MONIZE AYDAR NOGUEIRA SANTOS

**Efeito do ácido graxo ômega 3 no tratamento
da esteatohepatite não alcoólica (EHNA):
estudo randomizado placebo controlado**

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: Prof. Dra. Cláudia Pinto Marques
Souza de Oliveira

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Santos, Monize Aydar Nogueira

Efeito do ácido graxo ômega 3 no tratamento da esteatohepatite não alcoólica (EHNA) : no estudo randomizado placebo controlado / Monize Aydar Nogueira Santos. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências em Gastroenterologia.

Orientadora: Cláudia Pinto Marque Souza de Oliveira.

Descritores: 1.Esteatohepatite 2.Ácidos graxos ômega-3 3.Biópsia por
agulha 4.Fígado/patologia 5.Lípideos/sangue 6.Adulto 7.Ensaio clínico
controlado aleatório 8.Método duplo-cego

USP/FM/DBD-377/14

DEDICATÓRIA

Aos meus pais José Edson Freitas Nogueira e Farize Cândida Aydar Nogueira que me proporcionaram a jornada do conhecimento e incentivaram na realização dos meus ideais.

Ao meu marido Fernando César Cervantes dos Santos por compreender os dias dedicados ao estudo e apoiar meus anseios.

Às minhas queridas filhas Ana Beatriz e Isabella perdão por meus períodos de ausência, na dedicação aos estudos, e obrigada por me mostrarem o que é o verdadeiro amor.

Aos meus irmãos Édson Aydar Nogueira e Rafael Aydar Nogueira, à minha cunhada Sabrina Segatto e aos meus sobrinhos Gabriel e Julia pelos momentos de alegria quando eu mais precisei.

AGRADECIMENTOS

À Deus por guiar o meu caminho desde a minha infância, por sempre me conceder sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos, coragem para acreditar, força para não desistir e proteção para me amparar.

À Prof.^a Dra. Cláudia Oliveira, professora associada e responsável pelo ambulatório de esteatohepatite não alcoólica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela confiança, pelo exemplo de ética, valorização do aprendizado e pelo privilégio de tê-la como orientadora.

Ao Prof. Dr. Dan Waitzberg, chefe da Nutrologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e meu mestre e incentivador na mesma área, pelo empenho para que o trabalho fosse realizado.

Ao Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves, professor titular da disciplina de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, juntamente com Prof. Bruno Cogliati pela oportunidade e importante contribuição na leitura cega das lesões histológica e no desenvolvimento desta tese.

À Bióloga Raquel Susana Torrinhas, pela participação na análise dos dados e redação do artigo para publicação.

À nutricionista Luciana (in memoriam) por estar presente no início dos trabalhos e me mostrar que ainda existe humanitarismo, alegria em viver cada dia. Saudades.

À Nutricionista Maria Carolina Gonçalves Dias pela randomização e acondicionamento dos medicamentos.

Laboratório de Epidemiologia e Estatística do Departamento de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em especial ao estatístico Márcio Augusto Diniz e ao Prof. Júlio Cesar Rodrigues Pereira pela dedicação e apoio.

À bibliotecária do Departamento de Gastroenterologia Marta Regina Rodrigues e à Secretária da Pós-Graduação Ciências em Gastroenterologia Vilma de Jesus sempre prestativas e dispostas a ajudar.

Aos Profs. André Dong Won Lee, José Jukemura e José Tadeu Stefano, pelas valiosas sugestões oferecidas durante minha prova de qualificação, que certamente contribuíram para qualidade científica desta tese.

Ao meu primo e médico urologista Ricardo Aydar Natalin pela presteza na correção do Inglês.

Aos pacientes pela disposição e colaboração ao participarem desta pesquisa.

Agradeço à todos que, de alguma forma contribuíram para realização deste estudo.

Epígrafe

“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita.”

Mahatma Gandhi

Ninguém se iluda, se alguém dentre vós se julga sábio segundo os critérios deste mundo, faça-se louco para tornar-se sábio, pois a sabedoria deste mundo é loucura perante Deus. De facto, a Escritura diz: «Deus apanha os sábios na sua própria esperteza».

I Coríntios 3, 18-19

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. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertação, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valeria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação – DBD/FMUSP; 2011.

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas	
Lista de figuras	
Lista de gráficos	
Lista de tabelas	
Resumo	
Summary	
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Definição e conceito da doença hepática gordurosa não alcoólica.....	2
1.2 Epidemiologia	3
1.3 Fatores predisponentes e fisiopatogênese	5
1.4 Perspectivas de tratamento.....	7
1.5 Ômega 3, síndrome plurimetabólica e esteatohepatite	9
1.6 Justificativa.....	12
2 OBJETIVOS.....	13
2.1 Primário.....	14
2.2 Secundário.....	14
3 MÉTODOS	15
3.1 Pacientes e métodos.....	16
3.1.1 Características do estudo.....	16
3.1.2 Determinação do tamanho da amostra	16
3.1.3 População	17
3.1.4 Critérios de Inclusão.....	17
3.1.5 Critérios de Exclusão	18
3.1.6 Grupos de estudo.....	18
3.1.7 Descrição das características da droga a ser utilizada	19
3.1.8 Descrição das características do placebo a ser utilizado	20
3.1.9 Métodos	20
3.2 Avaliação clínica.....	21
3.3 Exames Laboratoriais.....	22
3.3.1 Exames laboratoriais a cada 3 meses.....	22
3.3.2 Mediador inflamatório a cada 3 meses.....	22
3.3.3 Análise de ácidos graxos no plasma como prova de tratamento.....	22
3.4 Biópsia hepática e avaliação histológica	23
3.4.1 Gradação das variáveis e do estadiamento histopatológico.....	23
3.5 Caracterização da população estudada	26
3.6 Avaliação da aderência à orientação e medicamento	28
3.7 Metodologia estatística.....	28
4 RESULTADOS	30
4.1 Características da população estudada	31
4.2 Características histológicas.....	33
4.3 Variáveis bioquímicas e antropométricas	35
4.4 Ácidos graxos plasmáticos	39

4.5 Análise post hoc	41
5 DISCUSSÃO	43
5.1 Desenho do estudo	44
5.2 Resultados histológicos	46
5.3 Resultados dos desfechos secundários	48
5.4 Limitações do estudo	50
6 CONCLUSÕES	51
7 ANEXOS	53
8 REFERÊNCIAS	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
AF	Atividade física
AGL	Ácidos graxos livres
AGPI	Ácidos graxos polinsaturados
ALA	Ácido alfa-linolênico
ALT	Alanina aminotransferase
AP-1	Fator de Transcrição AP-1
AST	Aspartato aminotransferase
ATP III	<i>Adult Treatment Panel III</i>
BAAT	<i>Body mass index, Age, ALT e triglycerides</i>
BD	Bilirrubina direta
BH	Biópsia hepática
BT	Bilirrubina total
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CC	Circunferência de cintura
CHC	Carcinoma hepatocelular
CT	Colesterol Total
DHA	Doença hepática alcoólica
DHA	Ácido docosahexaenóico
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DM	Diabetes mellitus
EF	Efeito colateral
EH	Esteatose Hepática não alcoólica
EHNA	Esteatohepatite não alcoólica
EPA	Ácido eicosapentaenóico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FA	Fosfatase alcalina
GGT	Gama-glutamil transferase
HAS	Hipertensão arterial sistêmica

HDL	Lipoproteína de alta densidade
HE	Hematoxilina-eosina
HOMA-IR	<i>Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance</i>
IKK β	Inibidor Kappa beta kinase
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IMC	Índice de massa corpórea
IP	Inflamação portal
IRS	<i>Insulin-receptor substrate Family</i>
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
NAC	N- acetilcisteína
NAS	Escore de atividade da DHGNA
NCEP	<i>National Cholesterol Education Program</i>
NF-K β	Fator Nuclear Kappa beta
NO	<i>Nitric oxide</i>
PCR	Proteína C reativa
PPAR α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptors α</i>
PUFA	Ácido graxo polinsaturado
RI	Resistência insulínica
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SM	Síndrome metabólica
SNAC	S-nitroso-N-acetilcisteína
SOCS	Sinalizador da supressão de citocinas
SREBP-1	<i>Sterol regulatory elemento binding protein-1c</i>
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
TG	Triglicérides
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Diagrama dos pacientes com diagnóstico de esteatohepatite não alcoólica randomizados para receber ingesta oral de ácido graxo ômega-3 ou placebo (Randomização, acompanhamento e parâmetros analisados por pacientes e grupo de estudo) 27
- Figure 2 -** Concentração plasmática de (A) ácido alfa-linolênico, (B) ácido eicosapentaenóico, (C) ácido docosahexaenóico, (D) ácido araquidônico, (E) ácidos graxos ômega-3 total, (F) relação ômega-3 / ômega-6 de pacientes com esteatohepatite não alcoólica no tempo zero e após seis meses de tratamento com ácido graxo omega-3 (n-3) ou placebo 40
- Figura 3 -** Alteração dos níveis plasmáticos de AGPI entre os períodos pré e pós tratamento de pacientes com esteatohepatite não alcoólica e correlação com a melhora da inflamação lobular post-hoc 42

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 -** Resultado do nível sérico de AST em U/L por indivíduo de acordo com grupo de estudo 33
- Gráfico 2 -** Mudança nos triglicérides sérico dos pacientes com esteatohepatite não alcoólica no basal, 3 e 6 meses após a ingestão oral de ácidos graxos ômega-3 ou placebo 38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Causas comuns de esteatose hepática secundária.....	3
Tabela 2 -	Quantidade de ácido eicosapentaenoico e ácido docosaheptaenoico em comuns peixes oleosos	10
Tabela 3 -	Composição de cada cápsula administrada ao grupo ômega-3 .	20
Tabela 4 -	DHGNA: gradação das variáveis e do estadiamento histopatológico (NAS)	25
Tabela 5 -	Características demográficas, clínicas, bioquímicas e histológicas dos pacientes no início do estudo	32
Tabela 6 -	Resultados primários de mudanças nas características histológicas do fígado após 6 meses de tratamento	34
Tabela 7 -	Mudanças nos resultados antropométricos e bioquímicos de pacientes com esteatohepatite não-alcoólica após 3 e 6 meses de ingesta oral de ácidos graxos Ômega-3 ou placebo	36
Tabela 8 -	Comparação da melhora ou estabilidade e piora em percentual dos pacientes dos parâmetros triglicérides (TG) e alanina aminotransferase (ALT) em 3 e 6 meses em relação ao tempo zero	37

RESUMO

Alves MAN. *Efeito do ácido graxo Ômega-3 no tratamento da esteatohepatite não alcoólica (EHNA)* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Introdução: Existem poucas estratégias de intervenção medicamentosa que se mostraram eficazes na doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). Os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) Ômega-3 parecem ser eficazes no tratamento da esteatose hepática de modelos experimentais, mas poucos estudos randomizados em humanos foram realizados. O objetivo deste estudo foi avaliar prospectivamente a eficácia de AGPI Ômega-3 provenientes do óleo de linhaça e peixe na esteatohepatite não alcoólica (pacientes com EHNA). **Métodos:** Sessenta pacientes com biópsia confirmando EHNA foram incluídos no estudo duplo cego, randomizado, placebo controlado. Os pacientes foram randomizados em dois grupos. Grupo Ômega-3 (n = 32) recebeu três cápsulas contendo no total 945 mg de AGPI Ômega-3 (63% ácido alfa linolênico (ALA), 21% ácido eicosapentaenóico (EPA) e 16% do ácido docosahexaenóico (DHA)) e Grupo Placebo (n = 28) recebeu três cápsulas contendo óleo mineral. A intervenção foi realizada por seis meses, quando os pacientes foram novamente submetidos à biópsia hepática. O desfecho primário foi a mudança histológica hepática de acordo com o escore de atividade EHNA (NAS) no início (pré intervenção) e seis meses (após intervenção). Desfecho secundário compreendeu análise das aminotransferases séricas, perfil lipídico e glicemia em jejum, parâmetros antropométricos e nível sérico de IL6 em 0, 3 e 6 meses e dosagem de Ômega-3 plasmático, como prova de tratamento, em 0 e 6 meses. **Resultados:** Dos 60 pacientes avaliados, 10 não terminaram o estudo (5 no grupo Ômega-3, e 5 no grupo placebo). Analisando os resultados primários, a atividade NAS melhorou ou se manteve estável em 78,26% dos pacientes do grupo placebo e em 55,56% do grupo Ômega-3, sem diferença significativa entre os grupos ($p = 0,978$), a inflamação lobular reduziu ou se manteve estável em 91,3% no grupo de placebo e em 66,67% no grupo Ômega-3, também sem diferença entre os grupos ($p = 0,994$). Ômega-3 não reduziu a esteatose hepática, balonização hepatocelular e fibrose. Nos parâmetros bioquímicos houve redução do nível de triglicérides em três meses no grupo Ômega-3 ($p = 0,011$) quando comparado com o placebo. Por outro lado, aminotransferases séricas, colesterol total e frações, glicemia, parâmetros antropométricos e níveis séricos de IL-6 não foram alterados com o tratamento em seis meses quando comparado com placebo. Analisando o resultado do Ômega-3 plasmático no período seis meses, observou-se que no grupo Ômega-3 houve aumento do ALA ($p = 0,014$), EPA ($p = 0,016$), da relação Ômega-3/Ômega-6 ($p = 0,018$) e redução do ARA ($p = 0,028$), enquanto que no grupo placebo encontrou-se aumento do Ômega-3 nas formas de EPA ($p = 0,03$), DHA ($p = 0,036$) relação Ômega-3/Ômega-6 ($p = 0,007$), o que comprova que o grupo placebo de alguma forma ingeriu também Ômega-3. Avaliando o Ômega-3 plasmático entre grupos tratamento e placebo tem-se diferença entre os grupos em relação ao ARA ($p = 0,03$) que reduziu no grupo “tratado com Ômega-3”. Devido ao consumo de Ômega-3 pelo grupo placebo, optou-se por desconsiderar o duplo cego e fazer nova análise estatística baseada no aumento de Ômega-3 plasmático e comparar com melhora histológica das variáveis NAS e encontrou-se que o aumento do DHA estava positivamente relacionado com a melhora ou estabilização da inflamação lobular em seis meses de estudo ($p = 0,014$). **Conclusões:** Os resultados deste estudo indicam que AGPI Ômega-3 a partir de uma mistura de óleos de linhaça e peixe não pode melhorar a histologia hepática, a maioria dos parâmetros bioquímicos e os níveis séricos de IL-6; no entanto, esta suplementação impacta significativamente o perfil lipídico dos pacientes com EHNA, aumentando os níveis de AGPI Ômega-3, diminuindo os níveis de ácido araquidônico (AA), potencialmente pró-inflamatória da família AGPI Ômega-6, e diminuição dos níveis de triglicérides séricos. Na análise post hoc houve correlação significativa entre o aumento dos níveis plasmáticos de DHA e melhora da inflamação lobular, independentemente do tratamento recebido. A limitação do estudo foi o grupo placebo ter ingerido ácidos graxos Ômega-3. Mais estudos são necessários para confirmar estes resultados (ID 01992809).

Descritores: Esteatohepatite; Ácidos Graxos Ômega 3; Biópsia por agulha; Fígado/patologia; Lipídeos/sangue; Adulto; Ensaio clínico controlado aleatório; Método duplo-cego .

SUMMARY

Alves MAN. *Effects of omega-3 fatty acids (PUFA) on treatment nonalcoholic steatohepatitis (NASH)* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2014.

