

**SILVIA MASSAMI YOSHIMURA**

**Associação do polimorfismo no gene da patatin-like phospholipase domain containing 3 (PNPLA3) e o consumo de carne vermelha em pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)**

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

Programa: Ciências em Gastroenterologia

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira

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

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

**São Paulo**

**2022**

**SILVIA MASSAMI YOSHIMURA**

**Associação do polimorfismo no gene da patatin-like phospholipase domain containing 3 (PNPLA3) e o consumo de carne vermelha em pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)**

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

Programa: Ciências em Gastroenterologia

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira

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

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

**São Paulo**

**2022**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Yoshimura, Silvia Massami

Associação do polimorfismo no gene da Patatin-like Phospholipase Domain Containing 3 (PNPLA3) e o consumo de carne vermelha em pacientes com Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA) / Silvia Massami Yoshimura. -- São Paulo, 2022.

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia.  
Orientadora: Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira.

Descritores: 1.Fígado gorduroso 2.Polimorfismo de nucleotídeo único 3.Patatin-like phospholipase domain-containing 3 4.Dieta 5.Carne vermelha 6.Cirrose hepática

USP/FM/DBD-385/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

## Normalização Adotada

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

Referencias: adaptado de *Internacional Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela minha vida e saúde, por mostrar caminhos e obstáculos para o meu crescimento espiritual e intelectual.

Aos meus pais Masahiro e Masae, pela dedicação e por me impulsionarem para realizar os meus sonhos.

Aos meus irmãos Masanao, João, Patricia, Eduardo, Hugo e Isabella, que me incentivaram nos momentos difíceis e por apoiarem a evoluir na ciência e como pessoa.

Aos meus cunhados, sobrinhos e amigos pelo carinho e apoio sempre.

A minha orientadora Profa. Dra. Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira pela atenção, paciência e apoio durante todo esse processo de aprendizagem. Um exemplo que me inspira sempre. Obrigada pelos muitos ensinamentos e carinho.

Ao Dr. Sebastião Mauro Bezerra Duarte, por todos os conselhos e por toda a ajuda, que me incentivou e impactou na minha evolução como nutricionista.

Ao Dr. José Tadeu Stefano, pelas correções e sugestões que me permitiram um melhor desempenho nesse trabalho.

Aos pacientes, que aceitaram a disponibilizar parte do seu tempo e pela paciência em responder tantas perguntas.

A todos do departamento de ciência em Gastroenterologia e do Ambulatório de Doença hepática gordurosa não alcoólica (A2MG700) da Disciplina de Gastroenterologia Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por colocar à disposição a área experimental e que contribuíram para a realização deste trabalho.

## Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>1.1. Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA)</b> .....	1
<b>1.2. Dieta e Risco para desenvolvimento de DHGNA</b> .....	6
<b>1.3. Polimorfismo no gene da <i>Patatin-like phospholipase domain containing 3</i> (PNPLA3) e DHGNA</b> .....	11
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	13
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	14
<b>4. MÉTODOS</b> .....	15
<b>4.1. Delineamento do estudo</b> .....	15
<b>4.2. Local e Período da Pesquisa</b> .....	15
<b>4.3. Critérios de Inclusão</b> .....	15
<b>4.4. Critérios de Exclusão:</b> .....	16
<b>4.5. Procedimentos no estudo</b> .....	16
<b>4.6. Avaliação nutricional</b> .....	18
<b>4.7. Antropometria</b> .....	18
<b>4.9. Avaliação do polimorfismo no gene PNPLA3</b> .....	20
<b>4.9.1 Divisão dos grupos de acordo com o polimorfismo</b> .....	21
<b>4.10. Análise estatística</b> .....	21
<b>4.11. Aspectos Éticos</b> .....	22
<b>5. RESULTADOS</b> .....	23
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	28
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	34
<b>8. ANEXOS</b> .....	35
<b>8.1 Anexo 1 – Ficha de Avaliação Nutricional e recordatório alimentar de 24 horas</b>	35
<b>8.2 Anexo 2 – Questionário de Consumo de Carne</b> .....	36
<b>8.3 Anexo 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</b> .....	37

<b>8.4 Anexo 4 – Protocolo de aprovação da Comissão Ético-Científica do Departamento .....</b>	<b>43</b>
<b>8.5 Anexo 5 – Carta de anuência.....</b>	<b>46</b>
<b>9. REFERÊNCIAS: .....</b>	<b>47</b>

## LISTA DE ABREVIACES

ADPN	Adiponutrina
AGEs	<i>Advanced glycation end products</i>
AHAs	Aminas heterocíclicas aromáticas
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Trifosfato de adenosina
BCAAs	Aminoácidos de cadeia ramificada
CHC	Carcinoma hepatocelular
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DMT2	Diabetes mellitus tipo dois
EHNA	Esteato-hepatite não alcoólica
ERE	Estresse do retículo endoplasmático
EROS	Espécies reativas de oxignio
ES	Esteatose simples
Fe 2+	Ferro heme
FL	<i>Fatty liver</i>
FLI	<i>Fatty liver index</i>
GGT	Glutamil transferase
HDL	Lipoproteína de densidade alta
IMC	ndice de massa corporal
LDL	Lipoproteína de densidade baixa
LDN	Lipognese de novo
MAFLD	<i>Metabolic dysfunction-associated fatty liver disease</i>
MedDiet	Dieta Mediterrânea



mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
NOCs	N-nitroso compounds
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
OR	Razão de chances, do inglês odds ratio
PNPLA3	<i>Patatin-like Phospholipase Domain Containing 3</i>
QCC	Questionário de consumo de carne
RI	Resistência à insulina
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SM	Síndrome metabólica
SNPs	Polimorfismos de nucleotídeos único
SREBP-1	Proteína de ligação a elemento regulador de esterol
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
VET	Valor energético total
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Características clínicas e demográficas relativas à frequência de acordo com o número obtido para cada variável..... 24
- Tabela 2** - Características da ingestão calórica diária, macronutrientes, das gorduras e fibras..... 25
- Tabela 3** - Média diária da ingestão de carnes distribuídos por tipos..... 25
- Tabela 4** – Polimorfismo como fator de risco para DHGNA. Razões de chances (*odds ratios*) calculadas relativamente a pacientes com PNPLA3 =CC e pouco consumo de carnes vermelha e branca..... 26
- Tabela 5** – Consumo alto de carne como fator de risco para DHGNA. Razões de chances (*odds ratios*) calculadas relativamente a pacientes com PNPLA3 =CC e pouco consumo de carnes vermelha e branca..... 26
- Tabela 6** - Outros fatores de riscos e variáveis de controle em relação ao coeficiente polimorfismo e consumo de carnes vermelhas e brancas..... 27

## RESUMO

Yoshimura SM. *Associação do polimorfismo no gene da patatin-like phospholipase domain containing 3 (PNPLA3) e o consumo de carne vermelha em pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

**Introdução:** O consumo excessivo de gordura saturada e trans, carboidrato simples e proteínas, principalmente de carne vermelha, apresentam efeitos prejudiciais ao fígado. Estudos recentes demonstram aumento da Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) em populações com maior consumo de carne vermelha, processada e cozida em altas temperaturas. Isto ocorre devido ao aumento da produção de aminas heterocíclicas aromáticas, iniciador do processo esteatogênico hepático. Por outro lado, o polimorfismo de nucleotídeo único rs738409 no gene *Patatin-like phospholipase domain containing 3* (PNPLA3) tem sido implicado na suscetibilidade à DHGNA e fibrose hepática. No entanto, o efeito sinérgico entre o consumo de carne vermelha e o polimorfismo no gene PNPLA3 na DHGNA ainda não foi avaliado. **Objetivo:** Avaliar a associação entre a presença do polimorfismo no gene PNPLA3 e o consumo de macronutrientes, incluindo consumo de carne e seu método de cozimento entre pacientes com DHGNA. **Métodos:** Realizou-se um estudo transversal, entre dezembro de 2019 a março de 2021 com 91 indivíduos de idade média de  $64 \pm 9$  anos, matriculados no Ambulatório de DHGNA (A2MG700) da Disciplina de Gastroenterologia Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Foram incluídos pacientes com diagnóstico de DHGNA por biópsia hepática com genotipagem para o polimorfismo no gene PNPLA3. Foi verificado o consumo de calorias e macronutrientes utilizando-se o recordatório alimentar de 24 horas e questionário específico sobre o consumo de carne. Para a avaliação antropométrica utilizou-se o Índice de massa corporal (IMC) e medida da circunferência abdominal. Considerou-se como alto o consumo de carne, quando a quantidade estava acima da mediana do centro específico. O DNA genômico foi extraído de amostras de sangue total e analisado por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). Classificou-se o polimorfismo em heterozigoto GC, homozigoto GG e CC, onde o último foi definido como sem polimorfismo. A Esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) é definida pela presença mínima de 1 grau para esteatose, balonização hepatocelular e inflamação lobular na

biópsia hepática. EHNA com fibrose  $\geq 2$  foi definida como fibrose significativa ( $F \geq 2$ ).

**Resultados:** A média do IMC foi de  $32,38 \pm 4,58$  kg/m<sup>2</sup> e circunferência abdominal foi de  $107 \pm 10$  cm. Na biópsia hepática, 42% dos pacientes apresentaram  $F \geq 2$ . A *odds ratio* de  $F \geq 2$  foi de 2,12 no grupo GG e 1,54 para o grupo CG, ambos em relação ao grupo CC. A média da ingestão calórica foi de  $1170 \pm 463,20$  kcal/d. A *odds ratio* no grupo CC em relação ao alto consumo de carne vermelha com o baixo foi 1,33. Em relação à carne branca, a *odds ratio* foi de 0,8 quando comparado o alto consumo com o baixo no grupo CC. **Conclusão:** A alta ingestão de carne e o polimorfismo no gene PNPLA3 parece ter um efeito sinérgico na DHGNA e fibrose hepática, sendo necessária a confirmação em um número maior de pacientes e em diferentes populações. Se confirmado, poder-se-á recomendar a redução do consumo de carne vermelha em pessoas com DHGNA com polimorfismo no gene PNPLA3.

