepatology*. 2016;64(5):1417-20.

-
35. Rich NE, Oji S, Mufti AR, Browning JD, Parikh ND, Odewole M, *et al.* Racial and Ethnic Disparities in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Prevalence, Severity, and Outcomes in the United States: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2018;16(2):198-210 e2.
36. Palmer ND, Musani SK, Yerges-Armstrong LM, Feitosa MF, Bielak LF, Hernaez R, *et al.* Characterization of European ancestry nonalcoholic fatty liver disease-associated variants in individuals of African and Hispanic descent. *Hepatology.* 2013;58(3):966-75.
37. Di Costanzo A, Belardinilli F, Bailetti D, Sponziello M, D'Erasmo L, Polimeni L, *et al.* Evaluation of Polygenic Determinants of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) By a Candidate Genes Resequencing Strategy. *Sci Rep.* 2018;8(1):3702.
38. Anstee QM, Daly AK, Day CP. Genetic modifiers of non-alcoholic fatty liver disease progression. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1812(11):1557-66.
39. Bush WS, Moore JH. Chapter 11: Genome-wide association studies. *PLoS Comput Biol.* 2012;8(12):e1002822-e.
40. Macaluso FS, Maida M, Petta S. Genetic background in nonalcoholic fatty liver disease: A comprehensive review. *World J Gastroenterol.* 2015;21(39):11088-111.
41. Leveille M, Estall JL. Mitochondrial Dysfunction in the Transition from NASH to HCC. *Metabolites.* 2019;9(10).
42. Oliveira CP, Stefano JT. Genetic polymorphisms and oxidative stress in non-alcoholic steatohepatitis (NASH): A mini review. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2015;39 Suppl 1:S35-40.
43. Wang C, Gong J, Wu H. Development of gene polymorphisms in mediators of nonalcoholic fatty liver disease. *Biomed Rep.* 2017;7(2):95-104.
44. Busiello RA, Savarese S, Lombardi A. Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism. *Front Physiol.* 2015;6:36.
45. Javadov S, Kozlov AV, Camara AKS. Mitochondria in Health and Diseases. *Cells.* 2020;9(5).
46. Fuller-Jackson JP, Henry BA. Adipose and skeletal muscle thermogenesis: studies from large animals. *J Endocrinol.* 2018;237(3):R99-R115.
47. Depieri TZ, Pinto RR, Catarin JK, de Carli MC, Garcia Junior JR. [UCP-3: regulation of genic expression on skeletal muscle and possible role on body weight control]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2004;48(3):337-44.

-
48. Nedergaard J, Ricquier D, Kozak LP. Uncoupling proteins: current status and therapeutic prospects. *EMBO Rep.* 2005;6(10):917-21.
49. Garvey WT. The role of uncoupling protein 3 in human physiology. *J Clin Invest.* 2003;111(4):438-41.
50. Bézaire V, Seifert EL, Harper ME. Uncoupling protein-3: clues in an ongoing mitochondrial mystery. *FASEB J.* 2007;21(2):312-24.
51. Pohl EE, Rupprecht A, Macher G, Hilse KE. Important Trends in UCP3 Investigation. *Front Physiol.* 2019;10:470.
52. van Abeelen AF, de Krom M, Hendriks J, Grobbee DE, Adan RA, van der Schouw YT. Variations in the uncoupling protein-3 gene are associated with specific obesity phenotypes. *Eur J Endocrinol.* 2008;158(5):669-76.
53. Chan CB, Harper ME. Uncoupling proteins: role in insulin resistance and insulin insufficiency. *Curr Diabetes Rev.* 2006;2(3):271-83.
54. Vidal-Puig AJ, Grujic D, Zhang CY, Hagen T, Boss O, Ido Y, *et al.* Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J Biol Chem.* 2000;275(21):16258-66.
55. Gong DW, Monemdjou S, Gavrilova O, Leon LR, Marcus-Samuels B, Chou CJ, *et al.* Lack of obesity and normal response to fasting and thyroid hormone in mice lacking uncoupling protein-3. *J Biol Chem.* 2000;275(21):16251-7.
56. Costford S, Seifert E, Bezaire V, Gerrits M, Bevilacqua L, Gowing A, *et al.* The energetic implications of uncoupling protein-3 in skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2007;32:884-94.
57. Zhao RZ, Jiang S, Zhang L, Yu ZB. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *Int J Mol Med.* 2019;44(1):3-15.
58. Villarroya F, Iglesias R, Giralt M. PPARs in the Control of Uncoupling Proteins Gene Expression. *PPAR Res.* 2007;2007:74364.
59. Azzu V, Jastroch M, Divakaruni AS, Brand MD. The regulation and turnover of mitochondrial uncoupling proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1797(6-7):785-91.
60. Musa CV, Mancini A, Alfieri A, Labruna G, Valerio G, Franzese A, *et al.* Four novel UCP3 gene variants associated with childhood obesity: effect on fatty acid oxidation and on prevention of triglyceride storage. *Int J Obes (Lond).* 2012;36(2):207-17.