Introduction: There is a limited number of effective drug treatments available for the treatment of *nonalcoholic steatohepatitis (NASH)*. Polyunsaturated fatty acid (PUFAs) Omega 3 seems to be effective in treating hepatic steatosis in experimental animal models, however there is a limited number of humans randomized studies available in the literature. The purpose of the present study is to prospectively evaluate the treatment efficacy of the PUFAs Omega 3 from flaxseed and fish in patients with NASH disease. **Methods:** A total of sixty biopsy confirmed NASH patients were included in a double blind, randomized, placebo controlled study. They were randomized into two groups: Omega 3 group (n = 32) where patients received a total of 945mg of PUFAs Omega 3 and Placebo group (n = 28) where patients received only mineral oil. After a 6 month treatment all patients underwent a new liver biopsy. Primary goal was to evaluate and compare liver histologic changes, according to Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score (NAS), between pre and post treatment biopsies. Secondary goal was to evaluate serum transaminases, lipid profile and serum non fasting glucose, anthropometric parameters and serum IL6 at 0, 3 and 6 month treatment. A serum Omega 3 dosage was performed at 0 and 6 month as treatment proof. **Results:** A total of 50 patients finished the study, 25 from each original group. NAS score improved or was unaltered in 78.26% of the placebo group and in 55.56% of the Omega 3 group ($p = 0,978$). Lobular liver inflammation was reduced or unaltered in 91.3% and in 66.67% respectively of the placebo and Omega 3 groups ($p = 0,994$). Omega 3 alone was not able to reduce liver steatosis, hepatocellular ballooning or fibrosis. Biochemical analysis revealed reduction on serum triglycerides after 3 month treatment for the Omega 3 group patients, when compared to placebo ($p=0,011$). Serum transaminases, total cholesterol and fractions, non fasting glucose and IL-6 were found to have no changes after 6 month treatment, when compared to placebo. After 6 month we found serum rise of Omega 3 on its forms as ALA ($p= 0,014$) and EPA ($p = 0,016$), and of the relation Omega 3/Omega 6 ($p = 0,018$), besides a reduction of the ARA ($p= 0,028$). The placebo group demonstrated to have an Omega 3 serum rise of its forms as EPA ($p = 0,03$) and DHA ($p = 0,036$) and of the relation Omega3/Omega6 ($p = 0,007$). These findings are proof that the placebo group also ingested some form of Omega 3. There is a difference between the groups regarding the serum Omega 3 on the ARA relation, which was reduced in the Omega 3 group. Due to the Omega 3 ingestion by the placebo group we decided to not consider the double blind and to perform a new statistic analysis based on the serum Omega 3 rise and compare with the improvement on NAS histologic variables. The analysis revealed that DHA rise was positively related with an improvement or unchanged of lobular inflammation after 6 months ($p= 0,014$). **Conclusions:** The present study was able to demonstrate that the AGPI Omega 3 from flaxseed and fish can not improve hepatic histology, most of the biochemical parameters and serum levels of IL-6. However this type of supplementation revealed a significant impact over lipid profile from NASH patients, providing an rise on AGPI Omega 3 levels and reducing the levels of Arachidonic Acid (AA) and triglycerides. The post hoc analysis demonstrated a significative correlation between the serum rise of DHA and the improvement of lobular inflammation, regardless of the received treatment. The fact that the placebo group ingested Omega 3 revealed to be a limitation of the present study. More studies are recommended to confirm our findings (ID 01992809)

Descriptors: Steatohepatitis; Fatty Acids Omega 3; Biopsy, needle; Liver/pathology; Lipids/blood; Adult; Randomized controlled trial; Double-blind method.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Definição e conceito da doença hepática gordurosa não alcoólica

A infiltração gordurosa do fígado (esteatose hepática) é uma das alterações hepatocelulares mais frequentes, constituindo um achado comum em biópsias hepáticas. (Ludwig et al., 1997) descreveram uma entidade clínico-patológica denominada *Esteatohepatite Não Alcoólica (EHNA)*, a qual, além da esteatose, apresenta concomitantemente processo inflamatório, necrose e graus variados de fibrose, semelhante à forma alcoólica. Posteriormente, alguns estudiosos definiram o grande espectro das doenças gordurosas do fígado, que englobam desde esteatose benigna sem sinais inflamatórios ou fibrose até doença com inflamação, fibrose e cirrose como Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (*DHGNA*) (Falck-Ytter et al., 2001; Clark et al., 2002).

Mais recentemente, a definição de DHGNA primária baseia-se na evidência de esteatose hepática por imagem ou histologia sem causas secundárias de acúmulo de gordura hepática como consumo de álcool, uso de medicação esteatogênicas ou distúrbios hereditários (Tabela 1). Na maioria dos pacientes, a DHGNA está associada a fatores de risco metabólicos como obesidade, diabetes mellitus e dislipidemia e é histologicamente categorizada em Esteatose hepática não alcoólica (EH) e Esteatohepatite não alcoólica (EHNA). A EH é definida como presença de esteatose hepática sem evidência de lesão hepatocelular na forma de balonização dos hepatócitos, e a EHNA pela presença de esteatose hepática e inflamação com lesão do hepatócito (balonização) com ou sem fibrose. Doentes com DHGNA têm aumento da mortalidade global quando comparados com a população controle. A causa mais comum de morte em DHGNA (EH e EHNA) é a doença cardiovascular. Pacientes com EHNA, mas não em EH, apresentam aumento na taxa de mortalidade relacionada ao fígado (Chalasani et al., 2012).

De acordo com estudos da literatura que acompanharam durante 7 a 10 anos pacientes com EHNA, 15%-20% destes evoluíram para fibrose e cirrose

(Powell et al., 1990; Lee, 1989) e aqueles com DHGNA têm risco aumentado de carcinoma hepatocelular (CHC), mas o risco é comumente maior naqueles doentes com avançada fibrose e cirrose, embora o CHC possa ocorrer em pacientes não cirróticos (Chalasani et al., 2012).

TABELA 1- Causas comuns de esteatose hepática secundária

Esteatose Macrovesicular
Consumo de álcool excessivo
Hepatite C (genótipo 3)
Doença de Wilson
Lipodistrofia
Jejum
Nutrição Parenteral
Abetalipoproteinemia
Medicações (amiodarona, methotrexate, tamoxifeno, corticosteróides)
Esteatose Microvesicular
Síndrome de Reye
Medicações (valproato, medicamentos anti-retroviral)
Esteatose hepática aguda da gestação
Síndrome Hellp
Erros inatos do metabolismo (deficiência LCAT, doença de Wilson)

Adaptado de Chalasani et al., 2012.

1.2 Epidemiologia

Devido às crescentes taxas de obesidade, a DHGNA tem se tornado cada vez mais frequente em todas as populações, principalmente no mundo ocidental e tem sido definida pelos especialistas como uma doença do mundo moderno (Youssef et al., 2002; Angelico et al., 2005).

Nos países industrializados a DHGNA é considerada a causa mais comum de doença hepática crônica, sendo que sua prevalência na população

adulta varia de 20% a 30% (Neuschwander-Tetri et al., 2003; Lewis et al., 2010). Estima-se que a prevalência mundial seja entre 6,3% à 33% com mediana de 20% na população geral, e que a prevalência de EHNA seja menor, entre 3% a 5% (Chalasani et al., 2012).

Em pacientes com obesidade severa e submetidos à cirurgia bariátrica, a prevalência de DHGNA pode exceder 90%; em diabetes mellitus II estudo com ultrassonografia mostrou 69% de prevalência e em pacientes com dislipidemia foi estimado em 50% (Chalasani et al., 2012). Com o aumento da taxa da obesidade infantil no mundo, a DHGNA vem se tornando uma importante doença hepática nesta população (Dunn et al., 2008).

A EHNA está presente em 37% das pessoas com obesidade mórbida (Machado et al., 2006).

Sabe-se ainda que cerca de 30% da população dos EUA possui esteatose, o que equivale a 60 milhões de indivíduos, sendo esta a doença hepática mais prevalente no país e, provavelmente, no mundo, superando a hepatite C (1,3%-2,0%), a doença alcoólica hepática (1%) e a hepatite B (0,3%-0,4%) (Yu et al., 2003). No oriente a prevalência da doença também é elevada. Estudo mostrou a presença de esteatose em 29% dos japoneses saudáveis avaliados por ultrassonografia (Jimba et al., 2005).

Estudo realizado pela Sociedade Brasileira de Hepatologia avaliou as características clínico-epidemiológicas da DHGNA em 16 centros médicos distribuídos pelas cinco regiões do Brasil. Os resultados deste estudo mostraram que a maioria era do sexo masculino (53,3%), 85% dos indivíduos com DHGNA eram assintomáticos e a maioria (58%) já apresentava EHNA, destes 27% apresentavam algum grau de fibrose associado, incluindo 15,4% casos de cirrose (Cotrim et al., 2011).

Variações na prevalência e na gravidade da DHGNA entre as diferentes populações dependem, entre outros fatores, do gênero, idade e etnia. Indivíduos jovens do sexo masculino apresentam maior risco (2 a 3 vezes) de desenvolver DHGNA e EHNA, porém, após os 60 anos, a probabilidade de desenvolver a EHNA é maior no sexo feminino. Indivíduos hispânicos

apresentam maior prevalência de DHGNA do que aqueles de outras etnias (Lewis et al., 2010).

1.3 Fatores predisponentes e fisiopatogênese

Ao longo dos anos várias hipóteses vêm sendo consideradas na fisiopatogênese da EHNA, entre elas, a do supercrescimento bacteriano /endotoxina/ citocina (Haines et al., 1981; Drenick et al., 1982; Yang et al., 1997; Tilg et al., 2000), da resistência à insulina (Festa et al., 2000; Chitturi et al., 2002; Marchesini et al., 2003) e do aumento do estresse oxidativo hepático (Curzio et al., 1985; Lee et al., 1995; Berson et al., 1998; Yang et al., 2000). Segundo a teoria da endotoxemia, o acúmulo de gordura no hepatócito seria consequência do supercrescimento bacteriano seguido de endotoxemia portal crônica, que em última instância, estimularia a produção citocinas como o *Fator de Necrose Tumoral α (TNF α)* que age prejudicando a oxidação mitocondrial de ácidos graxos, acarretando esteatose (Tilg et al., 2000). Esta teoria foi inicialmente sugerida por (Haines et al., 1981) observando que havia alta incidência de esteatose e cirrose em pacientes submetidos a “bypass” jejuno-ileal para controle da obesidade. O uso de antibióticos reduziu a esteatose e o risco de insuficiência hepática nestes pacientes (Drenick et al., 1982). Outro fato recente que ratifica esta hipótese, é que camundongos geneticamente obesos que desenvolvem esteatose com 30 dias de vida, também apresentam prejuízo na função fagocítica e sensibilidade aumentada à endotoxina, sugerindo que a endotoxemia possa ser um dos mecanismos patogênicos da esteatose (Yang et al., 1997). Por outro lado, a Síndrome da Resistência à Insulina também tem sido valorizada na fisiopatogênese da DHGNA. Sendo a insulina um hormônio que favorece a lipogênese e a lipólise periférica estariam configuradas as condições predisponentes para a infiltração gordurosa hepática (Festa et al., 2000; Chitturi et al., 2002). Segundo alguns estudos, a Síndrome de Resistência Insulínica, que inclui intolerância à glicose, dislipidemia, hipertensão arterial, adiposidade visceral e obesidade, apresenta

uma associação elevada com a progressão para formas mais graves de DHGNA (EHNA e cirrose). Chitturi et al. (2002) confirmaram a presença de síndrome plurimetabólica em cerca de 85% dos pacientes portadores de EHNA. Marchesini et al. (2003) demonstraram que a presença de três critérios da síndrome plurimetabólica em pacientes portadores de DHGNA eleva em 3.5 vezes o risco de desenvolver fibrose acentuada e doença crônica hepática.

Por outro lado, outra hipótese que vem sendo aventada com muita ênfase, é que exista aumento do estresse oxidativo hepático, que promoveria lipoperoxidação de membranas, ativação de células inflamatórias e citocinas, estímulo das células de ITO e, conseqüentemente, fibrogênese (Curzio et al., 1985; Lee et al., 1995; Berson et al., 1998; Yang et al., 2000). Esta teoria parece explicar melhor as diversas condições clínicas associadas à esteatose /esteatohepatite.

Em estudos experimentais desenvolvidos por Oliveira et al. (2002), observou-se que ratos Wistar submetidos à dieta deficiente em colina por 4 a 12 semanas desenvolveram esteatose hepática macro e microvesicular de leve (+2/+4) à intensa (+4/+4) em zona periportal, sendo maior nos animais submetidos a 12 semanas de dieta deficiente em colina. O estresse oxidativo verificado pela luminescência basal amplificada por lucigenina e pelas concentrações de hidroperóxidos, mostrou-se aumentado nos animais que desenvolveram esteatose hepática quando comparados com o grupo controle, apresentando estreita correlação com o maior grau de esteatose e maior estresse oxidativo, sendo maiores nos animais do grupo de 12 semanas de dieta. Na análise bioquímica, observou-se elevação significativa da aspartato aminotransferase e triglicérides nos grupos com esteatose quando comparados com o controle, sendo também, maiores nos animais do grupo de 12 semanas de dieta (Oliveira et al., 2002).

Atualmente acredita-se que EHNA ocorra através de pelo menos dois "hits" que envolve a modulação de um elevado número de genes e proteínas. Em primeiro lugar, o acúmulo de gordura, devido ao aumento da entrada de ácidos graxos livres e da lipogênese de novo, levando à esteatose. Em

segundo lugar, quando mecanismos adaptativos de tolerância ao estresse estão sobrecarregados, lipotoxicidade e inflamação crônica desencadeiam danos hepáticos maiores, principalmente através de estresse oxidativo e inflamatório, peroxidação lipídica e morte celular. Como consequência, todos esses processos concorrem para favorecer a esteatohepatite, fibrose e câncer. Recentemente, a elucidação da fisiopatologia das cascatas de sinalização controlando DHGNA e EHNA, benefício trazido por estudos em grande escala chamados ômicas, como a transcriptômica, genômica, proteômica e lipidômica. O advento da lipidômica, permite lançar luz sobre os respectivos papéis dos triglicérides e metabólitos dos ácidos graxos na hipótese da lipotoxicidade como patogênese da lesão hepática na EHNA (Martel et al., 2012).

Resumindo, a progressão de EHNA é resultado de eventos paralelos provenientes do fígado, bem como a partir do tecido adiposo, do intestino e o trato gastrointestinal. Assim, a disfunção do tecido adiposo através de um maior fluxo de ácidos graxos livres e liberação de adipocitocinas, além de alterações na microbiota intestinal gera sinais pró-inflamatórios subjacente a progressão EHNA. Adicionais 'hits' extra-hepáticos incluem fatores dietéticos e hormônios gastrointestinais. No fígado, a apoptose dos hepatócitos, espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo são fatores chave para lesão hepatocelular. Além disso, os mediadores e os sinais de perigo lipotóxico ativam as células de Kupffer, que iniciam e perpetuam a resposta inflamatória pela liberação de mediadores inflamatórios, que contribuem para o recrutamento das células inflamatórias e desenvolvimento de fibrose. Mediadores inflamatórios e fibrogênicos incluem quimiocinas, o sistema canabinóide, o inflamosoma e ativação de receptores de reconhecimento de padrões (Marra et al., 2013).

1.4 Perspectivas de tratamento

O tratamento atual de EHNA baseia-se na redução do peso corporal e aumento da atividade física, mas ainda não há nenhum tratamento farmacológico aprovado (Marra et al., 2013) e tratamos as condições clínicas

associadas; no entanto, trabalhos recentes indicam, com evidência B (moderada), o uso de Vitamina E 800 UI ao dia como primeira linha para tratamento de pacientes adultos não diabéticos, com confirmação histológica de EHNA (Sanyal et al., 2010; Chalasani et al., 2012).