**Descritores:** Fígado gorduroso; Polimorfismo de nucleotídeo único; *Patatin-like phospholipase domain-containing 3*; Dieta; Carne vermelha; Cirrose hepática

## ABSTRACT

Yoshimura SM. *Association of polymorphism in the patatin-like phospholipase domain containing 3 (PNPLA3) gene and red meat consumption in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)* [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

**Introduction:** Excessive consumption of saturated and trans fat, simple carbohydrate and protein, especially red meat, have harmful effects on the liver. Recent studies show an increase in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in populations with higher consumption of red meat, processed and cooked at high temperatures. This occurs due to the increased production of aromatic heterocyclic amines, the initiator of the hepatic steatogenic process. On the other hand, the single nucleotide polymorphism rs738409 in the Patatin-like phospholipase domain containing 3 (PNPLA3) gene has been implicated in susceptibility to NAFLD and liver fibrosis. However, the synergistic effect between red meat consumption and the PNPLA3 gene polymorphism in NAFLD has not yet been evaluated. **Objective:** To evaluate the association between the presence of PNPLA3 polymorphism and macronutrient intake, including meat consumption and cooking method among patients with NAFLD. **Methods:** We conducted a cross-sectional study from December 2019 to March 2021 with 91 individuals with a mean age of  $64 \pm 9$  years, enrolled in the NAFLD Outpatient Clinic (A2MG700) of the Clinical Gastroenterology Discipline of the *Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo*. We included patients diagnosed with NAFLD by liver biopsy and genotyped for the PNPLA3 polymorphism. Calorie and macronutrient intake was verified by 24-hour food recall and a specific questionnaire about meat consumption. For anthropometric evaluation we used the Body mass index (BMI) and waist circumference measurement. Meat consumption was considered high when the amount was above the median of the specific center. Genomic DNA was extracted from whole blood samples and analyzed by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). The polymorphism was classified as heterozygous GC, homozygous GG, and CC, where the last was defined as no polymorphism. Non-alcoholic steato-hepatitis (NASH) is defined by the presence of at least 1 grade for steatosis, hepatocellular ballooning, and lobular inflammation on liver biopsy. EHNA with  $\geq 2$  fibrosis was defined as significant fibrosis ( $F \geq 2$ ). **Results:** The mean BMI was  $32.38 \pm 4.58$  kg/m<sup>2</sup> and waist circumference was  $107 \pm 10$  cm. On liver

biopsy, 42% of patients had  $F \geq 2$ . The odds ratio of  $F \geq 2$  was 2.12 in the GG group and 1.54 for the CG group, both compared to the CC group. The mean caloric intake was  $1170 \pm 463.20$  kcal/d. The odds ratio in the CC group in relation to high red meat consumption with low was 1.33. And for white meat, the odds ratio was 0.8 when comparing high and low intake in the CC group. **Conclusion:** High meat intake and PNPLA3 gene polymorphism seems to have a synergistic effect on NAFLD and liver fibrosis, requiring confirmation in a larger number of patients and in different populations. If confirmed, it may be recommended to reduce red meat consumption in people with NAFLD and PNPLA3 polymorphism.

**Descriptors:** Fatty liver; Polymorphism, single nucleotide; Patatin-like phospholipase domain-containing 3; Diet; Red meat; Liver Cirrhosis

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA)

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é definida pela presença de esteatose hepática sem evidência de lesão hepatocelular com balonização, seguida pela ausência de causas secundárias de acúmulo de gordura hepática, como o consumo significativo de álcool. A esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) é caracterizada pela presença de  $\geq 5\%$  de esteatose hepática, lesão e inflamação hepática crônica, podendo ou não apresentar fibrose. O indivíduo com DHGNA pode progredir para uma cirrose avançada ou até um carcinoma hepatocelular (CHC).<sup>1</sup>

A DHGNA é considerada a doença hepática crônica mais comum e afeta cerca de 25% da população mundial, havendo o maior predomínio no Oriente Médio e na América do Sul. O número de casos de DHGNA vem crescendo ao longo de anos devido a propagação dos fatores de riscos metabólicos que são a obesidade, sedentarismo, diabetes mellitus tipo II (DMT2) e dislipidemia. Além disso, estima-se que a prevalência global de EHNA é de 3 a 4%, sendo maior na América Latina, podendo variar de 6 a 18%.<sup>2; 3</sup>

A prevalência e incidência da DHGNA na população em geral são altas, porém a maioria (90-95%) tem o diagnóstico de esteatose simples (ES), que não está associada à sobrevida prejudicada. Somente 5-10% dos indivíduos com ES evoluem para EHNA e desses, 38% progridem para fibrose. Dos pacientes com fibrose, 30% pode evoluir para cirrose e desses, 5-10% são descompensados e 1-2% desenvolve CHC. Aproximadamente 1% dos pacientes com ES sem cirrose podem evoluir para o CHC.<sup>4</sup>

A síndrome metabólica (SM) é um conjunto de fatores de risco que aumenta a probabilidade de um indivíduo apresentar doenças cardiovasculares e DMT2. A SM

é definida normalmente pela obesidade, hiperglicemia, dislipidemia e hipertensão arterial sistêmica. Existe uma forte relação entre a presença da SM e DHGNA. Um tratamento eficiente para a SM pode trazer benefício e amenizar os eventos cardiovasculares e mortalidade geral dos pacientes com DHGNA. <sup>5</sup> Segundo o *National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III*, a definição clínica da SM é feita pela presença de três ou mais critérios que são: circunferência abdominal aumentada (para homens >102 cm e mulheres >88 cm), nível sérico de triglicérides elevado ( $\geq 150$  mg/ dL), nível sérico de lipoproteína de alta densidade (HDL) baixo (para homens <40 mg/ dL e mulheres <50 mg/ dL), pressão arterial sistêmica persistentemente alta ( $\geq 130$  mmHg ou  $\geq 85$  mmHg) e nível elevado de glicemia plasmática de jejum ( $\geq 110$  mg/ dL). <sup>6</sup>

A obesidade é classificada com o índice de massa corporal (IMC)  $>30$  kg/ m<sup>2</sup> e obesidade mórbida o IMC  $>40$  kg/ m<sup>2</sup> em adultos pela Organização Mundial de Saúde. Pacientes com DHGNA e pacientes obesos, possuem uma similaridade no perfil metabólico e a prevalência de DHGNA é de  $>95\%$  nos indivíduos que realizaram a cirurgia bariátrica. Em pacientes não obesos, a adiposidade visceral tem sido ligada a predisposição para a DHGNA. <sup>3</sup>

A resistência à insulina (RI) é relatada como um componente significativo na patogênese da DHGNA. Alguns estudos sugerem que aproximadamente um a dois terços dos DMT2 apresentam DHGNA. Porém, a associação entre a DHGNA e DMT2 e sua relação casual bidirecional ainda precisa ser investigada, já que pacientes com DHGNA apresentam com frequência a RI e por outro lado, um grande número de pacientes com DMT2 desenvolve DHGNA. <sup>6</sup>

Recentemente uma nova nomenclatura foi sugerida devido a relevante condição subjacente da disfunção metabólica, sendo redefinida como doença



hepática gordurosa associado a disfunção metabólica [do inglês “*Metabolic dysfunction-associated fatty liver disease*”] (MAFLD). Os novos critérios possibilitarão uma identificação mais homogênea, com foco no papel da disfunção metabólica no acúmulo de gordura hepática que é o fator mais frequente na progressão da doença, evitando o diagnóstico baseado em critérios de exclusão. Para o diagnóstico da MAFLD, serão utilizados métodos simples e de fácil aplicabilidade, possibilitando identificar os pacientes com maior risco para fibrose significativa. Os critérios serão baseados na presença de esteatose hepática em conjunto com no mínimo um dos seguintes fatores: sobrepeso ou obesidade, DM2 ou evidência de desregulação metabólica independente do relato do consumo de álcool. Essa proposta de mudança na nomenclatura também beneficia a conscientização da mudança do estilo de vida, fundamental na redução dos riscos para doenças hepáticas e SM. <sup>2; 7</sup>

Atualmente, é sugerida a hipótese de múltiplas causas para compreender o mecanismo fisiopatológico da DHGNA. O acúmulo significativo de ácido graxos nos hepatócitos e a RI hepática promovem a lipotoxicidade e resultam no estresse oxidativo, estresse do retículo endoplasmático (ERE) e disfunção mitocondrial. <sup>4; 8; 9</sup>

No fígado, a insulina estimula a glicose e o metabolismo lipídico, promovendo a lipogênese e ao mesmo tempo diminui a gliconeogênese hepática. A insulina estimula a transcrição da proteína 1 ligadora do elemento regulatório de esterol (SREBP-1). A transcrição da SREBP-1 desempenha uma função importante no metabolismo de triglicérides e regula a ativação da lipogênese *de novo* (LDN), sendo que a sua desregulação pode levar ao acúmulo de gordura hepática. Além da insulina, a atividade do SREBP-1 é capaz de ser regulado pelo ERE. O consumo excessivo calórico promove o ERE, possivelmente pelo aumento da demanda da síntese de proteínas, como a apolipoproteína B, uma proteína transportadora de lipídios.

Portanto, SREBP-1 pode ter sua atividade elevada na obesidade por ser regulada pela insulina e pelo ERE, aumentando o acúmulo de gordura no fígado. <sup>4; 10;</sup>

O ácido graxo pode ser sintetizado a partir da glicose e frutose através da glicólise no fígado. O consumo em excesso de carboidrato aumenta a potência da indução da LDN e assim, aumentando os níveis de triglicérides. Dentro dos grupos dos carboidratos, os que influenciam mais na DHGNA são os de alto índice glicêmico que convertem mais rápido em ácido graxo e a frutose que apresenta uma maior potência em induzir a LDN. Outro fator que pode estimular a LDN é a gordura saturada pelo fato de elevar a SREBP-1. Geralmente, a reação protetora do corpo consegue adaptar-se ao excesso da distribuição do ácido graxo com o aumento da formação de triglicérides e metabolizá-los. Porém, estudos sugerem que a quantidade exacerbada de triglicérides pode contribuir para a metabolização anormal. Os triglicérides não exportados para o sangue em forma de lipoproteína de baixa densidade (VLDL) formam gotículas de lipídeos nos hepatócitos e essas gotículas contribuem para o “pool” de ácido graxo na células após sua lipólise. <sup>5; 10</sup>

A alteração da função mitocondrial, incluindo a beta oxidação dos ácidos graxos livres e produção de trifosfato de adenosina (ATP), desregula o equilíbrio entre os mecanismos pró-oxidante e antioxidante. Isso leva ao comprometimento da homeostase da gordura, induzindo a produção de metabólitos tóxicos derivados de lipídios e superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROS). Essas moléculas estimulam as vias inflamatórias contribuindo para apoptose dos hepatócitos e lesão mitocondrial. <sup>4; 9</sup>

A EHNA é caracterizada pela presença de esteatose, inflamação hepática, balonização hepatocelular e podendo apresentar fibrose ou não. A lesão dos hepatócitos são os responsáveis pela peroxidação lipídica na membrana celular,

ativando a inflamação e liberação de citocinas e adipocinas nos tecidos adiposos viscerais. Pressupõe-se que as citocinas são responsáveis pela pró-inflamação na patogênese da EHNA e na progressão da fibrose.<sup>8 11</sup>

A fibrogênese hepática é resultado do estresse pela lipotoxicidade, no qual tem a liberação dos macrófagos ativados (células de Kupffer) e inicia uma resposta homeostática para reparar as lesões dos tecidos. A persistência desses sinais pode induzir uma resposta exacerbada de um processo inflamatório do tecido e uma cicatrização excessiva, o que pode levar a fibrose avançada, cirrose, hipertensão portal e insuficiência hepática.<sup>5; 12</sup>

Para o estadiamento e classificação da EHNA, a biópsia hepática é conhecida como padrão ouro. O grau de fibrose é categorizado em: sem fibrose (F0), fibrose perisinusoidal (leve = F1), fibrose perisinusoidal e portal (significativa = F2), fibrose perisinusoidal e portal com septos sem cirrose (avançada = F3) e cirrose (F4). O grau de fibrose é reportado como o aumento da mortalidade em indivíduos com DHGNA, uma vez que a cicatrização da lesão hepatocelular envolve fibrose causando maior lesão hepática.<sup>13; 14</sup>

Devido à complexidade dessa doença e pela individualidade, as opções terapêuticas são bem limitadas e hoje, o principal tratamento é a modificação do estilo de vida. Estudos mostraram que indivíduos que perderam até 5% do peso total obtiveram um resultado bom, estabilizando a fibrose e aqueles que diminuíram mais que 7% do peso total apresentaram uma melhoria na EHNA. A perda acima de 10% do peso total foi considerada a mais benéfica, apresentando uma melhoria em todos os aspectos histológicos da EHNA, como inflamação portal e fibrose. Portanto, para obtermos um efeito positivo na reversão da EHNA é necessário preconizarmos uma perda de 5 a 10% do peso.<sup>6; 15</sup>