-
61. Camara Y, Mampel T, Armengol J, Villarroja F, Dejean L. UCP3 expression in liver modulates gene expression and oxidative metabolism in response to fatty acids, and sensitizes mitochondria to permeability transition. *Cell Physiol Biochem*. 2009;24(3-4):243-52.
62. Lanni A, Mancini F, Sabatino L, Silvestri E, Franco R, de Rosa G, *et al*. De novo expression of uncoupling protein 3 is associated to enhanced mitochondrial thioesterase-1 expression and fatty acid metabolism in liver of fenofibrate-treated rats. *FEBS Lett*. 2002;525(1-3):7-12.
63. Cadenas S. Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*. 2018;1859(9):940-50.
64. Demine S, Renard P, Arnould T. Mitochondrial Uncoupling: A Key Controller of Biological Processes in Physiology and Diseases. *Cells*. 2019;8(8).
65. Koh JH, Kim KH, Park SY, Kim YW, Kim JY. PPARdelta Attenuates Alcohol-Mediated Insulin Resistance by Enhancing Fatty Acid-Induced Mitochondrial Uncoupling and Antioxidant Defense in Skeletal Muscle. *Front Physiol*. 2020;11:749.
66. Xu YP, Liang L, Wang CL, Fu JF, Liu PN, Lv LQ, *et al*. Association between UCP3 gene polymorphisms and nonalcoholic fatty liver disease in Chinese children. *World J Gastroenterol*. 2013;19(35):5897-903.
67. Aller R, De Luis DA, Izaola O, González Sagrado M, Conde R, Alvarez T, *et al*. Role of -55CT polymorphism of UCP3 gene on non alcoholic fatty liver disease and insulin resistance in patients with obesity. *Nutr Hosp*. 2010;25(4):572-6.
68. Salopuro T, Pulkkinen L, Lindström J, Kolehmainen M, Tolppanen AM, Eriksson JG, *et al*. Variation in the UCP2 and UCP3 genes associates with abdominal obesity and serum lipids: the Finnish Diabetes Prevention Study. *BMC Med Genet*. 2009;10:94.
69. Dato S, Soerensen M, Montesanto A, Lagani V, Passarino G, Christensen K, *et al*. UCP3 polymorphisms, hand grip performance and survival at old age: association analysis in two Danish middle aged and elderly cohorts. *Mech Ageing Dev*. 2012;133(8):530-7.
70. Sun H, Zhang JT, Xie XR, Li T, Li XY, Wang NN, *et al*. Association of uncoupling protein gene polymorphisms with essential hypertension in a northeastern Han Chinese population. *J Hum Hypertens*. 2019;33(7):524-30.
71. Cruz RS. Ausência de associação dos polimorfismos genético do gene UCP3 e a força de preensão palmar em adultos da região metropolitana de Goiânia (Goiás, Brasil) [tese]. Goiás: Universidade Federal de Goiás; 2019.

-
72. Domínguez-Cruz MG, Muñoz ML, Totomoch-Serra A, García-Escalante MG, Burgueño J, Valadez-González N, *et al.* Maya gene variants related to the risk of type 2 diabetes in a family-based association study. *Gene*. 2020;730:144259.
73. Auton A, Abecasis GR, Altshuler DM, Durbin RM, Abecasis GR, Bentley DR, *et al.* A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526(7571):68-74.
74. Vespasiani-Gentilucci U, Gallo P, Dell'Unto C, Volpentesta M, Antonelli-Incalzi R, Picardi A. Promoting genetics in non-alcoholic fatty liver disease: Combined risk score through polymorphisms and clinical variables. *World J Gastroenterol*. 2018;24(43):4835-45.
75. Expert Panel on Detection E, Treatment of High Blood Cholesterol in A. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001;285(19):2486-97.
76. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, 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.
77. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016;64(1):73-84.
78. Lonardo A, Nascimbeni F, Ballestri S, Fairweather D, Win S, Than TA, *et al.* Sex Differences in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: State of the Art and Identification of Research Gaps. *Hepatology*. 2019;70(4):1457-69.
79. Cotter TG, Rinella M. Nonalcoholic Fatty Liver Disease 2020: The State of the Disease. *Gastroenterology*. 2020;158(7):1851-64.
80. Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, Anstee QM, Targher G, Romero-Gomez M, *et al.* A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. *J Hepatol*. 2020;73(1):202-9.
81. Mendez-Sanchez N, Arrese M, Gadano A, Oliveira CP, Fassio E, Arab JP, *et al.* The Latin American Association for the Study of the Liver (ALEH) position statement on the redefinition of fatty liver disease. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*. 2020;S2468-1253(20)30340-X.