Conhecendo-se ainda pouco a fisiopatogênese, o tratamento atual da DHGNA ainda é precário e se baseia no tratamento das condições associadas como obesidade, diabetes mellitus e hipertrigliceridemia, assim como descontinuação de drogas hepatotóxicas.

Há fortes evidências de que a perda de peso geralmente reduz a esteatose hepática (EH), conseguida por meio de dieta hipocalórica, isoladamente ou em conjunto com o aumento da atividade física. Nos pacientes diabéticos e dislipidêmicos o controle laboratorial destas condições é preconizado (Andersen et al., 1991; Ângulo et al., 2001; Chalasani et al., 2012). A recomendação da perda do excesso de peso e exercícios físicos deve ser sempre preconizada, independente do grau histopatológico da biópsia hepática do paciente. A perda de peso gradual leva à melhora da sensibilidade à insulina e pode diminuir a esteatose hepática e o grau de inflamação dela decorrente. A perda recomendável não deve ser maior que 230 g/dia (1,6 kg/semana), pois quando rápida, pode piorar a histologia hepática. Contudo, os resultados com estas medidas não são animadores. Alguns protocolos clínicos (estudos pilotos) têm utilizado drogas redutoras da resistência à insulina como a metformina e os derivados das tiazolidinedionas (Neuschwander-Tetri et al., 2002; Satheesh et al., 2002) e, drogas antioxidantes como a N-acetilcisteína (NAC) (Gubahar et al., 2000) e vitamina E (Lavine et al., 2000), demonstrando melhora dos parâmetros bioquímicos nos pacientes com DHGNA.

Em modelo experimental, Oliveira et al. (2003) utilizaram uma droga antioxidante doadora de óxido nítrico (NO), a S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) e observaram inibição completa do desenvolvimento da esteatose associada à redução do estresse oxidativo hepático. A provável explicação para a proteção do SNAC na inibição da esteatose é que, embora a ação de doadores de óxido nítrico não esteja completamente esclarecida, uma de suas habilidades é

neutralizar espécies reativas de oxigênio (ROS). NAC por sua vez, está envolvida no metabolismo e mobilização de NO e glutatona, aumentando os níveis endógenos de antioxidantes (Butler et al., 1997).

1.5 Ômega-3, síndrome plurimetabólica e esteatohepatite

Desde meados de 1980, tem havido interesse pelo ácido graxo Ômega-3 na fisiopatogênese e terapêutica de diversas doenças (Alwayn et al., 2005). Eles têm sido extensivamente estudados devido à sua ação em várias doenças como hipertrigliceridemia, asma, fibrose cística, demência, caquexia relacionada ao câncer, doença cardíaca coronariana, doença inflamatória intestinal, diabetes e entre outras, transplante renal, esquizofrenia entre outras, acredita-se ser benéfico em algumas doenças relacionadas à inflamação, por substituírem os ácidos graxos ômega-6, incluindo o ácido araquidônico, na membrana celular, reduzindo a criação de produtos metabólicos finais, incluindo prostaglandinas, tromboxanas e leucotrienos (White, 2009).

As fontes dos ácidos graxos polinsaturados ômega-3 podem ser de origem animal como nos peixes (Tabela 2), na forma de ácido graxo eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenoico (DHA) ou vegetal (linhaça) na forma de ácido alfa linolênico (ALA)

O salmão grelhado contém 1458,20 mg/100 g, a versão cozida 1306,50 mg/100 g e cru 1049,10 mg/100 g. A Sociedade Brasileira de Cardiologia recomenda pelo menos duas refeições por semana a base de peixe, como parte de uma dieta saudável, para diminuir o risco cardiovascular. Tal recomendação é particularmente dirigida para indivíduos de alto risco, como os que já apresentaram infarto do miocárdio e a suplementação com ômega-3 marinho (2-4 g/dia) deve ser recomendada para hipertrigliceridemia grave (> 500 mg/dL), com risco de pancreatite, refratária a medidas não farmacológicas e tratamento medicamentoso, o benefício de outras recomendações ainda são discutíveis (I Diretriz sobre o Consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular, 2013).

TABELA 2 - Quantidade de ácido eicosapentaenóico e ácido docosahexaenóico em comuns peixes oleosos

Peixe fonte	% total de ácido graxo	
	Ácido eicosapentaenóico	Ácido docosahexaenóico
Anchova	9.0-18.2	8.7-13
Sardinha	12.4-14.5	9.8-12.5
Cavalinha	6.1-6.7	7.0-8.7
Arenque	7.4-7.4	6.7-8.7
Salmão	12.7-13.4	10-10.2
Linguado	12.2	25.4
Badejo	10.6	19.5
Galeota	10.9	9.7
Menhaden	10.6-13.7	6.4-9.2
Capelin	9.9	7.9
Atum	4.6	18.3

Adaptado de Racine et al., 2007.

O ALA pode ser encontrado na farinha de linhaça, onde em 60 g da farinha contém 10 g de ALA (Faintuch, 2011).

Dietas ricas em Ômega-3 podem diminuir interleucina 6 e o nível de outras citocinas pró inflamatórias, tanto in vitro como in vivo. Além disto, Ômega-3 tem demonstrado acelerar o clareamento de quilomícrons de triglicérides, reduzindo efetivamente a concentração sérica (Alwayn et al., 2005). A suplementação dos ácidos graxos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) tem sido associada à redução plasmática da concentração de ácido araquidônico estimulador da via da ciclooxygenase, fato que atenua a resposta inflamatória (Serhan, 2005).

Os ácidos graxos Ômega-3 inibem competitivamente a atividade da via da ciclooxygenase (Lagarde et al., 1993), efeito que pode ser comparado ao de antiinflamatórios em determinadas doenças que envolvem processo inflamatório (Kelley, 2001). Assim, um dos nutrientes que vem se destacando no cenário científico sobre a DHGNA é o ácido graxo Ômega-3.

Com base nas evidências científicas podemos inferir que a ação do Ômega-3 atenuando o mecanismo fisiopatológico da DHGNA é, provavelmente multifatorial. Estudos sugerem que a suplementação dos ácidos graxos reduzem a ação de citocinas pro inflamatórias (Calder et al., 2001) promovem melhora do perfil lipídico (Mostad et al., 2008) e aumentam a sensibilidade periférica à insulina em pacientes diabéticos e com doença renal crônica (Delarue et al., 2004; Rasic-Milutinovic et al., 2007).

Estudo clínico que compara 19 pacientes com EHNA com 11 indivíduos normais controle, revela que pacientes com EHNA têm alta taxa de ácido graxo poliinsaturado de cadeia longa Ômega-6/Ômega-3 em seu fígado quando comparados com controle (Araya et al., 2004).

Estudo piloto em humanos e publicado em 2006, demonstrou que a utilização de ácido graxo Ômega-3, 1 g/dia, em 42 pacientes com DHGNA demonstrou redução significativa da AST, ALT, Gama-glutamil transferase (GGT), triglicérides, glicemia de jejum em relação ao controle (14 pacientes controles). Além disso, a ultrassonografia demonstrou melhora da ecotextura do fígado após ácidos graxos polinsaturados (AGPI) e redução da relação n6/n3 nos pacientes tratados, enquanto nenhuma mudança significativa ocorreu nos controles (Capanni et al., 2006). Outro estudo de 2008, utilizou ácido graxo Ômega-3 EPA isolado 2700 mg/dia por período de 12 meses demonstrando que melhora significativa da ALT e ácidos graxos séricos livres, receptor 1 e 2 do fator de necrose tumoral (TNF), ferritina e nível de tioredoxina, que podem refletir estresse hepático significativamente reduzido. Também 7 de 23 pacientes aceitaram realizar biópsia após a intervenção, os quais apresentaram melhora da esteatose hepática e fibrose, balonização hepatocitária e inflamação lobular em 6 pacientes; este trabalho avaliou segurança no uso da medicação, não apresentando nenhum efeito adverso, sendo medicação segura (Tanaka et al., 2008)

Pesquisas recentes com grãos de linhaça indicam que a semente de linhaça moída, fornece boa fonte de fibras solúveis e ALA (ácido α linolênico), dois nutrientes-chave associados a um risco reduzido de diabetes e doença

cardíaca coronariana (CHD). Linhaça inicialmente reduz o lipoproteína de baixa densidade (LDL-C), mas os efeitos não são sustentados em 10 semanas; os dados também sugerem que a linhaça melhora a sensibilidade à insulina, não afetando a resposta inflamatória ou estresse oxidativo (Bloedon et al., 2008). Além disso, outro estudo sugere que suplementação de linhaça ou nozes, pode melhorar a obesidade central (Wu et al., 2010) e suplementação linhaça resultou em modesto, mas melhora estatisticamente significativa no controle glicêmico de pacientes diabéticos tipo 2 (Pan et al., 2007).

O consumo de suplementos enriquecidos de ALA por 12 semanas foi suficiente para elevar EPA e DHA nos eritrócitos, o que demonstra a eficácia da conversão de ALA e acréscimo em eritrócitos. Resultados claramente indicam que 2,4 g de óleo de linhaça ao dia é suficiente para aumentar significativamente Fosfolípido RBC n-3 AF, o que sugere que efeito semelhante pode ocorrer em outros tecidos. Os valores de ALA necessário para obter estes efeitos são quantidades que podem ser facilmente obtidas na população em geral por modificação da dieta (Barceló-Coblijn et al., 2008).

1.6 Justificativa

Na EHNA, foram poucos os estudos realizados com ácidos graxos poli-insaturados Ômega-3 EPA/DHA; no entanto, nenhum com Ômega-3 derivado da linhaça. O ALA é mais disponível em nosso meio, de menor custo e utilizado atualmente na forma de grãos de linhaça, farinha, adicionado a alimentos ou na forma de suplementos alimentares em cápsula, como sendo boa fonte de gordura polinsaturada, com estudos que sugerem redução de obesidade central, triglicérides e melhora da glicemia (Pan et al., 2007; Bloedon et al., 2008; Wu et al., 2010).

Baseados nestes aspectos esta investigação prospectiva avaliou a eficácia do ácido graxo Ômega-3, derivado da linhaça e peixe, no tratamento de pacientes com EHNA.

2 OBJETIVOS

O presente estudo tem por objetivo

2.1 Primário

Determinar a eficácia do composto de ácidos graxos Ômega-3, derivado de linhaça e peixe, na redução do componente inflamatório hepático da EHNA através da histologia.

2.2 Secundário

Avaliar o impacto do tratamento com composto de ácidos graxos Ômega-3, derivado de linhaça e peixe nos exames laboratoriais séricos e parâmetros clínicos e antropométricos relacionados à doença EHNA.

3 MÉTODO

3.1 Pacientes e métodos

3.1.1 Características do estudo

Ensaio terapêutico randomizado, duplo cego, placebo controlado desenvolvido no ambulatório de estudo de DHGNA / EHNA do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brasil.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da diretoria clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Anexo A).

Registrado no Clinical Trials com identificação ID 01992809.

3.1.2 Determinação do tamanho da amostra

A determinação do tamanho amostral foi sob a estimativa da diferença entre as proporções de resposta do grupo placebo (P_1) e tratamento (P_2), as hipóteses foram:

$$H_0: P_1 - P_2 = 0 \quad \text{e} \quad H_1: P_1 - P_2 \neq 0$$

De acordo com o estudo realizado por Capanni et al. (2006) 64% dos pacientes tratados com medicação apresentaram alguma melhora. E os pacientes que não receberam medicação, segundo o presente estudo, não apresentaram nenhuma mudança na resposta.

Ainda neste estudo, os pacientes controles receberam placebo, supondo-se que a proporção de resposta poderia ser maior que a encontrada no trabalho de Capanni et al. (2006), assume-se então, que $P_1 = 15\%$ e $P_2 = 64\%$. Com isso,

o número de pacientes necessários para detectar uma diferença significativa entre as duas proporções P_1 e P_2 foi calculada de 14 pacientes por grupo, considerando um nível de significância de 5% e um poder de 80%.

Supõe-se também, durante o cálculo da amostra, que poderia haver 20% de perda de pacientes; então 17 pacientes para cada grupo deveriam ser incluídos no estudo. Acabamos optando pelo total de 60 pacientes devido à possibilidade de perda maior pela necessidade de procedimento invasivo no final do estudo (biópsia hepática).

O método utilizado para o cálculo foi baseado na diferença de proporção para uma distribuição binomial através da transformação arcseno (Cohen, 1988). Para o desenvolvimento do cálculo, foi utilizado o software R versão 2.3.1 no ano de 2008.

3.1.3 População

Foram documentados 60 pacientes com EHNA provenientes dos ambulatórios de Fígado e Nutrologia da Disciplina de Gastroenterologia Clínica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.1.4 Critérios de Inclusão

- Idade de 18-70 anos, ambos os sexos.
- Com ou sem diabetes não insulino-dependente ou intolerância à glicose.
- Ausência de alcoolismo <20 g (mulher) e <40 g (homem) de etanol/dia, toxicodependência, esquistossomose, hepatite B ou C e outras hepatopatias crônicas de causa determinada.
- Ausência de auto-anticorpos e com taxas de cobre e ceruloplasmina normais.

- Biópsia hepática de até 24 meses do início da intervenção, evidenciando esteatose, infiltrado inflamatório lobular e balonização de hepatócitos, podendo estar presente ou não os corpúsculos de Mallory e fibrose hepática estágio I, II e III, escore NAS>5 (Kleiner et al., 2005).
- Pacientes que aceitaram participar do estudo e assinaram o consentimento pós-informado.

3.1.5 Critérios de Exclusão

- Intoxicação exógena por agentes oxidantes.
- Gravidez e lactação.
- Tempo de protrombina <70% ou plaquetas <70 000/mm³, ou qualquer coagulopatia, inclusive alteração do tempo de sangramento.
- Recusa em colaborar com a pesquisa.
- Presença de esteatose sem sinal de inflamação ou balonização ou presença de cirrose (estadio IV) na biópsia hepática.
- Diabetes mellitus em uso de insulina.
- Alergia ao peixe ou linhaça.
- Uso de anti-inflamatório não hormonal.

3.1.6 Grupos de estudo

Randomização

Sequência de randomização com dois blocos de 30 pacientes cada (alocação 1:1) foi gerada por computador (software estatístico GraphPad, Graphpad, EUA), antes do início do estudo por uma nutricionista independente,

para atribuir aos participantes, quer ao grupo Ômega-3 ou placebo. Com exceção desta nutricionista independente, investigadores e pessoal clínico permaneceram cegos à atribuição de cada participante do estudo até o final da fase de análise estatística do estudo. Os pacientes foram incluídos no estudo seguindo esta seqüência de randomização. Os doentes foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos:

Grupo I / controle: 28 pacientes com de EHNA que receberam três cápsulas placebo com características semelhantes ao fármaco original;

Grupo II / estudo: 32 pacientes com EHNA que receberam cápsula contendo 945 mg de Ômega-3 em três cápsulas/dia.

Todos os pacientes receberam tratamento adequado para suas comorbidades quando iniciados até seis meses antes do protocolo; nenhum tratamento medicamentoso extra para EHNA foi oferecido durante período de estudo. Além disso, todos os pacientes foram orientados quanto à necessidade de perda de peso, dieta hipocalórica (para pacientes acima de sobrepeso >25 kg/m²) e hipogordurosa e quanto à necessidade de exercício físico; estas variáveis foram avaliadas mensalmente e registradas para possíveis vieses de análise.

3.1.7 Descrição das características da droga a ser utilizada

A substância ativa Ômega-3 foi composta por uma mistura de óleo de linhaça e óleo de peixe, em cápsulas de gel, contendo: 0,315 g PUFA: sendo 0,065 g n-3 EPA, 0,050 g n-3 DHA e 0,2 g alfa linolênico por cápsula. Total de 315 mg de Ômega-3 por cápsula de gel, sendo administrado 945 mg de Ômega-3 diariamente, sendo necessária ingestão de três cápsulas de gel por dia.