## 1.2. Dieta e Risco para desenvolvimento de DHGNA

Existem fatores que não são possíveis de modificar, como a idade, sexo, genética, etnia e histórico familiar de DHGNA, DM2 ou doenças cardiovasculares prematuras. A prevalência da DHGNA aumenta de acordo que a idade avança (>50 anos de idade). A obesidade, alimentação com alta densidade calórica e o sedentarismo são fatores importantes de risco modificáveis. A obesidade é um fator de risco significativo, principalmente a obesidade central, sendo resultado de uma alimentação desregulada e da inatividade do indivíduo. O sedentarismo é definido como um baixo gasto calórico devido à pouca atividade do corpo, ou seja, prologadas horas sentado ou em posição reclinada em casa, no trabalho ou no transporte. Há necessidade da alteração do estilo de vida para a redução do peso corporal, adequando a dieta e implementando à atividade física regular. Isso leva a redução da gordura hepática, das aminotransferases e da sensibilidade à insulina. <sup>16</sup>

É recomendada uma atividade física aeróbica de intensidade moderada de 150 a 200 min por semana dividida em 3 a 5 vezes, podendo ser uma caminhada com uma velocidade rápida ou utilizando a bicicleta ergométrica. A escolha deve ser baseada de acordo com a preferência e também pela condição física do indivíduo, possibilitando a continuidade a longo prazo. O treino de resistência possui o mesmo efeito e promove o fortalecimento musculoesquelético. Quando comparados, os indivíduos que mantiveram a prática regular de 150 min obtiveram maior redução dos níveis de aminotransferases em relação aos indivíduos com a prática de 60 min de atividade física, independente da perda do peso. Além do mais, a atividade física regular é associada à prevenção do avanço da DHGNA. <sup>6; 17</sup>

Para os indivíduos DHGNA com sobrepeso ou obesidade, as recomendações dietéticas são de restrição calórica energética diária de no mínimo de 30%,

aproximadamente de 500 a 1000 kcal, com o objetivo de uma perda de peso de 500 a 1000 g por semana. O indivíduo que faz uma restrição calórica excluindo alimentos com componentes prejudiciais para DHGNA (alimentos processados; bebidas e alimentos ricos em frutose), consegue uma redução da gordura do fígado. Além disso, estudos recomendam a dieta Mediterrânea (MedDiet) para ajustar a composição de macro e micronutrientes.<sup>6; 17</sup>

O padrão alimentar da MedDiet refere-se a um perfil dietético tradicional ordinariamente utilizado em regiões mediterrânicas na década de 1960. É baseado em um perfil específico dos ácidos graxos: baixo em gordura saturada (9% da energia total) e alto em gordura monoinsaturada (18% da energia total). Nessa dieta, há uma preferência para o uso de azeite de oliva como a principal gordura adicionada e o consumo de verduras, nozes, sementes, grãos integrais, peixes e frutos do mar. Os laticínios e carnes são de um consumo baixo e o consumo de álcool é considerado como moderado. É indicado o consumo diário de 3 a 9 porções de vegetais, ½ a 2 porções de frutas e 1,5 a 8 colheres de sopa de azeite de oliva. Essa dieta tem como mecanismo de proteção os efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios, sendo positivos nos indivíduos com SM e DHGNA.<sup>18; 19</sup>

Ryan e colaboradores (2013), realizaram um estudo de seis semanas de intervenção dietética em pacientes com DHGNA, no qual um grupo fez a dieta MedDiet e o grupo controle uma dieta com alto teor de carboidratos e baixo teor de gordura. Os pacientes que realizaram a dieta MedDiet obtiveram redução significativa da esteatose hepática e melhora na sensibilidade à insulina em relação ao grupo controle. Neste estudo os autores inferem que o controle do tipo de gordura consumida pode ser considerado mais importante do que a diminuição da gordura

total para se alcançar um melhor resultado no tratamento dietético dos pacientes com DHGNA.<sup>20</sup>

Alimentos processados ricos em frutose sintética, como o xarope de milho, não são saudáveis por ser principalmente metabolizado no fígado e ser um dos fatores que estimula a LDN. O consumo excessivo de produtos ricos em frutose adicionada é considerado como uma das causas da epidemia da obesidade e doenças como a DHGNA. As frutas também contêm frutose, entretanto possuem diversos nutrientes saudáveis com propriedades citoprotetora e antioxidante que contribuem para uma dieta balanceada. Adicionalmente, sabe-se que as fibras presentes nas frutas sofrem a fermentação bacteriana e os metabólitos da fermentação tem um potencial na sensibilidade à insulina, e possuem um efeito anti-inflamatório e anti-obesidade.<sup>21; 22</sup>

O alto consumo de gordura saturada, gordura trans e de carboidrato de alto índice glicêmico tem efeitos prejudiciais para o fígado. Entretanto, a ingestão de gordura mono e poli-insaturada são considerados positivamente eficientes na redução da esteatose. A gordura monoinsaturada possui propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. A gordura poli-insaturada, principalmente a ômega 3, modula a composição lipídica hepática e aumenta os mediadores anti-inflamatórios, resultando na melhora da sensibilidade à insulina, que induz a diminuição dos níveis de lipídeos armazenados nos tecidos adiposos. Além disso, o consumo de vitaminas antioxidantes, como a vitamina C e E, e de fitoquímicos antioxidantes, como polifenóis e flavonóides também é relevante, pois podem atuar no estresse oxidativo causado pela gordura acumulada no fígado.<sup>21; 23</sup>

Em um estudo experimental, camundongos alimentados com uma dieta do tipo ocidental com alto teor de gordura de óleo de soja contendo 0,75% de colesterol e com ácidos graxos saturados, levou ao desenvolvimento de EHNA com inflamação e

fibrose. Além disso, estes animais desenvolveram sobrepeso e apresentaram RI. O consumo combinado de óleo de soja e colesterol promoveu nestes camundongos estresse oxidativo e apoptose dos hepatócitos, aumentando a fibrose hepática, infiltração de macrófagos e produção de quimiocinas e citocinas.<sup>24</sup>

A carne é classificada em carne vermelha, branca e processada. São fontes importantes de proteína, ferro, zinco, vitamina B12 entre outros nutrientes. Contudo, possuem gordura saturada, colesterol, nitrato, nitrito e aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs), cujo o alto consumo estão associados a RI, obesidade abdominal, SM e estresse oxidativo, relevantes para o desenvolvimento da DHGNA. Na carne processada, a adição de ingredientes e conservantes para aumentar o seu prazo de validade faz com que o seu consumo aumente o risco para doenças, como as cardiovasculares. A proteína animal aumenta a concentração de BCAAs, seu consumo em excesso prejudica a sensibilidade à insulina pelo recrutamento da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) que desencadeia a LDN. O ferro heme ( $\text{Fe}^{2+}$ ) que contém na carne, pode causar o estresse celular que diminui o efeito da insulina, aumentando o risco para a DMT2. Nitrito e nitrato são utilizados para a preservação de carne processadas. Essas substâncias são convertidas em nitrosaminas que estão ligadas com a RI e DMT2.<sup>19; 25</sup>

O consumo elevado de carne vermelha e processada tem uma relação significativa com o crescimento de risco para neoplasias por conter o  $\text{Fe}^{2+}$  e pela formação de nitrosaminas que possuem efeito oncogênico. O nitrato é reduzido no trato gastrointestinal em nitrito. O nitrito reage a amina, amidas e outros precursores de nitrosação, formando os compostos N-nitrosos (NOCs) que são potentes carcinógenos. Os NOCs são ativados metabolicamente pelo citocromo P450 2E1, expresso no trato gastrointestinal. Sendo um dos NOCs, a nitrosamina N-

nitrosodimetilamina leva à formação de sítios básicos, quebras de fitas de DNA e citotoxicidade. O  $\text{Fe}^{2+}$  tem sido sugerido ser um composto que pode iniciar a carcinogênese por ter efeitos pró-oxidativos pela catálise da peroxidação lipídica, formando agentes citotóxicos e potencialmente prejudiciais ao DNA, como o malondialdeído.<sup>26; 27</sup>

As aminas aromáticas heterocíclicas (AHAs) na superfície da carne carbonizada também são iniciadores de processo cancerígeno. As AHAs são encontradas nas carnes que sofreram um cozimento prolongado em altas temperaturas ( $>150\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ou nas carnes que foram expostas diretamente nas chamas do fogo. As AHAs são metabolizadas pelas enzimas do citocromo P450, formando metabólitos N-hidroxilados genotóxicos. Esses metabólitos são bioativados pela N-acetiltransferases e geram intermediários reativos que causam danos no DNA. A formação de adutos de DNA que não sofrem reparos pelo sistema enzimáticos, podem induzir mutações durante a divisão celular, o que leva ao desenvolvimento do carcinoma. Pressupõe-se que esses efeitos são encontrados mais nas carnes vermelhas devido a maior quantidade de  $\text{Fe}^{2+}$  presente nelas.<sup>26; 27</sup>

*Zelber-Sagi* e colaboradores (2018), observaram associação positiva entre o consumo de carne vermelha e processada, a carne cozida em altas temperaturas por tempo longo e as AHAs com à RI. Demonstraram também maior prevalência de RI nos indivíduos com alto índice de ingestão de AHAs. A recomendação do consumo de carne vermelha é de duas porções de 100 g por semana e não mais que 50 g de carne processada por semana. O consumo maior que essa recomendação está associada a DHGNA e RI. Porém, são necessários mais estudos para especificar os tipos de carnes e suas quantidades para avançar nos tratamentos dietéticos,



possibilitando a limitação do consumo de carnes não saudáveis e prevenção do uso de métodos de cozimentos prejudiciais.<sup>28</sup>

### **1.3. Polimorfismo no gene da *Patatin-like phospholipase domain containing 3* (PNPLA3) e DHGNA**

A DHGNA é considerada uma doença metabólica e é necessário identificar os fatores de risco modificáveis devido à alta prevalência e incidência na população em geral. A progressão para EHNA é altamente variável e pode ser considerada a interação entre fatores genéticos e ambientais. Estudos têm demonstrado que polimorfismos de nucleotídeos único (SNPs) em genes potencialmente envolvidos no estresse oxidativo, LDN, RI têm papel importante no desenvolvimento e na progressão da DHGNA.<sup>29; 30</sup>

O polimorfismo no gene da *Patatin-like phospholipase domain containing 3* (PNPLA3) tem um impacto importante na suscetibilidade de DHGNA. O gene da PNPLA3 codifica uma proteína de 481 aminoácidos conhecida como adiponutrina (ADPN), localizada no cromossomo 22. A variante I148M do PNPLA3 substitui a isoleucina por metionina na posição do códon 148, por meio da mudança do nucleotídeo C por G (rs738409 c.444 C>G, p. I148M ). ADPN148M tem a função intracelular de regulação do fluxo lipídico em hepatócitos, pertencendo a um grupo de enzimas que metabolizam lipídios. O PNPLA3 tem diversas funções enzimáticas, incluindo a atividade fosfolipase, a atividade hidrolase triacilglicerol e atividades transacetilase lipogênica dependentes ou independentes de acil-CoA.<sup>31; 32</sup>