-
82. Zhang K, Calabrese P, Nordborg M, Sun F. Haplotype block structure and its applications to association studies: power and study designs. *Am J Hum Genet.* 2002;71(6):1386-94.
83. Ken-Dror G, Humphries EH, Drenos F. The use of haplotypes in the identification of interaction between SNPs. *Hum Hered.* 2013;1(75):44-51.
84. Groop L. Genetics of the metabolic syndrome. *Br J Nutr.* 2000;83 Suppl 1:S39-48.
85. Meirhaeghe A, Cottel D, Amouyel P, Dallongeville J. Lack of association between certain candidate gene polymorphisms and the metabolic syndrome. *Mol Genet Metab.* 2005;86(1-2):293-9.
86. de Luis DA, Aller R, Izaola O, Sagrado MG, Conde R, Primo D, *et al.* Relationship of -55C/T polymorphism of uncoupling protein 3 (UCP3) gene with metabolic syndrome by ATP III classification. *J Clin Lab Anal.* 2012;26(4):272-8.
87. Povel CM, Boer JM, Reiling E, Feskens EJ. Genetic variants and the metabolic syndrome: a systematic review. *Obes Rev.* 2011;12(11):952-67.
88. de Luis DA, Aller R, Izaola O, González Sagrado M, Conde R, Pérez Castrillón JL. Lack of association of -55CT polymorphism of UCP3 gene with fat distribution in obese patients. *Ann Nutr Metab.* 2007;51(4):374-8.
89. Cioffi F, Senese R, de Lange P, Goglia F, Lanni A, Lombardi A. Uncoupling proteins: a complex journey to function discovery. *Biofactors.* 2009;35(5):417-28.
90. Liu YJ, Liu PY, Long J, Lu Y, Elze L, Recker RR, *et al.* Linkage and association analyses of the UCP3 gene with obesity phenotypes in Caucasian families. *Physiol Genomics.* 2005;22(2):197-203.
91. Alonso A, Martí A, Corbalán MS, Martínez-González MA, Forga L, Martínez JA. Association of UCP3 gene -55C>T polymorphism and obesity in a Spanish population. *Ann Nutr Metab.* 2005;49(3):183-8.
92. Hamada T, Kotani K, Fujiwara S, Sano Y, Domichi M, Tsuzaki K, *et al.* The common -55 C/T polymorphism in the promoter region of the uncoupling protein 3 gene reduces prevalence of obesity and elevates serum high-density lipoprotein cholesterol levels in the general Japanese population. *Metabolism.* 2008;57(3):410-5.
93. Schrauwen P, Hesselink MK. The role of uncoupling protein 3 in fatty acid metabolism: protection against lipotoxicity? *Proc Nutr Soc.* 2004;63(2):287-92.

-
94. Brondani LA, Assmann TS, de Souza BM, Bouças AP, Canani LH, Crispim D. Meta-analysis reveals the association of common variants in the uncoupling protein (UCP) 1-3 genes with body mass index variability. *PLoS One*. 2014;9(5):e96411.
95. Sanyal D, Mukherjee P, Raychaudhuri M, Ghosh S, Mukherjee S, Chowdhury S. Profile of liver enzymes in non-alcoholic fatty liver disease in patients with impaired glucose tolerance and newly detected untreated type 2 diabetes. *Indian J Endocrinol Metab*. 2015;19(5):597-601.
96. Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Systematic review: the diagnosis and staging of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011;33(5):525-40.
97. Fracanzani AL, Valenti L, Bugianesi E, Andreoletti M, Colli A, Vanni E, *et al*. Risk of severe liver disease in nonalcoholic fatty liver disease with normal aminotransferase levels: a role for insulin resistance and diabetes. *Hepatology*. 2008;48(3):792-8.
98. Mofrad P, Contos MJ, Haque M, Sargeant C, Fisher RA, Luketic VA, *et al*. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. *Hepatology*. 2003;37(6):1286-92.
99. Koenig G, Seneff S. Gamma-Glutamyltransferase: A Predictive Biomarker of Cellular Antioxidant Inadequacy and Disease Risk. *Dis Markers*. 2015;2015:818570.
100. Shaikh TZ MH, Shah NA, Shah SZA, Shahwani IM. Metabolic syndrome; gamma glutamyltransferase in patients. *Professional Med J*. 2015;22(4):414-9.
101. Tao L, Li X, Zhu H, Gao Y, Luo Y, Wang W, *et al*. Association between gamma-glutamyl transferase and metabolic syndrome: a cross-sectional study of an adult population in Beijing. *Int J Environ Res Public Health*. 2013;10(11):5523-40.
102. Bozbas H, Yildirim A, Karacaglar E, Demir O, Ulus T, Eroglu S, *et al*. Increased serum gamma-glutamyltransferase activity in patients with metabolic syndrome. *Turk Kardiyol Dern Ars*. 2011;39(2):122-8.
103. Obika M, Noguchi H. Diagnosis and evaluation of nonalcoholic fatty liver disease. *Exp Diabetes Res*. 2012;2012:145754.
104. Irie M, Sohda T, Anan A, Fukunaga A, Takata K, Tanaka T, *et al*. Reduced Glutathione suppresses Oxidative Stress in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Euroasian J Hepatogastroenterol*. 2016;6(1):13-8.