TABELA 3 - Composição de cada cápsula administrada ao grupo Ômega-3

Componente	Quantidade	Total ingerido / dia
Calorias (Kcal)	8	24
Carboidratos (g)	0	0
Proteínas (g)	0	0
Gordura total (g)	1	3
Gordura saturada (g)	0	0
Gordura monoinsaturada (g)	0	0
Gordura polinsaturada (g)	0,315	0,945
Ômega-3 EPA (g)	0,065	0,195
Ômega-3 DHA (g)	0,050	0,150
Ômega-3 ALA (g)	0,200	0,600
Colesterol (g)	0	0

Dados fornecidos pelo fabricante (Amway, Buena Park, California, USA).

Legenda: EPA - Ácido eicosapentaenóico; DHA - Ácido docosahexaenóico; ALA - Ácido alfa-linolênico.

3.1.8 Descrição das características do placebo a ser utilizado

Mesma cápsula de gel da droga, mesma coloração do Ômega-3, utilizando óleo mineral e com o mesmo desenho de frasco, sendo ingeridas também três cápsulas por dia.

3.1.9 Métodos

Desenho do Estudo: Ensaio terapêutico randomizado, duplo-cego, placebo controlado. Foi composto de duas fases:

Fase I - No ambulatório de Fígado e Nutrologia da Disciplina de Gastroenterologia Clínica do HC-FMUSP foram selecionados pacientes com

diagnóstico de doença gordurosa do fígado não alcoólica (EHNA) com biópsia hepática há no máximo 24 meses (devido à lenta evolução da DHGNA e EHNA), procedeu-se o questionário clínico com ênfase na correta caracterização dos critérios de inclusão e exclusão, provas bioquímicas a cada três meses e nova biópsia hepática ao término do estudo.

A biópsia hepática foi percutânea guiada por ultrassonografia em todos os pacientes e realizada na Disciplina Gastroenterologia da FMUSP. A avaliação histopatológica minuciosa dos fragmentos hepáticos e classificação foram realizadas segundo estadiamento histopatológico (NAS) por dois patologistas experientes de forma cega.

Fase II – Este foi um ensaio terapêutico, onde os pacientes foram incluídos de acordo com o grupo sorteado. Tiveram seguimento mensal dos parâmetros clínicos, antropométricos e trimestral dos bioquímicos. Repetiu-se a biópsia hepática seis meses após o início do tratamento preconizado.

3.2 Avaliação clínica

Foi aplicado um questionário onde foi cadastrado: modo do diagnóstico, fatores de risco associado incluindo classificação quanto à obesidade Índice de Massa Corpórea (IMC) ≥ 30 , segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1997) (o IMC foi calculado pela fórmula de Quetlet ($\text{IMC} = \text{peso em kg}/(\text{altura em m})^2$), síndrome plurimetabólica segundo critérios adotados por *AHA/NHLBI Scientific Statement, Circulation, 2005* (Grundy et al., 2005), para avaliação de resistência insulínica foi utilizado o *HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment-Insulin Resistance)* (Matthews et al., 1985). O HOMA-IR foi obtido utilizando a fórmula $\text{HOMA-IR} = \text{insulina de jejum } \mu\text{U/mL} \times \text{glicemia de jejum mmol/L}/22,5$. A glicemia obtida em mg/dL foi transformada em mmol/L, multiplicando-se o valor obtido em mg/dL por 0,05551.

A presença de comorbidades foram avaliadas. Foi realizado mensalmente recordatório alimentar, assim como registro quanto à atividade física para evitar viés na conclusão (Anexo D).

3.3 Exames Laboratoriais

3.3.1 Exames laboratoriais a cada três meses

AST, ALT, fosfatase alcalina (FA), GGT, bilirrubina total (BT), direta (BD) e indireta (BI), glicemia jejum, hemoglobina glicosilada, insulina, colesterol total e frações, triglicérides, proteína C reativa (PCR) e seroamilóide A.

3.3.2 Mediador inflamatório a cada três meses

IL6 - A concentração plasmática da IL-6 foi avaliada usando o Kit ELISA de IL-6 humano. Todas as medidas foram feitas em duplicata e utilizados valores médios.

3.3.3 Análise de ácidos graxos no plasma como prova de tratamento

Foi realizada cromatografia gasosa de lipídeos utilizando-se um cromatógrafo *Agilent 7890A GC chromatograph System and J&W DB-23* colunas of 60 m x 250 μ m x 0.15 μ m (Agilent, city, country), com amostras de plasma tomadas no início do estudo e após seis meses de tratamento. Os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram obtidos de acordo com o protocolo de Shirai et al. (2005). As condições cromatográficas foram definidas de acordo com Iverson et al. (2001), com algumas adaptações específicas para otimizar amostras do estudo de acordo com os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão e limites de detecção e quantificação: modo de

divisão de injeção, 50:1; temperatura do injetor, 250°C, temperatura do detector, 280°C, e a coluna cromatográfica, como mencionado acima. As condições de operação foram as seguintes: temperatura inicial da coluna, 80°C (um minuto), seguido por um aumento para 230°C (cinco minutos), com tempo total de execução de 45 minutos. Os ácidos graxos foram avaliados por normalização externa, utilizando padrões de referência (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EUA) para se obter a curva de calibração.

3.4 Biópsia hepática e avaliação histológica

Biópsia hepática guiada por ultrassonografia, por agulha de Trucute com cerca de 2cm foi colhida após seis meses de tratamento. Foram fixados fragmentos de tecido hepático foram fixados em formol salino a 10% e submetidos a colorações hematoxilina-eosina (HE), *Tricrômico de Masson*, *Perls* para pigmentos. Foram semi-quantificados de 0 a 3⁺ os seguintes parâmetros histológicos: esteatose micro e/ou macro, sua distribuição zonal, infiltrado inflamatório e sua distribuição zonal, fibrose portal e perivenular, necrose focal segundo com *NASH Clinical Research Network Scoring System (NAS)* (Kleiner et al., 2005).

3.4.1 Gradação das variáveis e do estadiamento histopatológico

As variáveis histopatológicas para atividade foram graduadas de acordo com o escore da atividade da DGHNA – *NAFLD Activity Score (NAS)* recentemente definida pelo *Pathology Committee of the NASH Clinical Research Network* (Kleiner et al., 2005) (Tabela 2), que incluem apenas características da lesão ativa e que reverte em curto espaço de tempo. O escore é definido pela soma dos graus de esteatose (0 a 3), inflamação lobular (0 a 3), e balonização (0 a 2). Os valores variam de 0 a 8. Os valores NAS ≥ 5 correlacionam-se com os do diagnóstico de EHNA e o escore menor que 3

diagnosticados não EHNA, e os valores de 3 e 4 podem ser alocados nas categorias de ausências, presença ou provável EHNA. A fibrose, que é menos reversível e resultante da atividade da doença, não está inclusa no escore. A separação da fibrose das outras variáveis histológicas facilita a compreensão quanto ao estadiamento (“grau de fibrose”) e o que indica a atividade necro-inflamatória (“escore”) na esteatohepatite não alcoólica.

Para a esteatose macro e microvesicular, na medida em que a porcentagem de hepatócitos infiltrados, a intensidade considerada foi: Grau 0, <5%; Grau I, >5% a 33%; Grau II, >33% e 66% e Grau III >66%.

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

O sistema de gradação utilizado foi o escore da atividade da DHGNA proposto pelo *Pathology Committee of the NASH Clinical Research Network(NAS)* (Kleiner et al., 2005). Os valores NAS ≥ 5 correlacionam-se com os do diagnóstico de EHNA e o escore menor 3 diagnosticados não EHNA e os valores de 3 e 4 podem ser alocados nas categorias de ausências, presença ou provável EHNA. O escore está representado na Tabela 4.

TABELA 4 – DHGNA: gradação das variáveis e do estadiamento histopatológico (NAS)

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

O escore da atividade da DHGNA (NAS) proposto pelo *Pathology Committee of the NASH Clinical Research Network* (Kleiner et al., 2005). Os valores NAS ≥ 5 correlacionam-se com o diagnóstico de EHNA e o escore menor 3 diagnosticados não EHNA, e os valores de 3 e 4 podem ser alocados nas categorias de ausências, presença ou provável EHNA.

3.5 Caracterização da população estudada

Sessenta pacientes foram eleitos para participar do presente estudo e distribuídos aleatoriamente em dois grupos, de acordo com o tratamento recebido: 1) grupo Ômega-3: suplementação oral com AGPI n-3 (n = 32); 2) grupo placebo: suplementação oral com óleo mineral (n = 28). No entanto, 10 destes 60 pacientes (grupo Ômega-3, n = 5; grupo placebo, n = 5) não completaram o estudo por diferentes razões, que incluíram dificuldade de comparecer às consultas (n = 3), recusa em repetir a coleta de biópsia no final do tratamento (n = 2), epigastralgia relacionada ao uso do placebo (n = 1), desequilíbrio psiquiátrico após abandono voluntário de medicações (n = 1), neoplasia de couro cabeludo (n = 1) e inviabilidade da biópsia hepática para análise histológica (n = 2). Desta forma, 50 pacientes concluíram o protocolo do presente estudo (grupo Ômega-3, n = 27; grupo placebo, n = 23) e seus dados foram considerados para as análises nele realizadas. A Figura 1 ilustra o fluxo de distribuição e análise dos pacientes estudados.

Figura 1 - Diagrama dos pacientes com diagnóstico de esteatohepatite não alcoólica randomizados para receber ingestão oral de ácido graxo Ômega-3 ou placebo (randomização, acompanhamento e parâmetros analisados por pacientes e grupo de estudo)

3.6 Avaliação da aderência à orientação e medicamento

Foi anotada a aderência ao exercício físico e recordatório alimentar de três dias antes da consulta.

Mensalmente foram trocados frascos de medicamento vazios por novo frasco, e dosado Ômega-3 plasmático inicial e em seis meses para avaliar a aderência.

3.7 Metodologia estatística

Análise exploratória dos dados foi realizada por meio do cálculo de medidas descritivas, gráficos de barras para a avaliação das qualitativas e box-plots para avaliação das variáveis quantitativas (Morettin; Bussab, 2002).

Para a comparação dos grupos no baseline foram utilizados os testes t (Morettin; Bussab, 2002), Mann-Whitney (Sprent; Smeeton, 2007) e Fisher (Agresti, 2012).

Para análise dos dados de biópsia, foram utilizados o teste de Wilcoxon para o estudo da alteração do escore intra grupo e o teste de Mann-Whitney para a alteração do escore entre grupo (Sprent; Smeeton, 2007) e, por fim, os percentuais de melhora e estabilidade ou piora do escore através do teste de Fisher. Além disso, os intervalos de confiança 95% para tais percentuais foram apresentados.

Para análise dos dados dos exames utilizaram-se os mesmos testes acima descritos.

A análise que avalia melhora dos pacientes relacionando biópsia e níveis de ácidos graxos no sangue, tanto para cada grupo separadamente como para a análise pos-hoc foi baseada no teste de Fisher.

Resumindo tanto teste t , Mann-Whitney e Fisher foram utilizados na comparação entre grupos, enquanto teste de Wilcoxon e t foram utilizados na análise de cada grupo separadamente.

As decisões foram baseadas em nível de 5% de significância.

O programa a ser utilizado para a realização da análise estatística foi o R versão 2.15.1.

4 RESULTADOS

4.1 Características da população estudada

Na Tabela 5, demonstram-se os dados do início do estudo (T0), onde são descritos os fatores demográficos, níveis bioquímicos séricos, lípides séricos, fatores metabólicos e achados da histologia hepática. Quanto aos dados demográficos da população estudada, a idade média do grupo placebo foi de $53,9 \pm 6,8$ anos e no grupo Ômega-3 foi de $52,5 \pm 7,2$ anos sem diferença estatística entre os grupos ($P= 0,47$), o sexo predominante foi o feminino em ambos os grupos, sendo 78,3% no placebo e 85,2% no Ômega-3, não constatando diferença estatística ($P= 0,72$). Analisando os fatores metabólicos dos grupos iniciais em estudo temos que a média do IMC no grupo placebo foi de $30,3 \text{ kg/m}^2$ ($20,82$ à $39,56 \text{ kg/m}^2$) e no grupo Ômega-3 $31,1 \text{ kg/m}^2$ ($24,22$ a $42,04 \text{ kg/m}^2$) sem diferença entre os grupos ($P= 0,93$). A circunferência da cintura média no grupo placebo é de $103,1 \text{ cm}$ (78 a 129 cm) e no grupo Ômega-3 de $104,6 \text{ cm}$ ($89,5$ a 130 cm) sem diferença entre eles ($P= 0,72$), a síndrome plurimetabólica está presente em 95,6% dos pacientes do grupo placebo e em 88,5% do grupo Ômega-3 sem diferença entre eles ($P= 1,00$), não se encontrou diferença estatística entre os grupos em relação aos lípides séricos, histologia hepática e nível bioquímico sérico, exceto pelo AST que é maior no grupo placebo ($P = 0,01$); no entanto, em ambos os grupos os níveis séricos médios (Tabela 7) não ultrapassam 3 vezes o valor de normalidade (31 U/L) e analisando os indivíduos isoladamente temos no grupo placebo valores de AST de 18 U/L a 76 U/L e no grupo Ômega-3 de 15 U/L a 82 U/L como se visualiza no Gráfico 1.

TABELA 5 - Características clínicas e laboratoriais de pacientes com esteatohepatite não alcoólica dos grupos placebo e Ômega-3 no início do estudo

Características	Placebo	Ômega-3	P-valor
Fatores demográficos			
Idade (anos)	53,9 ± 6,8	52,5 ± 7,2	0,47 *
Sexo feminino (%)	78,3	85,2	0,72 **
Nível bioquímico sérico			
Alanino aminotransferase (U/L)	46,8 ± 28,2	45,4 ± 35,3	0,27 ***
Aspartato aminotransferase (U/L)	37,9 ± 15,0	31,1 ± 16,7	0,01 ***
Y-glutamilttransferase (U/L)	65,9 ± 49,5	73,6 ± 87,5	0,57 ***
Fosfatase alcalina (U/L)	79,2 ± 26,6	88,1 ± 31,4	0,29 *
Bilirrubina total (mg/dL)	0,6 ± 0,2	0,7 ± 0,4	0,27 ***
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,98
Seroamiloide A (mg/L)	9,4 ± 6,1	8,6 ± 6,3	0,54
Proteína C reativa (mg/L)	5,7 ± 5,3	5,6 ± 6,3	0,89
Interleucina 6 (ng/L)	4,0 ± 2,6	4,3 ± 2,0	0,72 ***
Lípides séricos			
Triglicérides mg/dL	148,6 ± 44,7	165,6 ± 76,2	0,80 ***
Colesterol mg/dL			
Total	199,0 ± 46,3	199,4 ± 39,2	0,97 *
Lipoproteína de alta densidade	52,1 ± 14,2	50,6 ± 16,6	0,49 ***
Lipoproteína de baixa densidade	116,5 ± 39,5	117,7 ± 33,0	0,91 *
Fatores metabólicos			
Glicose sérica de jejum mg/dL	112,0 ± 29,6	103,6 ± 24,9	0,38 ***
Insulina sérica de jejum µU/dL	13,3 ± 4,6	14,3 ± 7,6	0,59 *
HOMA	3,7 ± 1,6	3,6 ± 2,0	0,86 *
Hb glicada %	6,7 ± 1,0	6,4 ± 0,9	0,32 ***
Peso (kg)	77,6 ± 10,1	76,9 ± 12,0	0,38 ***
Índice de massa corporal (kg/ m ²)	30,3 ± 4,4	31,1 ± 4,6	0,93 ***
Circunferência da cintura (cm)	103,1 ± 10,3	104,6 ± 11,1	0,72 ***
Síndrome plurimetabólica presente (%)	95,6	88,5	1,00 **
Achados da histologia hepática			
Escore total de atividade DHGNA	5,6 ± 1,4	5,0 ± 1,4	0,15 ***
Esteatose	2,2 ± 0,8	2,0 ± 0,8	0,34 ***
Inflamação lobular	1,7 ± 0,8	1,4 ± 0,7	0,28 ***
Balonização hepatocelular	1,7 ± 0,5	1,6 ± 0,5	0,32 ***
Estágio de fibrose	1,3 ± 1,0	1,1 ± 0,8	0,61 ***

Para cálculo estatístico do P foram realizados teste de *, ** Fisher, *** Mahn-Whitney

Legenda – Dados são expressos como média ± desvio padrão, exceto sexo e síndrome metabólica; DHGNA: doença hepática gordurosa não-alcoólica

GRÁFICO 1 – Resultado do nível sérico de AST em U/L por indivíduo de acordo com grupo de estudo

4.2 Características histológicas

Quando se compara o grupo placebo com o grupo Ômega-3 (Tabela 6) em relação à mudança de escore ou mudança das características histológicas pela análise percentual, considerando dois subgrupos comparáveis dentro do grupo placebo e Ômega-3, o grupo de pacientes que apresentaram estabilização ou melhora das características histológicas (grupo M) e outro grupo com piora das características (grupo P), não houve diferença estatísticas entre os dois grupos (placebo e Ômega-3) para nenhuma variável, NAS ($P = 0,80$; $P = 0,98$), esteatose ($P = 0,16$; $p = 0,50$), inflamação lobular ($P = 0,97$; $p = 0,99$), balonização hepatocelular ($P = 0,58$; $P = 0,99$) e fibrose ($P = 0,38$; $P = 0,16$), respectivamente.