A expressão genética da PNPLA3 está presente em vários tecidos, mas o nível mais alto é encontrado no fígado, seguido pela retina e tecido adiposo. Constatou-se em portadores da variante rs738409, uma redução na hidrólise de ácidos graxos e um aumento do acúmulo intra-hepático de triacilglicerol, indicando o impacto dessa

variante genética, pois afeta várias vias consideráveis na interação e contribuição significativa para a esteatose hepática.<sup>33; 34</sup>

A variante I148M PNPLA3 foi associada não somente com o aumento do risco de ES, mas também ao desenvolvimento de EHNA, fibrose e cirrose em diferentes populações e etnias, independente do IMC, idade, sexo e sensibilidade à insulina. A DHGNA de causa genética pelo polimorfismo do gene PNPLA3 é caracterizada por triacilgliceróis poli-insaturados, uma discrepância profunda e acentuada na origem de doenças hepáticas gordurosas, já que a de origem metabólica tem como principal causa os ácidos graxos saturados.<sup>34</sup>

Estudo realizado na população japonesa demonstrou que a prevalência de DHGNA recebe maior influência do polimorfismo no gene PNPLA3 em indivíduos não obesos. O PNPLA3 rs738409 pode afetar a patogênese da DHGNA em indivíduos não obesos, ao contrário de indivíduos com a possibilidade de ter um efeito adicional a mudanças no estilo de vida, como o ganho de peso de 10 kg após os 20 anos de idade. Há evidências que indivíduos com o polimorfismo no gene PNPLA3, respondem de maneira mais sensível às mudanças no estilo de vida, sendo importante o estudo para verificar a influência genética e da dieta na DHGNA.<sup>30</sup>

Ratificando dados da literatura em outras populações, nosso grupo recentemente demonstrou que a presença do polimorfismo no gene PNPLA3 aumentou o risco de desenvolvimento da DHGNA na população brasileira e aumentou o risco para RI. Nesse estudo de Mazo e colaboradores (2019), demonstraram que os genótipos CG e GG apresentaram um aumento de riscos para DHGNA em relação ao genótipo CC. Quando avaliaram pacientes com EHNA com o genótipo GG, observaram que os mesmos apresentaram maior nível sérico de aspartato aminotransferase (AST) e alta frequência de fibrose significativa.<sup>35</sup>

## 2. JUSTIFICATIVA

O estudo da associação dos fatores dietéticos e genéticos em uma mesma população com DHGNA ainda são escassos na literatura. A avaliação do papel da dieta na progressão da DHGNA como o consumo de carne vermelha na população brasileira também é escassa. Recentemente, trabalhos Israelenses têm demonstrado que a ingestão de carne vermelha e carnes processadas aumentam os riscos de desenvolvimento de DHGNA. Existem alguns estudos brasileiros, incluindo do nosso grupo, que avaliaram o perfil genético do polimorfismo no gene PNPLA3 o principal marcador genético da DHGNA. Assim, se torna importante avaliar os fatores dietéticos da população com DHGNA e avaliar o perfil genético destes pacientes para ver se existem associações e/ou adições destes fatores na progressão da DHGNA.

### 3. OBJETIVOS

1. Avaliar o consumo de macronutrientes (carboidratos, proteínas e lipídeos), e o consumo de gorduras monoinsaturadas, poli insaturadas, saturadas e de fibras da dieta e caracterizar a frequência alélica do polimorfismo no gene PNPLA3 em pacientes com a DHGNA de um hospital terciário.
2. Avaliar a associação qualitativa e quantitativa da ingesta de carne e a presença do polimorfismo no gene PNPLA3 com a DHGNA.

## **4. MÉTODOS**

### **4.1. Delineamento do estudo**

Trata-se de um estudo transversal onde foram avaliados dados antropométricos e questionários de consumo alimentar em pacientes que realizaram biópsia hepática com diagnóstico de DHGNA no Ambulatório de Doença hepática gordurosa não alcoólica (A2MG700) da Disciplina de Gastroenterologia Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP).

### **4.2. Local e Período da Pesquisa**

Estudo com 91 participantes, homens e mulheres com idade entre 31 a 79 anos, residentes em São Paulo, atendidos no Ambulatório de Doença hepática gordurosa não alcoólica (A2MG700) da Disciplina de Gastroenterologia Clínica do HCFMUSP. Estes pacientes já haviam participado da pesquisa do polimorfismo no gene PNPLA3 e foram convidados para participarem do estudo nutricional. Todas as entrevistas foram realizadas no período de dezembro de 2019 a março de 2021 e ocorreram mediante a assinatura do Termo de consentimento livre esclarecido (TCLE), concordando em participar do estudo.

### **4.3. Critérios de Inclusão**

- a. Ter realizado a coleta para determinação do polimorfismo genético no gene PNPLA3 em qualquer momento do seguimento ambulatorial.
- b. Ter diagnóstico de DHGNA por biópsia hepática.
- c. Concordar em participar do estudo

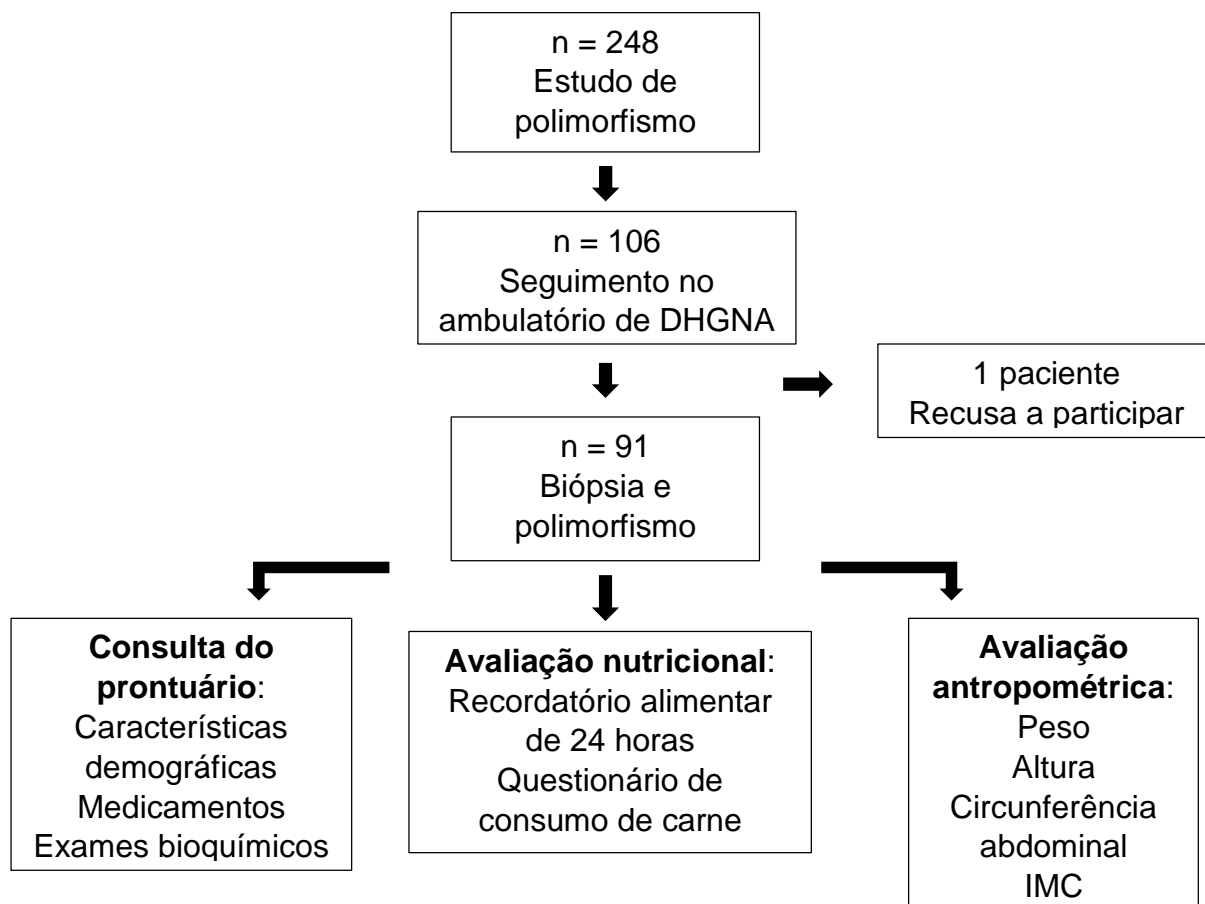
#### 4.4. Critérios de Exclusão:

- a. Presença de anticorpos contra o HBsAg ou anti-HCV, hepatite autoimune, doença de Wilson, hemocromatose hereditária e deficiência de alfa 1 antitripsina;
- b. Presença de um fígado gorduroso secundário a medicamentos hepatotóxicos, doença celíaca e consumo excessivo de álcool (<20 – 30 g/dia).
- c. Ingestão calórica abaixo ou acima do intervalo aceitável para homens 800–4.000 kcal/ dia e para mulheres de 500 a 3.500 kcal/ dia.

#### 4.5. Procedimentos no estudo

- a. Foi realizado um levantamento para verificar quantos dos 248 pacientes que haviam participado previamente do estudo do polimorfismo no gene do PNPLA3 ainda mantinham seguimento ambulatorial. Nesse levantamento verificamos que 106 mantiveram seguimento no período de 2019 a 2021.
- b. Noventa e dois indivíduos foram convidados a participar do estudo nutricional. Destes, 91 aceitaram a participar mediante a assinatura do TCLE (anexo 3).
- c. Análise das características demográficas e histórico médico. Realização do recordatório alimentar de 24 horas (anexo 1).
- d. Realização do questionário de consumo de carnes (QCC) (anexo 2).
- e. Avaliação dos índices antropométricos: altura, peso e circunferência abdominal.
- f. Consulta do prontuário do paciente para análise dos dados clínicos quanto à gravidade de sua doença (exame de biópsia do fígado) e outros fatores de riscos. Foram analisados também todos os exames solicitados rotineiramente pelo médico do paciente e que não são específicos deste estudo. Tais como:

a) exames laboratoriais de sangue: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama glutamil transferase (GGT), colesterol total, colesterol de lipoproteína de densidade baixa (LDL), colesterol de lipoproteína de densidade alta (HLD), colesterol lipoproteína de densidade muito alta (VLDL), glicose e hemoglobina glicada.



**Figura 1:** Fluxograma do estudo. DHGNA, doença hepática gordurosa não alcoólica; IMC, índice de massa corporal.

#### **4.6. Avaliação nutricional**

A análise do consumo alimentar foi baseada no recordatório alimentar de 24 horas. Os macronutrientes (energia total, proteínas, carboidratos e lipídios, incluindo ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados, bem como colesterol), além de fibras alimentares. Os dados foram calculados com o software Avanutri 4.0 (Avanutri, Rio de Janeiro, Brasil).

O consumo de carne foi baseado no questionário específico sobre o consumo de carnes e o seu método de cozimento (QCC), onde foi obtido aproximadamente a quantidade e frequência consumida de cada tipo de carne e do modo de cozimento nas últimas semanas. Após o preenchimento da planilha no Microsoft Excel (versão 2016), foi realizado o cálculo da média do consumo diário de carne vermelha e carne branca (frango e peixe) a partir da frequência e quantidade em gramas. O consumo alto de cada tipo de carne foi estabelecido a partir da mediana do centro específico dos valores obtidos da média de consumo diário, ou seja, aqueles que consumiram igual ou mais que a mediana, foram considerados como consumo alto de carne.