-
105. Irie M, Sohda T, Iwata K, Kunimoto H, Fukunaga A, Kuno S, *et al.* Levels of the Oxidative Stress Marker γ -Glutamyltranspeptidase at Different Stages of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Int Med Res.* 2012;40(3):924-33.
106. Banderas DZ, Escobedo J, Gonzalez E, Liceaga MG, Ramírez JC, Castro MG. γ -Glutamyl transferase: a marker of nonalcoholic fatty liver disease in patients with the metabolic syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2012(7):805-10.
107. Fujii H, Doi H, Ko T, Fukuma T, Kadono T, Asaeda K, *et al.* Frequently abnormal serum gamma-glutamyl transferase activity is associated with future development of fatty liver: a retrospective cohort study. *BMC Gastroenterol.* 2020;20(1):217.
108. Hossain IA, Rahman Shah MM, Rahman MK, Ali L. Gamma glutamyl transferase is an independent determinant for the association of insulin resistance with nonalcoholic fatty liver disease in Bangladeshi adults: Association of GGT and HOMA-IR with NAFLD. *Diabetes Metab Syndr.* 2016;10(1 Suppl 1):S25-9.
109. Petta S, Macaluso FS, Barcellona MR, Camma C, Cabibi D, Di Marco V, *et al.* Serum gamma-glutamyl transferase levels, insulin resistance and liver fibrosis in patients with chronic liver diseases. *PLoS One.* 2012;7(12):e51165.
110. Chan WK, Ida NH, Cheah PL, Goh KL. Progression of liver disease in non-alcoholic fatty liver disease: a prospective clinicopathological follow-up study. *J Dig Dis.* 2014;15(10):545-52.
111. Tahan V, Canbakan B, Balci H, Dane F, Akin H, Can G, *et al.* Serum gamma-glutamyltranspeptidase distinguishes non-alcoholic fatty liver disease at high risk. *Hepatogastroenterology.* 2008;55(85):1433–8.
112. Dixon JB, S. BP, O'Brien PE. Weight loss and non-alcoholic fatty liver disease: falls in gamma-glutamyl transferase concentrations are associated with histologic improvement. *Obes Surg.* 2006;16(10):1278-86.
113. Bobrus-Chociej A, Flisiak-Jackiewicz M, Daniluk U, Wojtkowska M, Klusek-Oksiuta M, Tarasów E, *et al.* Estimation of gamma-glutamyl transferase as a suitable simple biomarker of the cardiovascular risk in children with non-alcoholic fatty liver disease. *Acta Biochim Pol.* 2018;4(65):539-44.
114. Fraser A, Harris R, Sattar N, Ebrahim S, Smith GDS, Lawlor DA. Gamma-glutamyltransferase is associated with incident vascular events independently of alcohol intake: analysis of the British Women's Heart and Health Study and Meta-Analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;12(27):2729-35.

-
115. Tune JD, Goodwill AG, Sasso DJ, Mather KJ. Cardiovascular consequences of metabolic syndrome. *Transl Res*. 2017;183:57-70.
 116. Sao R, Aronow WS. Association of non-alcoholic fatty liver disease with cardiovascular disease and subclinical atherosclerosis. *Arch Med Sci*. 2018;14(6):1233-44.
 117. Patil R, Sood GK. Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2017;8(2):51-8.