Quando estas variáveis foram analisadas quanto à média de mudança de escore intragrupo, temos piora (valores positivos) da esteatose no grupo placebo (0,2) sem diferença estatística entre os grupos (placebo e Ômega-3) ($P = 0,16$), piora da inflamação lobular no grupo Ômega-3 (0,2) sem diferença entre os grupos ($P = 0,97$) e ambos os grupos pioraram média de fibrose ($P = 0,1$; $P = 0,1$), também sem diferença estatística entre os grupos ($P = 0,38$).

TABELA 6 - Mudanças na histologia hepática de pacientes com esteatohepatite não-alcoólica após 6 meses de ingestão oral de ácido graxo Ômega-3 ou placebo

Variável	Placebo	Ômega 3	P-valor
Resultados Primários			
Pacientes randomizados aleatoriamente	23	27	
Mudanças das características histológicas em relação ao basal			
Variável	Placebo	Ômega-3	P-valor
NAS			
Média de mudança em escore	-0.2 (1.2)	-0.04 (1.7)	0,80
Estável ou melhora (%)	78,3 (57,5-90,6)	55,6 (37,3-72,4)	0,98
Esteatose			
Média de mudança em escore	0,2 (0,7)	-0,1 (0,8)	0,16
Estável ou melhora (%)	73,9 (53,1-87,6)	77,8 (58,8-89,6)	0,50
Inflamação lobular			
Média de mudança em escore	-0,2 (0,7)	0,2 (0,8)	0,97
Estável ou melhora (%)	91,3 (71,8-98,6)	66,7 (47,7-81,4)	0,99
Balonização hepatocelular			
Média de mudança em escore	-0.2 (0.5)	-0.1 (0.7)	0,58
Estável ou melhora (%)	95.6 (77.0-100.0)	77.8 (58.8-89.6)	0,99
Fibrose			
Média de mudança em escore	0.1 (0.9)	0.1 (0.7)	0,38
Estável ou melhora (%)	60.9 (40.7-77.8)	77.78 (58.8-89.6)	0,16

Legenda: dados são expressados como média (intervalo de confiança)

4.3 Variáveis bioquímicas e antropométricas

Dentre as variáveis bioquímicas, observou-se que após 3 meses de tratamento, os níveis de TG (triglicérides) melhorou ou se manteve estável em 66,6% no grupo Ômega-3 contra 30,4% no grupo placebo, com diferença estatística entre os grupos ($P = 0,01$), em 6 meses mesmo com porcentagem de melhora ou estabilidade maior, sendo 51,8% no grupo tratamento contra 30,4% no grupo placebo, não se observou diferença estatística ($P = 0,11$) (Tabelas 7 e 8). A ALT apresenta maior melhora ou estabilização no grupo placebo (73,9%) quando comparado com 40,7% no Ômega-3; no entanto não mostra diferença estatística em 3 meses ($P = 1,0$) e em 6 meses ($P = 0,98$), onde placebo se manteve melhora ou estável em 60,9% e Ômega-3 34,6% (Tabelas 7 e 8). Não foram observadas alterações significantes nas aminotransferases séricas, perfil lipídico, metabolismo da glicose, níveis plasmáticos de IL6 e parâmetros antropométricos intra ou entre grupos (Tabela 7).

TABELA 7- Mudanças nos resultados antropométricos e bioquímicos de pacientes com esteatohepatite não-alcóolica após 3 e 6 meses de ingesta oral de ácidos graxos Ômega-3 ou placebo

Variável	Pacientes com melhora ou estabilidade após 3 meses - % (CI 95%)*			Pacientes com melhora ou estabilidade após 6 meses - % (CI 95%)*		
	Placebo	Ômega-3	P valor	Placebo	Ômega-3	P valor
Antropométrica						
IMC	47.8 (29.3–67.0)*	57.7 (38.9–74.4)*	0,34	47.8 (29.3–67.0)*	57.7 (38.9–74.4)*	0,34
Peso	47.8 (29.3–67.0)*	57.7 (38.9–74.4)*	0,34	47.8 (29.3–67.0)*	57.7 (38.9–74.4)*	0,34
CC	72.7 (51.49–87.0)*	70.6 (46.5–86.8)*	0,69	45.0 (25.9–65.8)*	64.7 (41.1–82.7)*	0,19
Bioquímica						
Hemoglobina glicosilada	65.2 (44.7–81.2)*	57.7 (38.9–74.4)*	0,80	77.3 (56.0–90.1)*	64.0 (44.4–79.7)*	0,91
FA	69.6 (48.9–84.4)*	59.3 (40.7–75.4)*	0,85	47.8 (29.3–67.0)*	61.5 (42.5–77.5)*	0,25
GGT	47.8 (29.3–67.0)*	50.0 (32.1–67.9)*	0,55	47.8 (29.3–67.0)*	38.5 (22.5–57.5)*	0,83
CT	43.5 (25.7–63.2)*	40.7 (24.6–59.3)*	0,68	39.1 (22.2–59.3)*	38.5 (22.5–57.5)*	0,63
HDL	60.9 (40.7–77.8)*	70.4 (51.3–84.0)*	0,34	60.9 (40.7–77.8)*	50.0 (32.1–67.9)*	0,85
LDL	47.8 (29.3–67.0)*	40.7 (24.6–59.3)*	0,78	34.8 (18.8–55.2)*	33.3 (18.6–52.3)*	0,66
TG	30,4 (15.55-51.11)*	66.6 (47,67-81,36)*	0,01	30,4 (15,55-51,11)*	51,8 (34,02-69,2)*	0,11
PCR	52.6 (31.8–72.6)*	62.5 (42.6–78.8)*	0,37	40.0 (21.9–61.4)*	52.2 (33.0–70.7)*	0,31
Seroamilóide A	41.7 (19.4–68.1)*	46.1 (23.3–70.8)*	0,57	22.2 (5.6–55.9)*	50.0 (25.5–74.5)*	0,20
BT	69.6 (48.9–84.4)*	48.1 (30.8–66.0)*	0,97	73.6 (53.1–87.6)*	42.3 (25.6–61.1)*	0,99
BD	69.6 (48.89–84.45)*	59.3 (40.7–75.4)*	0,85	82.6 (62.1–93.5)*	46.1 (28.8–64.5)*	1,00
Insulina	39.1 (22.2–59.3)*	57.7 (38.9–74.4)*	0,16	47.8 (29.3–67.0)*	38.5 (22.5–57.5)*	0,83
Glicose	63.6 (42.8–80.2)*	40.7 (24.6–59.3)*	0,97	52.2 (33.0–70.7)*	30.8 (16.5–50.2)*	0,96
AST	78.3 (57.5–90.6)*	40.7 (24.6–59.3)*	1,00	60.9 (40.7–77.8)*	26.9 (13.6–46.4)*	1,00
ALT	73.9 (53.1–87.6)	40.7 (24.6–59.3)	1,00	60.9 (40.7–77.8)*	34.6 (19.4–53.9)*	0,98
IL-6	47.1 (26.2–69.0)*	57.9 (36.3–76.8)	0,38	41.2 (21.7–64.0)*	52.6 (31.8–72.6)*	0,36

Média de 3 e 6 meses em relação ao basal

Legenda: IMC Índice de massa corporal; CC Circunferência de cintura; AST aspartato aminotransferase; ALT alanino aminotransferase; FA Fosfatase alcalina; GGT Gama-glutamyl transferase; CT Colesterol total; HDL lipoproteína de alta densidade; LDL: Lipoproteína de alta densidade; TG triglicérides; PCR proteína C reativa; BT bilirrubina total, BD bilirrubina direta, HOMA – IR Homeostasis model assessment – Insulin resistance; IL6 interleucina 6

TABELA 8 - Tabela exames-comparação da melhora ou estabilidade e piora em percentual dos pacientes dos parâmetros triglicérides (TG) e alanina aminotransferase (ALT) em 3 e 6 meses em relação ao tempo 0

Evolução	Placebo				Ômega-3			
	Percentual	n	IC 95%		Percentual	n	IC 95%	
Triglicérides em 3 meses								
Piorou	69,5	23	48,9	84,4	33,3	27	18,6	52,3
Melhorou ou estável	30,4		15,5	51,1	66,6		47,6	81,3
Triglicérides em 6 meses								
Piorou	69,5	23	48,9	84,4	48,1	27	30,8	65,9
Melhorou ou estável	30,4		15,5	51,1	51,8		34,0	69,2
ALT em 3 meses								
Piorou	26,1	23	12,4	46,8	59,2	27	40,7	75,4
Melhorou ou estável	73,9		53,1	87,6	40,7		24,5	59,3
ALT em 6 meses								
Piorou	39,1	23	22,2	59,2	65,4	26	46,1	80,6
Melhorou ou estável	60,9		40,7	77,8	34,6		19,4	53,9

Variável	* P-valor
TG_3 meses	0,01
TG_6 meses	0,11
ALT_3 meses	1,00
ALT_6 meses	0,98

*P valor analisado pelo teste de Fisher

Analisando o Gráfico 2, a média do TG no grupo Ômega-3 era inicialmente de 165,5 mg/dL, reduzindo para 141,5 mg/dL redução de 24,0 mg/dL em 3 meses ($P = 0,01$) e para 154,3 mg/dL redução de 11,2 mg/dL em 6 meses ($P = 0,22$) comparando com placebo apresentou diferença significativa em 3 meses ($P = 0,003$) e tendência à significância em 6 meses ($P = 0,088$).

Gráfico 2- Mudança no triglicérides sérico dos pacientes com esteatohepatite não-alcoólica no basal, 3 e 6 meses após a ingestão oral de AGPI Ômega-3 ou placebo

* Ômega-3 vs placebo em 3 meses; Δ Ômega-3 vs placebo em 6 meses

4.4 Ácidos graxos plasmáticos

O Ômega-3 plasmático, foi utilizado no presente estudo como prova de tratamento, sendo que foi dosado em 27 pacientes do grupo tratamento e em 22 pacientes do grupo placebo. Avaliando intragrupo temos que no período de 6 meses de acompanhamento, o grupo tratamento, apresentou aumento significativo do ALA ($P = 0,014$), EPA ($P = 0,016$), do Ômega-3 total ($P = 0,021$), da relação Ômega-3/Ômega-6 ($P = 0,018$) e redução do ARA ($P = 0,028$), enquanto que no grupo placebo encontrou-se aumento do Ômega-3 nas formas de EPA ($P = 0,030$), DHA ($P = 0,036$), do Ômega-3 total ($P = 0,006$), relação Ômega-3/Ômega-6 ($P = 0,007$), o que comprova que o grupo placebo de alguma forma ingeriu também Ômega-3 através da alimentação ou comprando por conta própria o medicamento à base de óleo de peixe.

Avaliando o Ômega-3 plasmático entre grupos tratamento e placebo temos diferença entre os grupos em relação ao ARA ($P = 0,03$) que reduziu no grupo “tratado com Ômega-3”.

Legenda: * baseline x 6 meses grupo tratamento ômega 3 intragrup; # baseline x 6 meses grupo placebo intragrup; § baseline x 6 meses grupo omega3 / placebo entregrup

Figura 2 - Concentração plasmática de (A) ácido alfa-linolênico, (B) ácido eicosapentaenóico, (C) ácido docosahexaenóico, (D) ácido araquidônico, (E) ácidos graxos Ômega-3 total, (F) relação Ômega-3 / Ômega-6 de pacientes com esteatohepatite não-alcóólica no tempo 0 e após seis meses de tratamento com ácido graxo Ômega-3 (n-3) ou placebo

4.5 Análise post hoc

Observou-se com a dosagem do Ômega-3 plasmático que os pacientes do grupo placebo também ingeriram o ácido graxo poliinsaturado Ômega-3; Devido ao consumo de Ômega-3 pelo grupo placebo, optou-se por desconsiderar o duplo cego e fazer nova análise estatística baseada no aumento de Ômega-3 plasmático e comparar com melhora histológica das variáveis NAS e encontramos que, em um total de 49 pacientes avaliados, o aumento do DHA plasmático estava positivamente relacionado com a melhora ou estabilização da inflamação lobular em seis meses de estudo ($P = 0,014$).,

Não se encontrou correlação de melhora das outras variáveis histológicas com qualquer dos outros tipos de Ômega-3.

Legenda: Δ diferença pós – pré da concentração plasmática de (ALA) ácido alfa-linolênico (EPA) ácido eicosapentaenoico, (DHA) ácido docosahexaenoico, e (ARA) ácido araquidônico nos pacientes com esteatohepatite não alcoólica correlacionando com (M ou E) melhora ou estabilização do grau de inflamação ou (P) piora da inflamação em relação à (%) da população analisada; p = baseline x 6 meses

FIGURA 3 - Alteração dos níveis plasmáticos de AGPI entre os períodos pré e pós tratamento de pacientes

5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo indicam que o período de seis meses de suplementação com AGPI n-3 a partir de composto de óleo de linhaça e peixe foi suficiente para aumentar as concentrações de ALA e EPA nos pacientes EHNA. No entanto, o aumento dos níveis plasmáticos de EPA e DHA também foi observado em pacientes tratados com placebo. Considerou-se que este dado é altamente sugestivo da ingestão do Ômega-3 fora do protocolo por pacientes tratados com placebo. Este evento pode ter prejudicado o estudo em determinar possíveis benefícios na histologia hepática no grupo tratado com AGPI n-3 e destacar a complexidade da suplementação alimentar mesmo em ensaios clínicos de intervenção. Reanalizando os dados, observou-se correlação significativa entre a melhora da NAS em ambos os grupos, quando correlacionado com o aumento dos níveis plasmáticos de ALA nos doentes tratados com ômega-3 e com aumento dos níveis plasmáticos de EPA e DHA no grupo tratado com placebo; também uma análise post-hoc mostrou uma correlação significativa entre o aumento dos níveis plasmáticos de DHA e melhora da inflamação lobular na amostra total do paciente. Estes resultados indiretos apoiam os potenciais benefícios histopatológicos descritos em ensaios clínicos anteriores usando EPA purificado ou EPA associado à DHA para tratar pacientes EHNA e do método de ultrassonografia para avaliar os seus efeitos no fígado (Capanni et al., 2006; Tanaka et al., 2008).