#### **4.7. Antropometria**

- a. Peso: foi aferido na balança digital (modelo InBody720<sup>®</sup>, Seoul, Coreia), estando o participante parado, com o mínimo de roupa possível e descalços.
- b. Altura: foi medido pelo estadiômetro (modelo InBody720<sup>®</sup>, Seoul, Coreia), graduado em centímetro com esquadro móvel, onde o paciente ficou em pé, descalço, com os calcanhares juntos, costas retas e cabeça posicionada num ângulo de 90° com o pescoço.



- c. Índice de Massa Corporal (IMC): foi classificado conforme a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS, 1995)<sup>36</sup> para os adultos (Quadro 1) e a classificação da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS, 2002) para idosos (Quadro 2).<sup>37</sup>

$$IMC = \frac{\textit{peso (kg)}}{\textit{altura}^2(\textit{m})}$$

**Quadro 1:** Classificação do estado nutricional de adultos segundo IMC

Classificação	IMC (kg/m <sup>2</sup> )
Baixo peso	<18,5
Eutrofia	18,5 a 24,9
Pré-obesidade	25 a 29,9
Obesidade grau 1	30 a 34,9
Obesidade grau 2	35 a 39,9
Obesidade grau 3	≥40

Fonte: Organização Mundial de Saúde, 1995

**Quadro 2:** Classificação do estado nutricional de idosos segundo IMC

Classificação	IMC (kg/m <sup>2</sup> )
Baixo peso	≤23
Eutrofia	23 a 28
Excesso de peso	28 a 30
Obesidade	≥30

Fonte: Organização Pan-Americana de Saúde, 2002

- d. Circunferência abdominal: foi utilizada fita métrica flexível e inelástica, com precisão de 0,1 cm. A região medida estava livre de roupas e o participante apresentava na posição ereta, com os braços relaxados ao lado do corpo, pés juntos e abdômen relaxado. A circunferência abdominal é medida no ponto médio entre a crista ilíaca e o rebordo costal inferior, por ser

considerado o índice antropométrico mais representativo da gordura intra-abdominal.<sup>38</sup>

#### **4.9. Avaliação do polimorfismo no gene PNPLA3**

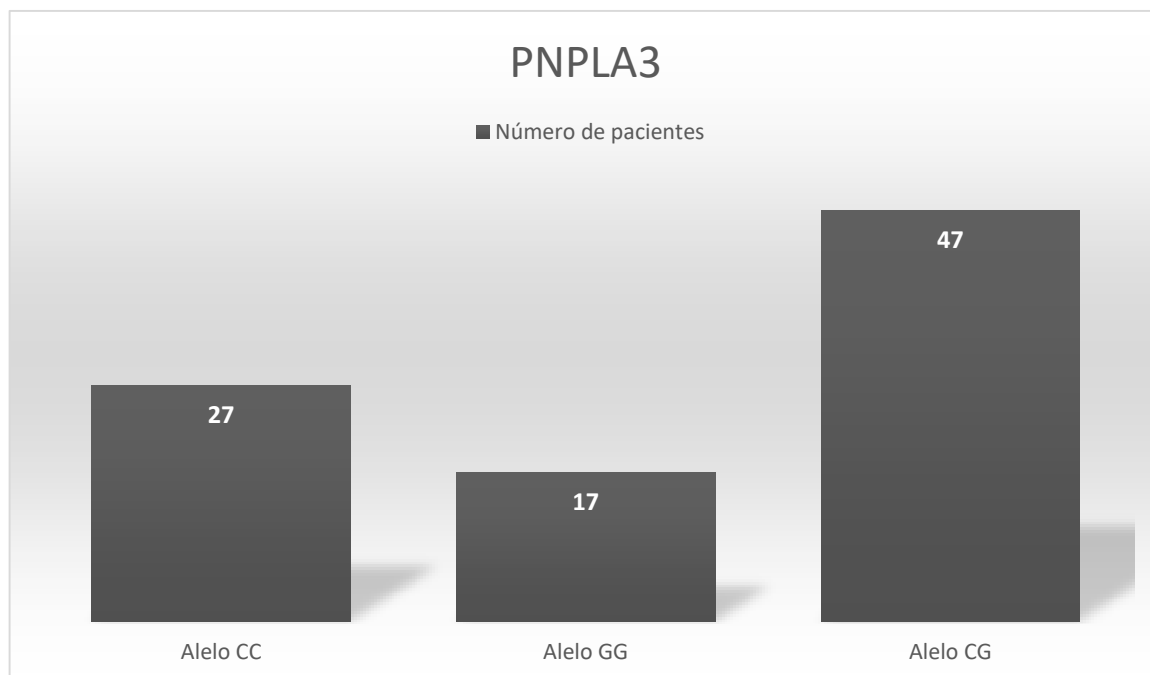
Foi feita a extração do DNA genômico a partir de leucócitos e posterior genotipagem com a amostra de 15 mL de sangue de cada paciente. Foi avaliado o polimorfismo no gene PNPLA3 (rs738409 c.444 C>G, p. I148M). O DNA genômico foi isolado de 200 µL de sangue utilizando o kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha).

A quantificação do DNA foi determinada por espectrofotometria (GeneQuant DNA/RNA Calculator, Pharmacia, LKC Biotechnology, Uppsala, Suécia). O DNA obtido foi armazenado à temperatura de -20 °C.

O polimorfismo foi genotipado por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR), com a utilização de iniciadores específicos e sondas marcadas, que reconhecem cada um dos genótipos possíveis. A RT-PCR foi realizada com a utilização do kit comercial StepOne Plus, Applied Biosystems (Applied Biosystems Foster, Califórnia, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. Foi feita a discriminação alélica medindo a fluorescência alelo-específica no sistema de detecção Opticon 2 (MJ Reserch, Walyham, MA, USA). Amostras aleatórias foram confirmadas por genotipagem direta para avaliar resultados concordantes.

#### 4.9.1 Divisão dos grupos de acordo com o polimorfismo

Foram divididos em três grupos, o primeiro com 27 pacientes com o polimorfismo no gene PNPLA3 alelo CC, o segundo com 17 pacientes com GG e por último o grupo do CG com o maior número de 47 pacientes (gráfico 1).



**Gráfico 1.** Distribuição dos pacientes com Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) de acordo com os alelos após a genotipagem do gene da *Patatin-like phospholipase domain containing 3* (PNPLA3).

#### 4.10. Análise estatística

Os dados foram descritos como média  $\pm$  desvio padrão para variáveis com distribuição normal. Para os testes paramétricos foi utilizado teste T de Student, para os testes não paramétricos, U Mann-Withney, conforme a distribuição da variável (normal ou não) e homogeneidade da variância. Variáveis categóricas foram comparadas por teste de Qui-quadrado ou teste exato de Fisher. A análise descritiva dos dados qualitativos foi feita por meio de proporções, com o intervalo de confiança

de 95%. O nível de significância adotado foi de 5% e níveis descritivos inferiores a esse valor ( $p < 0,05$ ) foram considerados significantes. Para estimar a magnitude da associação da DHGNA entre o polimorfismo e o consumo de carne, foi utilizado a estimativa do risco relativo [do inglês: *Odds Ratio* (OD)].

#### **4.11. Aspectos Éticos**

O estudo foi realizado de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Declaração de Helsinki e com a aprovação do protocolo pela Comissão Ético-Científica do Departamento de Gastroenterologia e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP (CAPPesq), número do parecer 3.691.104. (Anexo 4).

Todos os pacientes ou seus responsáveis legais receberam informações claras, em linguagem acessível, acerca dos objetivos do estudo, procedimentos necessários, riscos e benefícios esperados, devendo assinar o termo de consentimento pós-informado. Os autores do projeto declaram que não possuem qualquer vinculação com os fabricantes dos equipamentos, não havendo qualquer relacionamento que possa ser considerado conflito de interesses (Anexo 5).

## 5. RESULTADOS

Foram convidados a participar do estudo 92 pacientes, porém, uma paciente recusou a participar do estudo por encontrar dificuldades de locomoção e tempo para a coleta.

Observou-se que dos 91 pacientes o sexo feminino foi predominante com 78%. A média de idade foi de  $64 \pm 9$  anos (31 e 79 anos). A média do IMC foi de  $32,38 \pm 4,58$  kg/ m<sup>2</sup> e da circunferência abdominal foi de  $107 \pm 10$  cm. Observou que 74% dos pacientes apresentavam DMT2, 70% dislipidemia e 76% com hipertensão arterial. (Tabela 1).

Ao avaliarmos os resultados laboratoriais, a média da glicose foi de  $132 \pm 51$ mg/ dl e da hemoglobina glicada foi de  $7 \pm 1.8\%$ . Em geral, o perfil lipídico estava dentro dos limites de normalidade, sendo o colesterol total de  $165 \pm 36$  mg/ dl, o HDL colesterol de  $49 \pm 15$  mg/ dl, LDL colesterol de  $90 \pm 32$  mg/ dl, lembrando que estes pacientes estavam em acompanhamento no serviço há pelo menos 5 anos. A média dos triglicérides foi de  $148 \pm 61$  mg/ dl, ALT de  $37 \pm 24$  U/ L, AST de  $31 \pm 17$  U/ L e GGT foi de  $72 \pm 88$  U/ L (Tabela 1).

A biópsia hepática mostrou fibrose significativa ( $\geq F2$ ) em 42% dos pacientes. (Tabela 1).

**Tabela 1.** Características clínicas e demográficas relativas à frequência de acordo com o número obtido para cada variável

Variáveis	n	Média ± desvio padrão ou % (n)
Sexo (feminino) %	91	78
Idade (anos)	91	64 ± 9
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	91	32.4 ± 4.6
Circunferência abdominal (cm)	91	107 ± 10
Diabetes mellitus (%)	91	74
Dislipidemia (%)	91	70
Hipertensão arterial sistêmica (%)	91	76
Esteatose leve (%)	91	66
Esteatose significativa (%)	91	34
Inflamação lobular ausente ou leve (%)	87	48
Inflamação lobular significativa (%)	87	47
Balonização leve (%)	89	37
Balonização significativo (%)	89	60
Fibrose leve (%)	88	55
Fibrose significativa (%)	88	42
Glicose plasmática (mg/dl)	89	132 ± 51
HbA1c (%)	84	7 ± 1.8
Plaqueta (mil/mm <sup>3</sup> )	91	245 ± 72
Colesterol total (mg/dl)	88	165 ± 36
Colesterol HDL (mg/dl)	87	49 ± 15
Colesterol LDL (mg/dl)	86	90 ± 32
Triglicérides (mg/dl)	88	148 ± 61
ALT (U/L)	89	37 ± 24
AST (U/L)	89	31 ± 17
GGT (U/L)	87	72 ± 88

**Abreviações:** IMC: índice de massa corpórea; HbA1c: hemoglobina glicada; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; GGT: gamaglutamil transferase.

A média de ingestão calórica foi baixa de 1170 ± 463,20 kcal/ dia e a média do consumo dos macronutrientes foi de 54,8 ± 12,1% para carboidrato, 19,7 ± 7,7% de proteína e de 25,5 ± 9,7% de gordura total do valor energético total (VET).

A média da gordura saturada foi de 10,2 ± 7,2 g, gordura poli-insaturada de 4,7 ± 4,5 g e de gordura monoinsaturada de 22,1 ± 134,4 g. O consumo de colesterol foi de 166.7 ± 135,2 mg (tabela 2).

**Tabela 2.** Características da ingestão calórica diária, macronutrientes, das gorduras e fibras

Variáveis	n	Média
Ingestão calórica diária (<2000kcal/d)	91	1170 ± 463.2
Ingestão de carboidratos (<60%)	91	54.8 ± 12.1
Ingestão de proteínas (>10%)	91	19.7 ± 7.7
Ingestão de lipídeos (<35%)	91	25.5 ± 9.7
Gordura saturada (g)	91	10.2 ± 7.2
Gordura poli-insaturada (g)	91	4.7 ± 4.5
Gordura monoinsaturada g (g)	91	22.1 ± 134.4
Colesterol (<300mg)	91	166.7 ± 135.2
Fibras (>14g)	91	10.4 ± 5.4

Ao compararmos o consumo de carne por grupos, observamos que existe um consumo maior de frango e peixe em relação ao consumo de carne em geral, sendo a média diária total de carne vermelha de 40g e de carne branca de 65,4g (tabela 3).

**Tabela 3.** Média diária da ingestão de carnes distribuídos por tipos

	Tipo de carne	n	Média
Consumo de carne vermelha	Bife grelhado (g)	91	62 ± 54
	Bife de panela (g)	91	42 ± 55
	Carne cozida com molho (g)	91	50 ± 54
	Hamburguer (g)	90	16 ± 29
	Carne moída sem molho (g)	90	28 ± 34
Total			40
Consumo de carne branca	Frango grelhado (g)	90	88 ± 77
	Frango assado (g)	90	63 ± 62
	Frango cozido com molho (g)	90	54 ± 58
	Peixe assado (g)	91	39 ± 102
	Peixe grelhado (g)	91	34 ± 78
	Peixe cozido com molho (g)	91	60 ± 74
Total			65,4

O consumo de carne foi categorizado como pouco (menor que a mediana) ou muito (maior ou igual a mediana), dado que a mediana diária do consumo de carne vermelha foi de 35 g e da carne branca foi 60 g. Ao compararmos o fator de risco polimorfismo no gene PNPLA3 nos pacientes que apresentaram o consumo baixo de carnes, ou seja, excluindo o fator de risco consumo alto de carnes vermelha e branca,

observamos o OR para fibrose significativa de 2,12 (IC 95%, 0,59 – 7,57) para o grupo PNPLA3 alelo GG e de 1,54 (IC 95%, 0,56 – 4,21) para o grupo CG em relação ao grupo PNPLA3 alelo CC. Estimativas das razões de chances (OR) com os respectivos intervalos de confiança aproximados (coeficiente de confiança de 95%) estão apresentados na tabela 4.

**Tabela 4.** Polimorfismo como fator de risco para DHGNA. Razões de chances (*odds ratios*) calculadas relativamente a pacientes com PNPLA3 =CC e pouco consumo de carnes vermelha e branca

Pacientes com	Razão de chances	Limites do IC (95%)	
	(OD)	inferior	superior
PNPLA3=GG + pouca carne	2.12	0.59	7.57
PNPLA3=CG + pouca carne	1.54	0.56	4.21

**Abreviações:** OD: odds ratio; IC: intervalo de confiança

Já àqueles com o fator de risco o consumo de muita carne vermelha nos pacientes com o alelo CC, ou seja, excluindo o fator de risco polimorfismo, apresentaram OR para fibrose significativa de 1,33 (IC 95%, 0,56 – 3,17) em relação ao grupo com pouco consumo de carnes. De maneira oposta, o grupo de consumo de muita carne branca não apresentou uma relação com a fibrose significativa, com OR de 0,80 (IC 95%, 0,35 – 2,92) (tabela 5).

**Tabela 5.** Consumo alto de carne como fator de risco para DHGNA. Razões de chances (*odds ratios*) calculadas relativamente a pacientes com PNPLA3 =CC e pouco consumo de carnes vermelha e branca

Pacientes com	Razão de chances	Limites do IC (95%)	
	(OD)	inferior	superior
Muita carne vermelha $\geq 35g$ +PNPLA3=CC	1.33	0.56	3.17
Muita carne branca $\geq 60g$ +PNPLA3=CC	0.80	0.35	2.92

**Abreviações:** OD: odds ratio; IC: intervalo de confiança



Ao realizar uma análise de sensibilidade com a inclusão de outros fatores de riscos e variáveis de controle, encontramos um resultado com uma estabilidade dos coeficientes dos fatores de risco, sendo eles o PNPLA3 e consumo de carnes. Exceto pelo coeficiente de fator de risco o consumo alto de carne branca, a grande maioria das variáveis mostraram uma estabilidade dos coeficientes dos fatores de risco alelo G e consumo alto de carne vermelha para a fibrose significativa (tabela 6).

**Tabela 6.** Outros fatores de riscos e variáveis de controle em relação ao coeficiente polimorfismo e consumo de carnes vermelhas e brancas

Variável adicionada	Coeficiente de				Variável adicionada
	PNPLA3 =GG	PNPLA3 =CG	Carne vermelha = muito	Carne branca = muito	
Diabetes	1.078	0.772	0.438	-0.112	-1.350
Hipertensão	0.751	0.441	0.225	-0.266	0.379
Dislipidemia	0.796	0.456	0.260	-0.231	-0.158
Idade	0.758	0.466	0.256	-0.303	-0.881
IMC	0.949	0.369	0.470	0.066	-17.214
C. abdominal	0.769	0.445	0.283	-0.253	-0.581
Ingestão calórica	0.958	0.302	0.348	-0.124	0.584
Carboidratos	0.808	0.415	0.126	-0.277	-0.719
Proteína	0.854	0.519	0.235	-0.156	0.326
Lipídeos	0.818	0.518	0.437	-0.215	-0.412
G saturada	0.761	0.388	0.194	-0.192	0.529
G poli-insaturada	0.740	0.435	0.294	-0.214	-0.360
G monoinsaturada	0.676	0.364	0.316	-0.260	-15.271
Colesterol	0.864	0.524	0.247	-0.384	0.709
Fibras	0.787	0.454	0.291	-0.228	-0.236
Glicose	0.755	0.569	0.428	-0.060	0.590
HbA1c	0.899	0.516	0.308	-0.155	0.594
Plaquetas	0.790	0.555	0.400	-0.201	18.093
Colesterol total	0.764	0.303	0.316	-0.173	0.541
HDL colesterol	0.753	0.255	0.232	-0.145	0.240
LDL colesterol	0.723	0.178	0.366	-0.093	-0.370
Triglicérides	0.762	0.291	0.259	-0.183	0.225
ALT	0.697	0.290	0.268	-0.248	0.439
AST	0.625	0.293	0.256	-0.180	0.514
GGT	0.663	0.238	0.304	-0.159	0.170

**Abreviações:** IMC: índice de massa corpórea; C. abdominal: circunferência abdominal; G saturada: gordura saturada; G poli-insaturada: gordura poli-insaturada; G monoinsaturada: gordura monoinsaturada; HbA1c: hemoglobina glicada; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; GGT: gamaglutamil transferase

## 6. DISCUSSÃO

Nosso estudo demonstra pela primeira vez que a alta ingestão de carne vermelha associada a presença do alelo G do polimorfismo PNPLA-3 (GG ou CG) parecem ter um efeito sinérgico no risco de desenvolvimento da DHGNA e fibrose hepática. A exposição combinada do alto consumo de carne vermelha e/ou processada pode aumentar a chance de DHGNA em pessoas que apresentem o polimorfismo no gene PNPLA3.

No presente estudo, provavelmente por se tratar de pacientes acompanhados há longo tempo (mais que 5 anos) em hospital terciário, houve uma alta prevalência de fatores de riscos metabólicos acima de 70% (74% eram diabéticos; 70% com dislipidemia, 76% hipertensos, sem mencionar a obesidade (média de IMC  $32,38 \pm 4,58$  kg/m<sup>2</sup>) e a gordura visceral (circunferência abdominal de  $107 \pm 10$  cm). Estudos recentes têm demonstrado em pacientes com DHGNA, prevalência de 70 a 90% de dislipidemia, hipertensão arterial em 60% e DMT2 em 40 a 60%, taxas estas menores que as encontradas em nosso estudo. Esta alta prevalência de fatores metabólicos nesta população selecionada de um hospital terciário, pode refletir a gravidade da fibrose demonstrada nesta amostra, principalmente pela relação conhecida entre fatores de risco cardio-metabólicos, vias pró-inflamatórias e pró-fibróticas, existente na DHGNA. Além disso, nos estudos mencionados acima, 70% dos indivíduos com DHGNA eram obesos, que não foi diferente da nossa amostra que apresentou uma média de IMC de  $32,38 \pm 4,58$ , considerado como obesidade grau I. <sup>39; 40; 41</sup>

A intervenção dietética com restrição calórica e qualidade similar ao da dieta mediterrânea apresentam benefícios para os pacientes com DHGNA. A ingestão calórica de pacientes com DHGNA têm se mostrado elevada em alguns estudos. <sup>42;</sup>

Estudo alemão demonstrou que pacientes com DHGNA apresentam ingestão calórica média total de 2739 kcal (intervalo 1009–5941) comparado com 2173 kcal (1199-4320) no grupo controle ( $P < 0,001$ ).<sup>42</sup>

No presente estudo, observamos que a ingestão calórica foi baixa ( $1170 \pm 463,20$  kcal/ dia) comparada a outros estudos como demonstrado acima. Contudo, lembramos que essa população já vinha sendo acompanhada por mais de 5 anos com equipe multidisciplinar, incluindo acompanhamento dietético, podendo gerar um viés na interpretação da amostra de ingestão calórica baixa. Por outro lado, no que se refere a qualidade da dieta e dos macronutrientes desses pacientes acompanhados, observou-se que a média do consumo de carboidrato foi de  $54,8 \pm 12,1\%$ ,  $19,7 \pm 7,7\%$  de proteína e  $25,5 \pm 9,7\%$  de gordura total do valor energético total (VET), com 10g de gordura saturada e 22g de gordura monoinsaturada. Qualitativamente, a dieta dos pacientes do presente estudo não diferiram de estudo italiano, que mostrou que a dieta mediterrânea com ajuste de 1400 a 1600 kcal/ dia, 50-60% carboidrato, 15-20% proteínas, 30% de gorduras mono e poli-insaturadas e menos de 10% de saturada por seis meses, reduziu peso (83 para 78 kg), IMC (31 para 29kg/ m<sup>2</sup>), circunferência abdominal (108 para 102cm), além de melhora significativa no perfil lipídico, como redução de triglicérides e LDL colesterol e índice FLI [*Fatty Liver Index* (método não invasivo que avalia gordura hepática)]<sup>44</sup>. A dieta mediterrânea é indicada por muitos estudos, contudo existe algumas barreiras como a diferença socioeconômica e variadas regiões geográficas onde o acesso de alguns alimentos são mais difíceis e de custo alto. A dieta deve ser individualizada, ajustada culturalmente e garantir a disponibilidade de alimentos. Recomenda-se a redução da ingestão de gordura saturada e trans, produtos açucarados e com frutose, dando preferência para alimentos minimamente industrializado e feito em casa. <sup>45</sup> Portanto, a restrição

calórica e uma adaptação com mais qualidade lipídica são benéficas para DHGNA e SM.

Embora os pacientes demonstraram uma ingesta calórica mais baixa que em outros estudos de DHGNA, os mesmos por outro lado, apresentam consumo alto de carne vermelha que tem uma relação positiva para o risco de fibrose. Foi demonstrado também que o consumo alto de carne branca retratou uma menor chance de fibrose significativa.