5.1 Desenho do estudo

No presente estudo, AGPI n-3 derivado de ambos os óleos, linhaça e peixe, foi utilizado para suplementar pacientes com EHNA. Esta combinação, ao invés do suplemento utilizado frequentemente, derivado do óleo de peixe, foi considerada devido à elevada disponibilidade de ALA, um renovável, sustentável e abundante AGPI n-3 encontrado na semente de linhaça e outras fontes vegetais, o que potencialmente poderia reduzir custo do tratamento;

também, devido ao menor grau de insaturação, o ALA é menos vulnerável à oxidação, quando comparado ao EPA e DHA, e pode ser convertido em EPA e em menor quantidade em DHA, 12 semanas após ingestão (Harper et al., 2006; Barceló-Coblijn et al., 2008). ALA demonstrou vantagens na redução do risco de diabetes e doença cardíaca coronária, diminuição do colesterol LDL, melhorando a sensibilidade à insulina em adultos com hiperlipidemia, melhorando o controle glicêmico de pacientes diabéticos tipo 2 e redução de comorbidades relacionadas à obesidade, que são importantes comorbidades relacionadas à fisiopatologia da EHNA (Pan et al., 2007; Bloedon et al., 2008; Wu et al., 2010; Fukumitsu et al., 2013).

O perfil de cromatografia de ácidos graxos no plasma foi analisado para comprovar a adesão ao tratamento. Estes dados confirmam a ingestão eficaz destes ácidos graxos por pacientes do grupo tratado com a demonstração dos níveis séricos mais elevados de EPA, principalmente de ALA, demonstrando redução no ácido araquidônico plasmático nos pacientes do grupo Ômega-3. A falta de aumento significativo dos níveis de DHA pode ser uma consequência da baixa quantidade fornecida deste AGPI no suplemento estudado, além da baixa conversão do ALA.

Estes resultados podem ser relevantes, levando-se em consideração que os pacientes com EHNA apresentam menores valores de AGPI e quantidades mais elevadas de AGPI n-6, bem como o aumento da razão AGPI n-6 / n-3 no fígado, em comparação com indivíduos saudáveis, o que sugere possível papel de desequilíbrio desses ácidos graxos na fisiopatologia da EHNA (Araya et al., 2004).

A avaliação de agentes terapêuticos para EHNA é um processo complexo, porque não há biomarcadores validados para resposta ao tratamento e se deve contar com a avaliação histológica de uma amostra de biópsia do fígado para esta finalidade. A redução do escore de atividade NAS que quantifica: a gravidade da esteatose, balonização hepatocelular e inflamação devem ser avaliadas, pois demonstra que ocorreu melhora da doença. No entanto, a gravidade destes componentes (especialmente a

esteatose hepática) pode também diminuir com a progressão da fibrose (Sanyal et al., 2010). Por este motivo avaliou-se, não só o escore (NAS), mas também todas as variáveis separadamente como esteatose (0 a 3), inflamação lobular (0 a 3), fibrose (0 a 4) e balonização (0 a 2) e adicionada acompanhamento clínico como presença de síndrome plurimetabólica, peso, IMC, circunferência cintura, e laboratorial como exames bioquímicos de função hepática (AST, ALT, FA, GGT, BT, BD), lípides séricos (CT, HDL, LDL, TG), marcadores inflamatórios (PCR, SAA, IL6) e metabolismo da glicose (glicemia de jejum, insulina, HOMA, Hb glicosilada).

5.2 Resultados histológicos

Na avaliação histológica, não observamos após 6 meses, de uso de ômega 3, nenhuma melhora histológica intragrupo ômega 3 nas gradações de NAS ($P = 0,528$), esteatose ($P = 0,249$), inflamação lobular ($P = 0,878$), balonização ($P = 0,229$), fibrose ($P = 0,889$) ou comparando Ômega-3 e placebo NAS ($p = 0,805$), esteatose ($P = 0,163$), inflamação lobular ($P = 0,974$), balonização ($p = 0,583$), fibrose ($P = 0,585$), estes resultados não coincidem com os de Tanaka et al. (2008), onde os autores, avaliando a histologia de 7 pacientes de um total de 23 pacientes em estudo clínico não controlado que aceitaram submeter-se à biópsia hepática após uso de 2,7g de EPA purificado por 12 meses, apresentaram melhora da esteatose e fibrose, balonização do hepatócito e inflamação lobular (Tanaka, 2008). Contudo, o estudo de Tanaka et al. (2008) utilizou apenas EPA em quantidade e tempo superior ao do presente estudo, além de ter sido não randomizado e apresentar um número muito pequeno de pacientes que foram re-biopsiados não aleatoriamente.

A metanálise Parker, encontrou benefício na redução da gordura hepática com uso do AGPI Ômega-3 inclusive na sub análise apenas com ensaios clínicos randomizados ($P < 0,001$). No entanto, a maioria dos estudos utilizou a ultrassonografia que é examinador dependente para avaliação da gordura hepática (Parker, 2012). O presente estudo avaliou a gordura hepática

por biópsia pré e após 6 meses do uso Ômega-3 não encontrando melhora intragrupo ($P = 0,249$) ou quando comparado o grupo Ômega-3 com placebo ($P = 0,163$).

A evolução EHNA pode ser lenta e indolente em alguns casos ou mais agressiva em outros; é possível que 6 meses de suplementação de AGPI n-3, seja um período curto para se observar benefícios histopatológicos. Spadaro et al. (2008), após suplementar com AGPI n-3, pacientes com EHNA por período idêntico, também observaram a regressão total da esteatose hepática em 33,4% dos pacientes e redução global da esteatose hepática em 50%, enquanto que nenhum paciente obteve regressão total no grupo controle, avaliado por ultrassonografia abdominal. Estes mesmos autores utilizaram o dobro da dose de AGPI n-3 do que o utilizado no presente estudo.

É importante ressaltar que se observou nos pacientes desta série do grupo controle (grupo placebo) aumento dos níveis plasmáticos de ácidos graxos Ômega-3, principalmente EPA e DHA, sugestivos de ingestão do Ômega-3 fora do protocolo. Para melhor avaliação dos doentes estudados, foram realizadas análises posteriores, correlacionando a dosagem plasmática de ALA, EPA, DHA e ARA com os achados histológicos, considerando o tratamento recebido ou não (post-hoc). Encontrou-se correlação entre a melhoria do escore NAS e aumento dos níveis plasmáticos de ALA no grupo Ômega-3 (pacientes tratados), e com aumento de EPA e DHA no grupo placebo. Curiosamente, estes AGPI foram aqueles que tinham aumentado de forma significativa, em cada grupo, exceto para o EPA que também aumentou no grupo Ômega-3 e mostraram apenas tendência para melhorar a pontuação do NAS neste grupo. Além disso, foi encontrada correlação significativa entre o aumento dos níveis plasmáticos de DHA e melhora da inflamação lobular, independentemente do tratamento recebido (post-hoc).

Em conjunto, os achados histológicos sugerem que a histologia hepática de pacientes EHNA pode melhorar ou estabilizar naqueles que aumentaram o Ômega-3 plasmático, principalmente na forma de melhora da inflamação lobular pelo AGPI DHA. No entanto, mais estudos são necessários, já que o

modelo deste estudo não foi capaz de confirmar diretamente essa possibilidade dado que o grupo placebo também ter ingerido Ômega-3, e reforçando a importância de analisar o perfil de AGPI Ômega-3 em pacientes em tratamento com este, como um marcador de adesão do paciente ao tratamento e em posteriores estudos levar em consideração a ingestão alimentar de Ômega-3, excluindo o mesmo da dieta na suplementação, já que o salmão grelhado contém 1458,20 mg/100 g (Racine et al., 2007) e o ALA pode ser encontrado na farinha de linhaça, que contém em 60 g que 10 g de ALA (Faintuch, 2011).

5.3 Resultados dos desfechos secundários

O perfil de vários marcadores bioquímicos de função hepática e metabolismo da glicose já foi relatado anteriormente por outros estudos após suplementação de AGPI n-3 em ENA, sendo que no presente estudo não mostrou diferença estatística significativa entre os grupos. Em estudo piloto em seres humanos, os pacientes com ENA receberam suplementação de AGPI n-3 EPA e DHA e demonstraram, ao final do estudo, redução significativa do AST, ALT, GGT, triglicérides e glicose de jejum, quando comparado com o controle. Além disso, os pacientes suplementados mostraram aumento dos níveis plasmáticos de AGPI, índices menores de AGPI n-6: n-3 e melhoria na ecotextura do fígado pela ultrassonografia não ocorreram, no entanto, mudanças significativas nas mesmas variáveis no controle (Capanni, 2006). Outro ensaio clínico randomizado em pacientes EHNA também encontrou redução na ALT, nos níveis de triglicérides e nos níveis séricos do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), bem como no HOMA-IR após suplementação AGPI n-3 (2 g/dia) (Spadaro et al., 2008).

No que se refere as aminotranferases, analisando-se resultados da metanálise de Parker et al. (2012), observa-se que o uso de Ômega-3, quando realizada a primeira análise, traz benefício AST (p 0,02) e tendência a benefício em relação ao ALT (p 0,063). No entanto, quando realizada sub

análises apenas com ensaios clínicos randomizados, o benefício deixa de ser demonstrado AST ($P = 0,28$) e ALT ($P = 0,74$) (Parker et al., 2012). Na presente série, que se trata de um ensaio clínico randomizado, semelhante à subanálise da metanálise de Parker, não se observou benefício na AST ($P = 1,00$) ou ALT ($P = 0,98$) entre os grupos Ômega-3 e placebo após 6 meses, o que pode ter ocorrido devido aumento do Ômega-3 no grupo placebo. Esta pode ser a maior dificuldade dos estudos em demonstrar o real benefício desta suplementação.

Outros mecanismos emergentes na patogênese da EHNA incluem o papel do tecido adiposo na secreção de citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α (Masterton et al., 2010). No presente estudo, não foram observadas alterações nos níveis plasmáticos de IL-6, avaliadas como um marcador inflamatório sistêmico. Igualmente, outro estudo com pacientes diagnosticados com síndrome metabólica e suplementados com altas e baixas doses de óleo de linhaça ou de peixe por 8 semanas, não modificou os níveis de IL-6, independentemente da dose ou tipo de AGPI n-3 fornecido (Dewell et al., 2011).

Resultado positivo neste estudo, o que é consistente com a literatura, foi a redução nos níveis séricos de triglicérides após 3 meses de tratamento com AGPI n-3 (Capanni et al., 2006; Spadaro et al., 2008). Outro estudo em 2011, utilizando uma dose maior de Ômega-3, derivado do óleo de peixe 3,5 g ou óleo de linhaça 3,5 g utilizados isoladamente por 6 semanas, demonstraram redução significativa dos triglicérides séricos em relação ao valor inicial para ambas fontes de suplementações (Vargas et al., 2011). De acordo com a Associação Americana para Estudos do Fígado (AASLD), uma opção de tratamento dos triglicérides elevado em pacientes com EHNA são os AGPI Ômega-3 derivado de peixe (Chalasani et al., 2012). Quando comparado com a população geral, pacientes com esteatose hepática e, principalmente, EHNA apresentam risco aumentado de aterosclerose e doença cardiovascular (DCV) como principais causas de morte (Janczyk et al., 2013). Este benefício pode ser relevante para o desfecho clínico de pacientes EHNA, uma vez que a maioria dos pacientes tem associada síndrome metabólica.

5.4 Limitações do estudo

Este estudo possui algumas limitações:

- A principal é de que o grupo placebo ingeriu AGPI n-3 fora do protocolo, talvez dificultem este tipo de estudo a quantidade e disponibilidade deste ácido nos alimentos de fácil acesso.

- A ausência de padronização dos protocolos utilizando AGPI n-3 em EHNA, dificulta estabelecer o impacto real destes ácidos graxos no tratamento desta doença. Por exemplo, Parker em 2012, realizou meta-análise avaliando o uso AGPI Ômega-3 e EH nos 9 estudos clínicos onde foram avaliados 355 pacientes diagnosticados com EH. O tipo de Ômega-3 utilizado e sua origem nem sempre foi especificado (peixe, foca, alga, linhaça, castanhas) seis estudos quantificam com grande variação (0,83 g para 13,7 g) e duração (variando de 8 semanas à 12 meses) (Parker et al., 2012). Optou-se por utilizar uma mistura de duas fontes de AGPI n-3, linhaça e peixe, com quantidade e tempo específico de suplementação, o que pode não representar a ideal. No entanto, como demonstrado, a literatura também é bastante conflitante nestes aspectos.

6 CONCLUSÕES

- Os AGPI Ômega-3, composto da mistura de óleo de linhaça e peixe, não melhorou sua histologia após 6 meses quando comparados ao placebo;
- Houve correlação significativa entre o aumento dos níveis plasmáticos de DHA e melhora da inflamação lobular, independentemente do tratamento recebido;
- Os AGPI Ômega-3, composto da mistura de óleo de linhaça e peixe, não melhorou a função hepática, os marcadores do metabolismo de glicose ou os níveis séricos de IL-6 após 6 meses;
- A suplementação com AGPI Ômega-3, composto da mistura de óleo de linhaça e peixe, mostrou impacto significativo no perfil lipídico de pacientes com EHNA, aumentando os níveis plasmáticos de AGPI Ômega-3 e reduzindo o AA, que possui ação pró-inflamatória;
- A suplementação com AGPI Ômega-3, composto da mistura de óleo de linhaça e peixe, reduziu os níveis séricos de triglicérides em três meses no grupo tratado.

6 ANEXOS

ANEXO A – Aprovação CAP Pesq **APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 16/09/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0681/09**, intitulado: "**ACIDO GRAXO OMEGA 3 NO TRATAMENTO DA ESTEATOHEPATITE NÃO ALCOÓLICA (NASH)**" apresentado pelo Departamento de **GASTROENTEROLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Dra Cláudia Pinto Marques Souza de Oliveira**
Pesquisador (a) Executante: **Dra Monize Aydar Nogueira Santos**

CAPPesq, 16 de Setembro de 2009

PROF. DR. CLAUDIO LEONE
Vice-Presidente da Comissão Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

hf

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL****IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU SEU RESPONSÁVEL LEGAL****PACIENTE****NOME:****DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº****SEXO :** .M ☐ F ☐**DATA DE NASCIMENTO:****Endereço residencial****Nº****APTO:****BAIRRO:****CEP:****CIDADE:****ESTADO:****TELEFONE: DDD ()****RESPONSÁVEL LEGAL****NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador, etc)****DADOS SOBRE A PESQUISA**

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Ácido graxo Omega 3 no Tratamento da esteatohepatite não alcoólica (EHNA).

PESQUISADOR EXECUTANTE: Dra Monize Aydar Nogueira

CARGO/FUNÇÃO: médica **INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL:** Nº 102163.