A relação da alta ingestão de carne e DHGNA foi avaliado em um estudo no sul da China, onde foi aplicado o questionário semiquantitativo de frequência alimentar em 1594 indivíduos. Foram avaliados em quatro grupos de acordo com a quantidade de carne consumida. O grupo com o maior consumo de carne foi associado ao risco para DHGNA na análise de probabilidade inversa de ponderação de tratamento.<sup>46</sup>

Recentemente Ivancovsky-Wajcman e colaboradores (2022), demonstraram que o consumo maior de carne vermelha e processada estão associadas com alterações no exame de ALT e com a presença maior de fibrose em pacientes com DHGNA.<sup>47</sup> Além disso, em outro estudo de coorte multiétnica realizado com 2974 casos de DHGNA, apresentaram a associação do alto consumo de carne vermelha com a doença foi positiva, ambos corroborando com o nosso achado.<sup>48</sup>

O consumo de carne vermelha pode aumentar o risco de doenças crônicas devido a formação de produtos finais da glicação avançada [AGEs – (do inglês: *advanced glycation end products*)] no processo de cozimento, principalmente em alta temperatura (acima de 150 °C) e por tempo prolongado que aumentam o estresse oxidativo e estimulam a inflamação. O aumento dos níveis séricos de AGEs por fatores exógenos, apresentou relação entre RI e os indivíduos com DHGNA.<sup>45</sup>

Em um estudo com 170 indivíduos, recordatório alimentar de três dias foram analisados de acordo com padrão da dieta (ocidental e saudável). O padrão alimentar ocidental que tem como base o consumo de carnes vermelhas e brancas, grãos refinados e refrigerantes, foi associado a uma chance maior para fibrose. No presente estudo, cerca de 40% dos pacientes apresentavam fibrose significativa ( $\geq F2$ ) que tiveram uma tendência de associação ao maior consumo de carne vermelha. No entanto, a dieta com padrão considerado saudável (alta ingestão de laticínios de baixo teor de gordura, carnes brancas, vegetais e frutas) em quantidades elevadas, apresentou baixa chance de fibrose hepática.<sup>49</sup> Já a ingestão de carne vermelha e de colesterol foram associados como fatores prejudiciais para DHGNA relacionados a cirrose.<sup>45</sup>

No que se refere ao estudo genético do polimorfismo do gene PNPLA3, nosso estudo obteve o maior número de pacientes com o alelo CG, existindo um risco aumentado para fibrose na presença do alelo mutante G.<sup>35</sup> Em um estudo com pré-diabéticos obesos, os indivíduos com o PNPLA3 variantes CG e GG obtiveram uma chance 9,6 vezes maior risco para distúrbios glicídicos e três vezes maior para desenvolver distúrbios metabólicos comparados com a variante CC. A frequência do alelo G foi significativamente maior nos pacientes obesos pré-diabéticos em relação aos não pré-diabéticos.<sup>50</sup> Em um estudo de meta análise que associou o polimorfismo e suscetibilidade à DHGNA, apresentou os valores OR de 2.76 entre os alelos GG x CC e 1.57 entre os alelos GC x CC, semelhantes ao nosso estudo.<sup>51</sup>

Contudo, embora existissem estudos que confirmam a associação entre o consumo de carne vermelha, DHGNA e fibrose e, presença do alelo G do gene do PNPLA3 e maior chance de DHGNA e fibrose, este é o primeiro estudo que sugere que associação do fator ambiental (maior ingestão de carne vermelha) e a presença

do polimorfismo do PNPLA3 pode ter efeito sinérgico, mesmo sem significância estatística pelo tamanho amostral. Com uma amostra de tamanho maior, provavelmente poderia se obter uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Por outro lado, Seko e colaboradores (2021) demonstraram uma correlação da redução da rigidez hepática com a perda de peso corporal no genótipo CG e GG depois de um ano de tratamento dietético. Ao mesmo tempo que o alelo G é conhecido por agravar a doença, pode ser um fator que apresenta uma resposta melhor nos tratamentos de mudança de estilo de vida e cirurgia bariátrica para a redução da gordura hepática.<sup>52</sup> Sugere-se que a variante PNPLA3 148M promove uma supressão significativa da lipólise periférica após a dieta cetogênica, aumentando o efeito antilipolítico da insulina e conseqüentemente uma melhora maior na sensibilidade à insulina.<sup>53</sup> Isso comprova novamente que essa doença é complexa e que seu tratamento precisa ser individualizado.

A explicação para que a presença do polimorfismo do PNPLA3 aumente o risco do desenvolvimento da DHGNA porque no retículo endoplasmático e nas membranas das gotículas lipídicas dos hepatócitos, o gene PNPLA3 tem atividade aciltransferase e hidrolase do diacilglicerol. Alguns estudos relataram a inibição da hidrólise dos triglicérides como a possível causa do distúrbio da mobilização dos lipídeos. Outros sugerem a mutação I148M como um fenótipo mais inflamatório e fibrogênico, devido a retenção de retinol nos hepatócitos estrelados e um mecanismo de perda de feedback contra a fibrose encontrado. Dentro deste contexto, a adiposidade foi mostrada como amplificadora dos efeitos dos alelos de risco do polimorfismo, sendo importante destacar os fatores nutricionais ao determinar o risco genético para DHGNA<sup>54 35</sup>, ou melhor, a ingestão maior de carne vermelha em indivíduos com a

presença de um alelo G pode amplificar a resposta da predisposição genética da DHGNA e fibrose.

As limitações do presente estudo se referem principalmente ser uma amostra pequena, de hospital terciário com maior número de casos de fibrose significativa, ter sido utilizado questionário alimentar de 24 horas que depende da memória do paciente. Além disso, embora seja um estudo transversal, os pacientes já vinham sendo acompanhados no serviço com equipe multidisciplinar há longo tempo que pode ser um viés na avaliação da quantidade e qualidade alimentar desses pacientes.

Existe necessidade de confirmação em um número maior de pacientes e em diferentes populações. Se este sinergismo for confirmado, poderemos recomendar a redução do consumo de carne vermelha em pessoas com polimorfismo no gene PNPLA3.

## 7. CONCLUSÕES

1. A média de ingestão calórica foi baixa em relação ao esperado para uma população com sobrepeso, obesidade e DHGNA.
2. A distribuição de macronutrientes (carboidratos, proteínas e gorduras) está adequada para o valor energético total da dieta.
3. O consumo de gorduras totais, incluindo gordura saturada, monoinsaturada e colesterol total obtido pelos recordatórios alimentares encontram-se dentro dos limites de ingestão diária recomendados.
4. A frequência alélica para o gene PNPLA3 encontrada em nossa casuística (29,7% CC, 18,7% GG e 51,6% CG) encontra-se de acordo com a distribuição encontrada em estudos prévios nesta população.
5. A alta ingestão de carne vermelha e o polimorfismo no gene PNPLA3 parece ter um efeito sinérgico na DHGNA e fibrose hepática.



## 8. ANEXOS

### 8.1 Anexo 1 – Ficha de Avaliação Nutricional e recordatório alimentar de 24 horas

#### FICHA DE AVALIAÇÃO NUTRICIONAL E QUESTIONÁRIO DE FREQUÊNCIA ALIMENTAR

Identificação (Data da consulta: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_)

Nome: \_\_\_\_\_

Nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_ Profissão: \_\_\_\_\_

Fone: \_\_\_\_\_ Nº ICHC \_\_\_\_\_

Data Biópsia: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Classificação: \_\_\_\_\_

Peso: \_\_\_\_\_ Altura: \_\_\_\_\_ IMC: \_\_\_\_\_ Circ. abdominal \_\_\_\_\_

#### Histórico Clínico

	Cardiopatia		Anormalidade respiratória
	Doença coronária		Esteatose hepática
	Diabetes mellitus		Anormalidade endócrina
	Dislipidemias		HAS
	Depressão		Pro. Músc. Esquelético
	Infertilidade		Outros

#### RECORDATÓRIO DE 24HS

Café da manhã – Horário: \_\_\_\_\_ Local: \_\_\_\_\_

---



---



---

Lanche – Horário: \_\_\_\_\_ Local: \_\_\_\_\_

---



---

Almoço – Horário: \_\_\_\_\_ Local: \_\_\_\_\_

---



---



---

Lanche – Horário: \_\_\_\_\_ Local: \_\_\_\_\_

---



---

Jantar – Horário: \_\_\_\_\_ Local: \_\_\_\_\_

---



---



---

Ceia – Horário: \_\_\_\_\_ Local: \_\_\_\_\_

---



---

## 8.2 Anexo 2 – Questionário de Consumo de Carne

## QUESTIONÁRIO DE CONSUMO DE CARNE

Tipo de Carne	Grau de cozimento	Porções por dia (g)	Porções por semana (g)	Porções por mês (g)	Menos que 1 vez por mês (g)
Bife grelhado	Mal passado				
	Médio				
	Bem passado				
	Muito bem passado				
Bife de panela	Mal passado				
	Médio				
	Bem passado				
	Muito bem passado				
Carne assada no forno	Mal passado				
	Médio				
	Bem passado				
	Muito bem passado				
Carne cozida com molho					
Hamburger ou kebabs grelhados	Mal passado				
	Médio				
	Bem passado				
	Muito bem passado				
Hamburger ou kebabs na panela	Mal passado				
	Médio				
	Bem passado				
	Muito bem passado				
Empada de carne frita					
Empada de carne cozida					
Carne de vaca picada com molho					
Carne de vaca picada sem molho					
Cordeiro grelhado	Mal passado				
	Médio				
	Bem passado				
	Muito bem passado				
Cordeiro de panela	Mal passado				
	Médio				
	Bem passado				
	Muito bem passado				
Cordeiro no forno	Mal passado				
	Médio				
	Bem passado				
	Muito bem passado				
Cordeiro cozido com molho					
Frango no forno					
Frango frito					
Frango cozido com molho					
Frango grelhado	Mal passado				
	Médio				
	Bem passado				
	Muito bem passado				
Frango na água					
Salsicha de frango grelhado	Mal passado				
	Médio				
	Bem passado				
	Muito bem passado				
Salsicha de frango de panela	Mal passado				
	Médio				
	Bem passado				
	Muito bem passado				
Peixe no forno (com tampa)					
Peixe no forno (sem tampa)					
Peixe grelhado					
Peixe frito					
Peixe com molho					

### 8.3 Anexo 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

1 de 6

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

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**DADOS DA PESQUISA**

**Título da pesquisa** Avaliação da Interação entre a Influência do Polimorfismo no Gene da Patatin-Like Phospholipase Domain Containing 3 (PNPLA3) e a Dieta em Pacientes com Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA)

**Pesquisador principal** – Professora Dra. Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira

**Cargo/Função:** professora livre docente da Divisão de Gastroenterologia; inscrição no conselho regional de medicina 75499.

**Departamento/Instituto** – Divisão de Gastroenterologia e Hepatologia do Instituto Central

#### **Introdução**

A Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA) é a doença mais comum do fígado, que pode se tornar crônica em alguns casos. Uma das manifestações importantes é o depósito de gordura (esteatose) no fígado, que está relacionado com obesidade, diabetes, pressão alta e aumento das gorduras do sangue. O objetivo deste estudo é avaliar a associação dos fatores genéticos e de alguns alimentos com a esteatose (gordura) hepática. Este estudo será desenvolvido somente em pacientes que já tenham efetuado a biópsia de fígado até 1 ano e realizado a pesquisa de polimorfismo do PNPLA3, que é seu caso.