UNIDADE DO HCFMUSP: ICHC Departamento de Gastroenterologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO**RISCO MÉDIO X****RISCO BAIXO****RISCO MAIOR**

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 6 meses

1 – Desenho do estudo e objetivo(s):

Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa avaliar o medicamento Ômega 3 (ácido graxo ômega 3); esta droga, apesar de ser segura e já ser utilizada no mercado para várias doenças como triglicérides alto, ainda está sob investigação para doença gordurosa do fígado não alcoólica. Este estudo se destina a avaliar o efeito protetor desta droga para o seu fígado, com o objetivo de reduzir o depósito de gordura e a inflamação presente na biópsia prévia.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros;

A pesquisa consistirá em um estudo completo do seu fígado abrangendo perguntas gerais, breve exame físico e coleta de sangue para exames laboratoriais. Para você ter sido selecionado a participar do estudo, você já deverá ter realizado uma biópsia hepática prévia por indicação clínica até dois anos do início do estudo. Necessitará de uma nova biópsia hepática após seis meses de tratamento, nos quais utilizará 3 cápsulas ao dia (medicamento ou placebo), sendo que a cada 3 meses serão realizados exames de sangue. As consultas médicas serão realizadas mensalmente.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados:

Punção de veia periférica do antebraço para coleta de sangue realizada com agulha de fino calibre. A retirada de um pedacinho do fígado (biópsia hepática) será realizada guiada por ultrassonografia, sob anestesia local e sedação, não se esperando nenhuma consequência indesejável. Você pode apresentar algum desconforto ou dor no abdome durante a realização da biópsia hepática. Existe um risco médio de complicações maiores após realização de biópsia hepática como sangramentos e risco de vida.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3;

A entrevista e o exame físico deverão ter uma duração média de 15-20 minutos, os desconfortos da colheita de sangue serão os mesmos de qualquer outro exame laboratorial, incluindo desconforto no local da punção, flebite, hematoma, na retirada do pedacinho do fígado; você pode apresentar algum desconforto ou dor no abdome durante a realização e após; em porcentagem bastante inferior temos pressão baixa por reflexo vaso-vagal. Existe um risco médio de complicações maiores após realização de biópsia hepática como sangramento, peritonite biliar (inflamação na barriga devido a lesão da vesícula biliar) e perfuração de vísceras, as duas últimas tem probabilidade muito reduzida devido a biópsia ser realizada por Ultrassom.

5 – Benefícios para o participante

A existência de problemas no fígado será identificada, e esta informação poderá trazer benefícios sob a forma de orientação ambulatorial mais eficaz e melhora da esteatose e inflamação. Não há garantia dos benefícios que possam resultar da sua participação neste estudo, mas o conhecimento adquirido neste estudo poderá beneficiar outras pessoas. Existe possibilidade de que haja redução da quantidade de gordura no seu fígado utilizando esta droga como demonstrado previamente em estudo clínico piloto, enquanto o placebo não modifica a história da doença.

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar;

Os exames de sangue e de imagem, mais poderão não revelar as alterações do fígado, que só aparecem pela biópsia.

7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas.

A principal investigadora é o Dra. Monize Aydar Nogueira e os orientadores são Dra. Cláudia Pinto Marques Souza de Oliveira e Dr. Dan L. Waitzberg que podem ser encontrados no endereço Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, localizado na Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 255 - 9º andar-sala 9159- Cerqueira César- São Paulo-SP- CEP: 05403-900 Telefone(s) 30696447. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel.: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappelq@hcnnet.usp.br

- 8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;
- 9 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;
- 10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;
- 11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa;
- 12 – Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas;
- 13 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa;

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Ácido graxo Omega 3 no Tratamento da esteatohepatite não alcoólica(EHNA)"

Eu discuti com a Dra. Monize Aydar Nogueira, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizadas e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concorde voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

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

(Somente para o responsável do projeto)

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

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____

ANEXO C – Dados de relevância para o estudo**DATAS IMPORTANTES**

V-1) levantamento ambulatorial de pacientes e biópsias hepáticas		
V 0) seleção ambulatorial dos pacientes segundo critérios de inclusão e exclusão		
V 1) inclusão do paciente (conforme randomização) na pesquisa 0 dias (avaliação clínica, exames laboratoriais e início do medicamento)		
V 2) 30 dias (avaliação clínica e troca de frasco de medicação)		
V 3) 60 dias (avaliação clínica e troca de frasco de medicação)		
V 4) 90 dias (avaliação clínica, exames laboratoriais e troca de frasco de medicação)		
V 5) 120 dias (avaliação clínica e troca de frasco de medicação)		
V 6) 150 dias (avaliação clínica e troca de frasco de medicação)		
V 7) 180 dias (avaliação clínica, exames laboratoriais e biópsia hepática)		

ANEXO D – Questionário Médico**FICHA CADASTRAL DO PROTOCOLO DE PESQUISA EHNA E OMEGA-3**

Nome: _____ RG-HC: _____

Data Nasc: _____ Sexo: () masc. () fem.

Endereço: _____

Telefone: _____

Data: _____

Motivo do encaminhamento:

- () Esteatose hepática por método de imagem (USG, TC, RNM)
() Alteração de enzimas hepáticas (TGO, TGP, FA, GGT)
() achado esteatose em biópsia hepática durante cirurgia abdominal
() outros: _____

Fatores de risco associados:

- () Obesidade (Obesidade: $IMC > 30\text{Kg/m}^2$ ($IMC = \text{peso} / \text{altura}^2$))
() DM tipo 2 diagnosticado em _____ ou resistência à insulina HOMA – $IR \geq 3$
() Hipercolesterolemia ($CT > 200\text{ mg/dL}$)
() Hipertrigliceridemia ($TG > 150\text{ mg/dL}$)
() Síndrome plurimetabólica (3 dos 5 diagnóstica *AHA/NHLBI Scientific Statement, Circulation, 2005*)
() (glicemia de jejum $> \text{ou} = 100\text{ mg/dl}$ ou uso de droga)
() (PS $> \text{ou} = 130\text{ mmHg}$ ou PD $> \text{ou} = 85\text{ mmHg}$ ou uso de droga)
() (circunferência da cintura masc $> \text{ou} = 102\text{ cm}$ / fem $> \text{ou} = 88\text{cm}$)
() (redução do HDL-C masc $< 40\text{ mg/dl}$ e fem $< 50\text{ mg/dl}$ ou em uso de droga)
() (elevado triglicérides $> \text{ou} = 150\text{ mg/dl}$ ou uso de droga)
() Antecedentes de nutrição parenteral, emagrecimento acentuado, desnutrição, bypass intestinal, síndrome do intestino curto

Medicações em uso (serão excluídos pacientes em uso de corticosteróides, amiodarona ou outra droga hepatotóxica)

História familiar de diabetes tipo 2:

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

Anamnese / exame físico:

- () dor em HCD
 () síndrome dispéptica
 () astenia
 () sinais de insuf. hepática (spiders, ginecomastia, eritema palmar, icterícia)
 () sinais de hipertensão portal (esplenomegalia, circulação colateral abdominal)
 () familiares de primeiro e segundo grau com hepatopatia

Patologias hepáticas de exclusão**Hepatite viral:**

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

Hepatite auto-imune:

Auto-anticorpos hepáticos _____

Doença de Wilson:

Ceruloplasmina _____ Cobre sérico _____

Deficiência de α 1 anti-tripsina: α 1 anti-tripsina _____**Hemocromatose:**

Ferro _____ Sat. Transferrina _____ Ferritina _____

Doença celíaca:

Ac anti-endomísio _____ Dosagem de IgA _____

Fórmula para a quantificação de ingestão alcoólica

Teor Alcoólico		
Bebida	Grau	Dose
Cerveja	4° à 8°	Copo – 250 mL Lata – 350 mL Garrafa – 660 mL
Cachaça	41° à 50°	Dose – 50 mL Litro – 1.000 mL
Campari / Martini	22°	Cálice – 100 mL Garrafa - 660 mL
Vinho	12°	Taça – 150 mL Garrafa 750 mL
Destilados (Whisky/ Vodka)	45°	Dose – 50 mL Litro – 1.000 mL

Fórmula para Cálculo de Ingestão de Álcool
$G/\text{dia} = (\text{volume (mL)} \times K \text{ constante} \times \text{grau da bebida}) / 100$
$K = 0,8$

Fórmula para Cálculo O HOMA-IR
$\text{HOMA-IR} = \text{insulina de jejum } (\mu\text{U/mL}) \times (\text{glicemia de jejum (mmol/L)}) / 22,5.$
A glicemia obtida em mg/dL foi transformada em mmol/L, multiplicando-se o valor obtido em mg por 0,05551.

1ª consulta (V1)

P: CC: PA: Atividade Física:

Efeitos Colaterais:

2ª consulta (V2)

P: CC: PA: Atividade Física:

Efeitos Colaterais:

3ª consulta (V3)

P: CC: PA: Atividade Física:

Efeitos Colaterais:

4ª consulta (V4)

P: CC: PA: Atividade Física:

Efeitos Colaterais:

5ª consulta (V5)

P: CC: PA: Atividade Física:

Efeitos Colaterais:

6ª consulta (V6)

P: CC: PA: Atividade Física:

Efeitos Colaterais:

ANEXO E

POSTERS

Methods: In 22 non-diabetic, non-dyslipidaemic patients with biopsy-proven NAFLD we measured whole abdomen visceral fat (VF) by MRI, fasting endogenous glucose production (EGP) and lipolysis by tracer infusion, peripheral insulin resistance (IR) as HOMA, Hepatic-IR as EGP x fasting insulin, and adipose tissue (Adipo)-IR as basal FFA levels x fasting insulin. Hepatic histology was scored according to Kleiner, liver fat was also reported as percentage (LF%).

Results: In our study cohort, VF was increased in proportion to BMI ($r=0.54$, $p<0.004$) and to LF%, ($r=0.43$, $p<0.03$), whereas LF% was not correlated with BMI. Only LF%, but not VF, was associated with circulating FFA levels ($r=0.51$, $p<0.01$), and Adipo-IR ($r=0.41$, $p<0.05$), while no correlation was found between either LF% or VF with Hepatic-IR or HOMA.

Patients with NAS score ≥ 4 (compared to those with NAS 0–3) had more VF (3.9 ± 0.7 vs 2.8 ± 0.4 kg), increased FFA concentrations (525 ± 52 vs 804 ± 98 mmol/l), peripheral IR (HOMA: 3.7 ± 0.5 vs 2.8 ± 0.8), hepatic-IR (169 ± 23 vs 124 ± 32), and adipose-IR (13.2 ± 2.5 vs 6.3 ± 1.8) (all $p<0.05$). When taking into account only ballooning and lobular inflammation in the NAS score, we found that subjects with a composite score >2 had an impaired suppression of lipolysis.

Compared to patients without fibrosis, those with fibrosis had more VF (3.9 ± 0.6 vs 2.7 ± 0.7 kg, $p<0.03$), but not LF%, and no differences were found in the indexes of IR.

Conclusions: In NAFLD subjects, liver fat is associated with metabolic derangements and insulin resistance, but insulin resistance of the adipose tissue and VF accumulation appear to provide a major contribution to liver damage.

Funding from the FP7/2007–2013 under grant agreement no. Health-F2–2009–241762, for the FLIP project.

1352

INTEROBSERVER CONCORDANCE IN CONTROLLED ATTENUATION PARAMETER (CAP) MEASUREMENT, A NOVEL TOOL FOR THE ASSESSMENT OF HEPATIC STEATOSIS BASED ON TRANSIENT ELASTOGRAPHY

E. Recio¹, K. Neukam¹, C. Cifuentes¹, M. Mancebo¹, J. Macías¹, C. Almeida², N. Merchante¹, J.A. Mira¹, A. Rivero-Juárez³, J.A. Pineda¹. ¹Unit of Infectious Diseases and Microbiology, ²Unit of Investigation, Hospital Universitario de Valme, Seville, ³Unit of Infectious Diseases, Maimonides Institute for Biomedical Research (IMIBIC), Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba, Spain
E-mail: keule165@googlegmail.com

Introduction: The combination of transient elastometry (TE) with controlled attenuation parameter (CAP) allows non-invasive measurements of hepatic steatosis (HS) simultaneously to liver stiffness. TE is characterized by a high reproducibility and low inter-observational variability in HCV-infected patients with or without HIV coinfection. Nevertheless, no data are available on interobserver differences in CAP values. This is a relevant point, since HS is a very common disorder among HIV-infected patients, and accurate non-invasive diagnosis is critical.

Objective: To assess the concordance of CAP measurements between two independent observers in patients infected with HIV and/or hepatitis virus.

Methods: In a cross-sectional, prospective study conducted from December 2011 to March 2012 in a university hospital in Spain, CAP-enabled TE acquisitions were performed by two independent observers in 118 consecutive patients with HIV and/or hepatitis virus infection. The interobserver concordance between the CAP value measurements was assessed using the intraclass correlation coefficient (ICC) and the concordance of the classification of patients regarding the grades of HS was characterized using the kappa index. Patients with CAP ≥ 238 dB/m were considered to bear significant HS ($\geq 10\%$ hepatocytes involved), as previously reported.

Results: 78% patients were male. Twenty (17%) patients were HIV mono-infected, 44 (37.3%) hepatitis C virus (HCV)-mono-infected and 52 (44%) showed HIV/HCV coinfection. The median (Q1–Q3) values of CAP obtained by the first and the second observer were 228 (205–265) and 227 (196–269) dB/m, respectively. The median (interquartile range) of the absolute difference of CAP values between the two observers was 20 (10–41) dB/m. The overall ICC was 0.84 (95% confidence interval: 0.77–0.88). The kappa index for the concordance of classification for the presence of significant HS was 0.55. No factor was associated with a greater concordance between observers.

Conclusions: The concordance of CAP values obtained by two observers is good. Therefore, the determination of HS by means of CAP in HIV and/or hepatitis virus infection represents an observer-independent and easily performable method. However, the concordance of the diagnosis of significant HS, defined by the cutoff of 238 dB/m, is suboptimal.

1353

EFFECTS OF omega-3 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS (PUFA) FROM FISH AND FLAXSEED OILS ON NONALCOHOLIC STEATOHEPATITIS (NASH)

M.A. Nogueira¹, V.A.F. Alves², J.T. Stefano¹, L. Rodrigues³, F.J. Carrilho¹, D. Waitzberg³, C.P. Oliveira¹. ¹Gastroenterology, Clinical Division, Hepatology Branch (LIM-07), ²Pathology (LIM-14), ³Gastroenterology, Surgery Division (LIM-35), University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil
E-mail: cpm@usp.br

Introduction: There are very few intervention strategies that have been proven in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) seem to be efficacious on NAFLD treatment from experimental models, but few randomized trials have been realized. The aim of this study was to evaluate prospectively the efficacy of Omega-3 PUFA derived from fish and flaxseed in non-alcoholic steatohepatitis (NASH) patients.

Methods: Sixty patients with biopsy proven NASH were included in the randomized placebo controlled trial. The patients were randomized into two groups. Omega-3 group ($n=30$) received capsules containing 945 mg of Omega-3 PUFA [α linolenic acid/64%, eicosapentaenoic acid (EPA)/16% and docosahexaenoic acid (DHA)/21%], in 3 capsules/day. Placebo Group ($n=30$), received 3 placebo capsules containing mineral oil. The intervention was carried out for 6 months, when patients were re-submitted for new liver biopsy. Primary endpoint was liver histology according to the NASH activity score (NAS) at baseline and 6 months. Second endpoints were evaluated by analysis of serum aminotransferases, fasting lipid profile, serum glucose, anthropometric parameters and serum levels of cytokines at 0, 3 and 6 months.

Results: These 60 patients enrolled, 10 were not finished the study (5 in Omega-3 group and 5 in the Placebo group). Concerning the primary endpoint, the NAS activity improved by 57% in the placebo group and 67% in the omega-3 group, however, no significant difference was seen ($p=0.33$), the hepatocellular ballooning reduced 22% in the placebo group and 33% in the omega-3 group, also with no difference between groups ($p=0.28$). Omega-3 did not reduce steatosis, lobular inflammation and fibrosis. Serum aminotransferases, fasting lipid profile, serum glucose, anthropometric parameters and serum levels of IL-6 and TNF- α were not altered with the treatment.

Conclusion: Our results indicate that Omega-3 PUFA from fish and flaxseed oil compound cannot improve, after 6 months, the liver histology, biochemical parameters and serum levels of IL-6 and TNF- α . The limitations of this study were the small number of patients enrolled and the composition of Omega-3 compound that was enriched with linolenic acid (64%) than EPA/DHA. Further study is needed to confirm these results.

7 REFERÊNCIAS

I Diretriz sobre o Consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular, 2013.

Agresti A. *Categorical data analysis*. New York: John Wiley & Sons; 2012.

Alwayn IP, Gura K, Nosé V, Zausche B, Javid P, Garza J, Verbesey J, Voss S, Ollero M, Andersson C, Bistran B, Folkman J, Puder M. Omega-3 fatty acid supplementation prevents hepatic steatosis in a murine model of nonalcoholic fatty liver disease. *Pediatr Res*. 2005;57(3):445-52.

Andersen T, Gluud C, Franzmann MB, Christoffersen P. Hepatic effects of dietary weight loss in morbidly obese subjects. *J Hepatol*. 1991;12:224-9.

Angelico F, Del Ben M, Conti R, Francioso S, Feole K, Fiorello S, Cavallo MG, Zalunardo B, Lirussi F, Alessandri C, Violi F. Insulin resistance, the metabolic syndrome, and nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Endocrinol Metabol*. 2005;90:1578-82.

Angulo P, Lindor KD. Treatment of nonalcoholic fatty liver: present and emerging therapies. *Semin Liver Dis*. 2001;21:81-8.

Araya J, Rodrigo R, Videla LA, Thielemann L, Orellana M, Pettinelli P, Poniachik J. Increase long-chain polyunsaturated fatty acid n-6/n-3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci (Lond)*. 2004;106:635-43.

Barceló-Coblijn G, Murphy EJ, Othman R, Moghadasian MH, Kashour T, Friel JK. Flaxseed oil and fish-oil capsule consumption alters human red blood cell n-3 fatty acid composition: a multiple-dosing trial comparing 2 sources of n-3 fatty acid. *Am J Clin Nutr*. 2008;88:801-9.

Berson A, De Beco V, Lettéron P, Robin MA, Moreau C, El Kahwaji J, Verthier N, Feldmann G, Fromenty B, Pessayre D. Steatohepatitis-inducing drugs cause mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in rat hepatocytes. *Gastroenterology*. 1998;114:764-74.

Bloedon LT, Balikai S, Chittams J, Cunnane SC, Berlin JA, Rader DJ, Szapary PO. Flaxseed and cardiovascular risk factors: results from a double blind, randomized, controlled clinical trial. *J Am Coll Nutr*. 2008;27:65-74.

Butler AR, Rhodes P. Chemistry, analysis and biological roles of S-nitrosothiols. *Anal Biochem*. 1997;249:1-9.

Calder PC. Omega 3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *World Rev Nutr Diet*. 2001;88:109-16.

Capanni M, Calella F, Biagini MR, Genise S, Raimondi L, Bedogni G, Svegliati-Baroni G, Sofi F, Milani S, Abbate R, Surrenti C, Casini A. Prolonged n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation ameliorates hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a pilot study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006;23:1143-51.

Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, Charlton M, Sanyal AJ. 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;55:2005-23.

Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C, Karim R, Lin R, Samarasinghe D, Liddle C, Weltman M, George J. NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology*. 2002;35(2):373-9.

Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. Nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2002;122:1649-57.

Cohen. Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciencis. New York: Lawrence Erlbaum Associates, Publishers; New York University; 1988.

Cotrim HP, De Freitas LA, Freitas C, Braga L, Sousa R, Carvalho F, Paraná R, Santos-Jesus R, Andrade Z. Clinical and histopathological features of NASH in workers exposed to chemicals with or without associated metabolic conditions. *Liver Intern*. 2004;24:131-5.

Cotrim HP, Parise ER, Oliveira CP, Leite N, Martinelli A, Galizzi J, Silva Rde C, Mattos A, Pereira L, Amorim W, Ivantes C, Souza F, Costa M, Maia L, Pessoa M, Oliveira F. Nonalcoholic fatty liver disease in Brazil. Clinical and histological profile. *Ann Hepatol*. 2011;10:33-7.

Curzio M, Esterbauer H, Dianzani MU. Chemotactic activity of hydroxyalkenals on rat neutrophils. *Int J Tissue React*. 1985;7:137-42.

Day CP, James OF Hepatic steatosis: innocent bystander ou guilty party. *Hepatology*. 1998;27:1463-6.

Delarue J, LeFoll C, Corporeau C, Lucas D. N-3 long chain polyunsaturated fatty acids: a nutritional tool to prevent insulin resistance associated to type 2 diabetes and obesity? *Reprod Nutr Dev*. 2004;44(3):289-99.

Dewell A, Marvasti FF, Harris WS, Tsao P, Gardner CD. Low- and high-dose plant and marine (n-3) fatty acids do not affect plasma Inflammatory markers in adults with metabolic syndrome. *J Nutr*. 2011;141:2166-71

Drenick EJ, Fisler J, Johnson J. Hepatic steatosis after intestinal bypass. Prevention and reversal by metronidazole irrespective of protein-calorie malnutrition. *Gastroenterology*. 1982;82:535-48.

Dunn W, Schwimmer JB. The obesity epidemic and nonalcoholic fatty liver disease in children. *Curr Gastroenterol*. 2008;10:67-72.

Faintuch J, Bortolotto LA, Marques PC, Faintuch JJ, França JI, Cecconello I. Systemic inflammation and carotid diameter in obese patients: pilot comparative study with flaxseed powder and cassava powder. *Nutr Hosp*. 2011;26(1):208-13.

Falck-Ytter Y, Younossi ZM, Marchesini G, McCullough AJ. Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes. *Semin Liver Dis*. 2001;21:17-26.

Festa A, D'Agostino RB, Howard G, Mykkanen L, Tracy RP, Haffner SM. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome. The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation*. 2000;102:42-7.

Fidanza F, Gentile MG, Porrini M. A self-administered semi quantitative food-frequency questionnaire with optical reading and its concurrent validation. *Eur J Epidemiol*. 1995;11:163-70.

Fukumitsu S, Villareal MO, Onaga S, Aida K, Han J, Isoda H. α -Linolenic acid suppresses cholesterol and triacylglycerol biosynthesis pathway by suppressing SREBP-2, SREBP-1a and -1c expression. *Cytotechnology*. 2013;65(6):899-907.

Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith SC Jr, Spertus JA, Costa F; American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*. 2005;112(17):2735-52.

Gulbahar O, Karusu KA, Ersoz G, Akarca US, Musoglu A. Treatment of non-alcoholic steatohepatitis with N-acetyl cysteine. *Gastroenterology*. 2000;118(4):A1444.

Haines NW, Baker AL, Boyer JL, Glagov S, Schneir H, Jaspan J, Ferguson DJ. Prognostic indicators of hepatic injury following jejunoileal bypass performed for refractory obesity: a prospective study. *Hepatology*. 1981;1:161-7.

Harper CR, Edwards MJ, DeFilippis AP, Jacobson TA. Flaxseed oil increases the plasma concentrations of cardioprotective (n-3) fatty acids in humans. *J Nutr*. 2006;136:83-7.

Iverson SJ. Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for full lipid determination in a broad range of marine tissue. *Lipids*. 2001;36:1283-7.

Janczyk W, Socha P, Lebensztejn D, Wierzbicka A, Mazur A, Neuhoﬀ-Murawska J, Matusik P. Omega-3 fatty acids for treatment of non-alcoholic fatty liver disease: design and rationale of randomized controlled trial. *BMC Pediatr*. 2013;23:13:85.

Jimba S, Nakagami T, Takahashi M, Wakamatsu T, Hirota Y, Iwamoto Y, Wasada T. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and its association with impaired glucose metabolism in Japanese adults. *Diabet Med*. 2005;22:1141-5.

Kelley DS. Modulation of human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids. *Nutrition*. 2001;17:669-73.

Kleiner DE, Brunt EM, Natta MV, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torberson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ. Nonalcoholic steatohepatitis clinical research network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;41:1313-21.

Lagarde M, Vericel E, Croset M, Calzada C, Bordet JC, Guichardant M. Interactions between arachidonic and eicosapentaenoic acids during their dioxygenase-dependent peroxidation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1993;48:23-5.

Lavine, JE. Vitamin E treatment of nonalcoholic steatohepatitis in children: a pilot study. *J Pediatrics*. 2000;136:734-8.

Lee KS, Buck M, Houghlum K, Chojkier M. Activation of hepatic stellate cells by TGF alpha and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myc expression. *J Clin Invest*. 1995; 96:2461-8.

Lee RG. Nonalcoholic steatohepatitis: a study of 49 patients. *Hum Pathol*. 1989;20:594-8.

Lewis JR, Mohohanty SR. Nonalcoholic fatty liver disease: a review and update. *Dig Dis Sci*. 2010;55:560-78.

Ludwig J, McGill DB, Lindor KD. Metabolic liver diseases. Review: nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 1997;12:398-403.

Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc*. 1980;55:434-8.

Machado M, Marques-Vidal P, Cortez-Pinto H. Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery. *J Hepatol*. 2006;45:600-6.

Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, Natale S, Vanni E, Villanova N, Melchionda N, Rizzetto M. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology*. 2003;37:917-23.

Marra F, Lotersztajn S. Pathophysiology of NASH: perspectives for a targeted treatment. *Curr Pharm Des*. 2013;19(29):5250-69.

Martel C, Esposti DD, Bouchet A, Brenner C, Lemoine A. Non-alcoholic steatohepatitis: new insights from OMICS studies. *Curr Pharmaceut Biotechnol*. 2012;13:726-35.

Masterton GS, Plevris JN, Hayes PC. Review article: omega-3 fatty acids - a promising novel therapy for non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2010;31:679-92.

Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28:412-9.

Morettin PA, Bussab WO. *Estatística básica*. São Paulo: Saraiva; 2002.

Mostad IL, Bjerve KS, Lydersen S, Grill V. Effects of marine n-3 fatty acid supplementation on lipoprotein subclasses measured by nuclear magnetic resonance in subjects with type II diabetes. *Eur J Clin Nutr*. 2008;62(3):419-29.

Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology*. 2003;37:1202-19.

Neuschwander-Tetri BA, Sponseller C, Hampton KK, Karadaghy AA, Bacon BR, Wehmeier K, Brunt EM. Rosiglitazone improves insulin sensitivity, ALT and hepatic steatosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2002;122:A622.

Oliveira CP, Gayotto LC, Tatai C, Della Bina BI, Janiszawski M, Lima ES, Abdalla DS, Lopasso FP, Laurindo FR, Laudanna AA. Oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease, in rats fed with a choline-deficient diet. *J Cell Mol Med*. 2002;6:399-406.

Oliveira CP, Gayotto LC, Tatai C, Della Nina BI, Oliveira, MG, Shishido SM, Lima ES, Abdalla DS, Laurindo FR, Laudana AA, Yaushasi KK. Protective Effect of S-nitroso-acetilcysteine (SNAC) in experimental liver steatosis induced by choline deficient diet. *Gastroenterology*. 2003;124(4 Suppl.1):p-75(M2002).

Ong J, Younossi ZM, Reddy V, Price LL, Gramlich T, Mayes J, Boparai N. Cryptogenic cirrhosis and posttransplantation nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Transpl*. 2001;7:797-801.

Pan A, Sun J, Chen Y, Ye X, Li H, Yu Z, Wang Y, Gu W, Zhang X, Chen X, Demark-Wahnefried W, Liu Y, Lin X. Effects of a flaxseed-derived lignan supplement in type 2 diabetic patients: a randomized, double-blind, cross-Over Trial. *PLoS One*. 2007;2(11):e1148.

Parker HM, Johnson NA, Burdon CA, Cohn JS, Connnor HTO, George J. Omega-3 supplementation and non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol*. 2012;56:944-51.

Powell EE, Cooksley WG, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell LW. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology*. 1990;11:74-80.

Racine Radjini A, Deckelbaum RJ. Sources of de very-long-chain unsaturated omega-3 fatty acids: eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. *Curr Opin Clin Nutrit Metab Care*. 2007;10:123-8.

Rasic-Milutinovic Z, Perunicic G, Pljesa S, Gluvic Z, Sobajic S, Djuric I, Ristic D. Effects of N-3 PUFAs supplementation on insulin resistance and inflammatory biomarkers in hemodialysis patients. *Ren Fail.* 2007;29(3):321-9.

Santos RD, Gagliardi ACM, Xavier HT, Magnoni CD, Cassani R, Lottenberg AM, et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. *Arq Bras Cardiol.* 2013;100(1 Supl. 3):1-40

Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman ML, Clore JN. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology.* 2001;120:1183-92.

Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, McCullough A, Diehl AM, Bass NM, Neuschwander-Tetri BA, Lavine JE, Tonascia J, Unalp A, et al. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med.* 2010;362:1675-85.

Satheesh Nair, Diehl AM, Perrillo R. Metformin in nonalcoholic steatohepatitis: efficacy and safety. A preliminary report. *Gastroenterology.* 2002;122:A621-2.

Serhan CN. Novel omega-3-derived local mediators in anti-inflammation and resolution. *Pharmacol Ther.* 2005;105:7-21.

Shirai N, Suzuki H, Wada S. Direct methylation from mouse plasma and from liver and brain homogenates. *Analyt Biochem.* 2005;343:48-53.

Spadaro L, Magliocco O, Spampinato D, Piro S, Oliveri C, Alagona C, Papa G, Rabuazzo AM, Purrello F. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Liver Dis.* 2008;40:194-9.

Sprent P, Smeeton NC. Applied nonparametric statistical methods. Boca Rotan: Chapman & Hall/CRC; 2007

Tanaka N, Sano K, Horiuchi A, Tanaka E, Kiyosawa K, Aoyama T. Highly purified eicosapentaenoic acid treatment improves nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol*. 2008;42:413-8.

Taylor GG, Noto AD, Stringer DM, Froese S, Malcolmson L. et al. Dietary milled flaxseed and flaxseed oil improve N-3 fatty acid status and do not affect glycemic control in individuals with well-controlled type 2 diabetes. *J Am Coll Nutr*. 2010;29(1):72-80.

Tilg H, Diehl AM. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med*. 2000;343(20):1467-76.

Vargas ML, Almario RU, Buchan W, Kim K, Karakas SE. Metabolic and endocrine effects of long chain vs. Essential omega-3 polyunsaturated fatty acids in polycystic ovary syndrome. *Metabolism*. 2011;60(12):1711-8.

White B, Dietary fatty acids. *Am Fam Phys*. 2009;80(4):345-50.

World Health Organization (WHO). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Geneva; 1997.

Wu H, Pan A, Yu Z, Qi Q, Lu L, Zhang G, Yu D, Zong G, Zhou Y, Chen X, Tang L, Feng Y, Zhou H, Chen X, Li H, Demark-Wahnefried W, Hu FB, Lin X. Lifestyle counseling and supplementation with flaxseed or walnuts influence the management of metabolic syndrome. *J Nutr*. 2010;40(11):1937-42.

Yang SQ, Lin HZ, Lane MD, Clemens M, Diehl AM. Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:2557-62.

Yang S, Zhu H, Li Y, Lin H, Gabrielson K, Trush MA, Diehl AM. Mitochondrial adaptations to obesity-related oxidant stress. *Arch Biochem Biophys*. 2000;378:259-68.

Youssef WI, McCullough AJ. Steatohepatitis in obese individuals. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2002;16:733-47.

Yu AS, Keeffe EB. Elevated AST or ALT to nonalcoholic fatty liver disease: accurate predictor of disease prevalence? *Am J Gastroenterol*. 2003;98:955-6.