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

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

#### **Desenho do estudo e objetivos:**

**Descrição dos procedimentos que serão realizados especificamente para a pesquisa.**

---

Rubrica do Participante da Pesquisa /  
Representante legalmente autorizado  
(se aplicável)

---

Rubrica do Investigador

---

Rubrica da Testemunha (se aplicável)

2 de 6

Caso decida participar no estudo no primeiro, realizaremos os seguintes procedimentos:

Você passará por avaliações que incluirão:

- consulta com o nutricionista, na qual você responderá a questionários de avaliação do consumo alimentar, terá seu peso, altura e circunferência da cintura medidos, assim como cálculo de seu índice de massa corpórea e descrição de sua composição corporal de gordura por meio do teste de Bioimpedância.

- 1- Relação dos procedimentos rotineiros (seriam feitos de qualquer maneira, pois são solicitados pelo seu próprio médico. Não são específicos da pesquisa)
- 2- Descrição dos desconfortos e risco esperados

Bioimpedância: o exame de Bioimpedância não ocasiona dor nem mal-estar. Não há desconforto esperado na realização deste exame.

#### Benefícios para o participante

Você será avaliado e iremos desenvolver condutas dietéticas adequadas à sua condição clínica e física. Se você participar deste estudo poderá melhorar a sua alimentação, reduzir o seu peso corporal e conseqüentemente o depósito de gordura no seu fígado, o que trará benefícios para sua saúde e proporcionará maior qualidade de vida.

- 3- Garantia de contato com os médicos da pesquisa

Em qualquer etapa do estudo, o senhor (a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas.

A investigadora principal é a Dra Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira e o pesquisador executante é a nutricionista Silvia Massami Yoshimura. Ambos podem ser encontrados no seguinte endereço: Secretaria da Divisão de Gastroenterologia e Hepatologia Clínica, Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 9<sup>o</sup> andar, sala 9159. Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255, São Paulo- SP. Telefone: (011) 2661-7830 Em caso de emergência médica o telefone de contato de plantão (24 horas por dia, sete dias por semana) é 2661-3339.

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 – 5<sup>o</sup> andar – telefone: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549; e-mail: [cappesq.adm@hc.fm.usp.br](mailto:cappesq.adm@hc.fm.usp.br) Horário

---

Rubrica do Participante da Pesquisa /  
Representante legalmente autorizado  
(se aplicável)

---

Rubrica do Investigador

---

Rubrica da Testemunha (se aplicável)

de atendimento ao público: 08h às 16 horas. O Comitê de Ética em Pesquisa tem como finalidade garantir que a pesquisa se desenvolverá de acordo com as normas éticas e legais, cabendo a ele fiscalizar que todos os procedimentos exigidos por lei serão cumpridos. Deste modo, o Comitê tem um papel importante na monitorização do andamento de uma pesquisa e deverá ser consultado sempre que surgirem dúvidas.

- 4- É garantida a liberdade de retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na instituição.**

Sua participação é totalmente voluntária, podendo negar-se a participar ou podendo retirar seu consentimento a qualquer momento, sem necessitar explicar os motivos da sua decisão. Não haverá prejuízo ou nenhuma repercussão para o seu tratamento em caso de retirada do consentimento e o senhor (a) continuará a receber o mesmo tratamento oferecido aos demais pacientes atendidos nesta instituição. Se no futuro desejar anular seu consentimento, suas amostras de materiais biológicos serão destruídas e os dados associados serão retirados da coleção do estudo. Entretanto, não será possível retirar seus dados de estudos que já tenham sido finalizados ou publicados no momento da solicitação de retirada de consentimento.

- 5- Direito de confidencialidade – Não será divulgada a identidade de nenhum paciente. Será mantido sigilo, conforme preceitua o código de ética médica. Os dados coletados no estudo serão identificados com um código e somente os médicos do estudo podem relacionar esses dados com o senhor (a) e com seu histórico médico. Portanto, sua identidade não será compartilhada com ninguém, exceto nos casos exigidos por lei. Será cumprido, em todas as etapas, o dever de sigilo. Todas as medidas de segurança e proteção de dados pessoais serão tomadas, em conformidade com a legislação vigente. As publicações resultantes não mencionarão em nenhuma hipótese dados pessoais. Assim como o sigilo da sua identidade será garantido, todas as medidas e cautelas necessárias serão tomadas para evitar e proteger contra qualquer tipo de discriminação ou estigmatização social, individual ou coletiva.**

---

Rubrica do Participante da Pesquisa /  
Representante legalmente autorizado  
(se aplicável)

---

Rubrica do Investigador

---

Rubrica da Testemunha (se aplicável)

**6- Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas - ao menos dos resultados que já sejam do conhecimento dos pesquisadores na data solicitação.**

Fica garantido o direito de ser informado sobre resultados parciais e finais da pesquisa, mediante solicitação do participante. Esclarecemos que nem sempre resultados de pesquisas recebem aprovação ou tem aplicabilidade imediata para o tratamento de novos pacientes e não podem ser considerados de valor clínico para o participante do estudo. Entretanto, caso o Comitê de Ética considere que os resultados são altamente relevantes para o paciente ou sua família, estes serão comunicados aos interessados. Caso queira receber informações sobre resultados da pesquisa, solicitamos que entre em contato com os pesquisadores ou com o Comitê de Ética, nos endereços citados no final deste documento. Informamos que por motivos éticos, caso surja algum resultado ou informação que possa evitar prejuízos à sua saúde ou de seus familiares, comunicaremos à Comissão de Ética para que analise a situação e decida se é conveniente informá-lo ou a seus representantes legais. Informamos que o estudo poderá ser interrompido por decisão dos investigadores, para salvaguardar a segurança do participante da pesquisa. Caso seja necessário interrompe-lo por qualquer motivo, comunicaremos ao Comitê de Ética as razões que levaram à descontinuação do estudo. Fica garantido ao paciente que, em caso de interrupção do estudo, por qualquer que seja o motivo, o seu atendimento e tratamento na instituição será mantido, pelo período de tempo necessário, uma vez que o estudo é observacional e não interfere no modo como o paciente é tratado na instituição.

**Despesas e compensações:** não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional ela será paga pelo orçamento da pesquisa. Fica assegurado ao paciente demandar por indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa, conforme as leis do país. O estudo tem caráter observacional (não haverá interferência no tratamento habitual), de modo que não foi contratado nenhum tipo de seguro. A sua participação e a doação de amostras biológicas será gratuita. Não haverá nenhum benefício econômico pessoal direto ou indireto, atual ou futuro, por sua participação, que é voluntária e tem como objetivo ajudar o progresso da ciência. É importante que o (a) senhor (a) saiba que não terá direitos comerciais sobre possíveis

---

Rubrica do Participante da Pesquisa /  
Representante legalmente autorizado  
(se aplicável)

---

Rubrica do Investigador

---

Rubrica da Testemunha (se aplicável)

5 de 6

benefícios ou descobertas que eventualmente surjam nesta pesquisa ou estudos futuros dela decorrentes. Os pesquisadores se comprometem a tratar no complexo HCFMUSP quaisquer danos à saúde decorrentes direta ou indiretamente da pesquisa, inclusive aqueles surgidos em situações de emergência.

- 7- **Consentimento para participar.** Fui suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Avaliação da Interação entre a Influência do Polimorfismo no Gene da Patatin-Like Phospholipase Domain Containing 3 (PNPLA3) e a Dieta em Pacientes com Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA)". Eu discuti com o pesquisador responsável pela pesquisa sobre minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os objetivos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade 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. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades.

Recebi uma via do termo de consentimento, assinada por mim (ou representante legal) e pelo pesquisador, rubricada em todas as páginas por ambos.

---

Assinatura do Paciente/ Representante legal

Data: / /

---

Assinatura da Testemunha

Data: //

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

---

Rubrica do Participante da Pesquisa /  
Representante legalmente autorizado  
(se aplicável)

---

Rubrica do Investigador

---

Rubrica da Testemunha (se aplicável)

6 de 6

**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: / /

### DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .....  
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO :  M  F   
 DATA NASCIMENTO: ...../...../.....  
 ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....  
 BAIRRO: ..... CIDADE: .....  
 CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....

### 2. RESPONSÁVEL LEGAL.....

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

---

 Rubrica do Participante da Pesquisa /  
 Representante legalmente autorizado  
 (se aplicável)

---

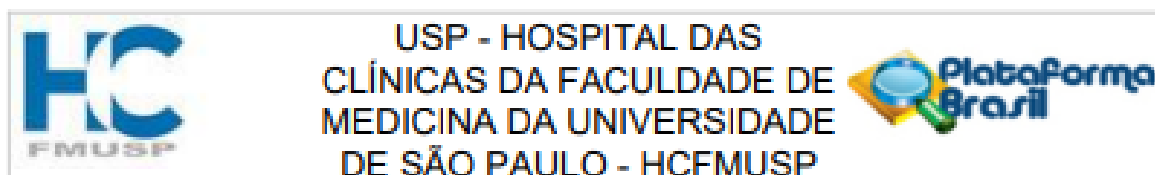
 Rubrica do Investigador

---

 Rubrica da Testemunha (se aplicável)



## 8.4 Anexo 4 – Protocolo de aprovação da Comissão Ético-Científica do Departamento



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação da Interação entre a Influência do Polimorfismo no Gene da Patatin-Like Phospholipase Domain Containing 3 (PNPLA3) e a Dieta em Pacientes com Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA)

**Pesquisador:** CLAUDIA PINTO MARQUES SOUZA DE OLIVEIRA

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 24106119.0.0000.0068

**Instituição Proponente:** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.691.104

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma avaliação observacional entre a Influência do Polimorfismo no Gene da Patatin-Like Phospholipase Domain Containing 3 (PNPLA3) e a Dieta em Pacientes com Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA).

#### Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a associação do consumo de macronutrientes da dieta com DHGNA e RI, incluindo consumo de carne e método de cozimento da mesma, com a presença do polimorfismo do PNPLA3 entre pacientes da população brasileira com DHGNA.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

**Riscos:** Bioimpedância: o exame de Bioimpedância não ocasiona dor nem mal-estar. Não há desconforto esperado na realização deste exame.

**Benefícios:** Você será avaliado e iremos desenvolver condutas dietéticas adequadas à sua condição clínica e física. Se você participar deste estudo poderá melhorar a sua alimentação, reduzir o seu peso corporal e conseqüentemente o depósito de gordura no seu fígado, o que trará benefícios para sua saúde e proporcionará maior qualidade de vida.

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

**Bairro:** Cerqueira César

**CEP:** 05.403-010

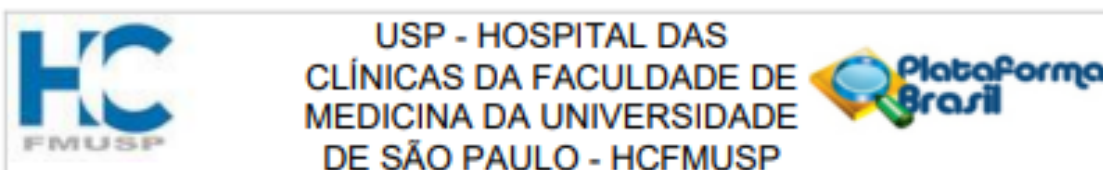
**UF:** SP

**Município:** SÃO PAULO

**Telefone:** (11)2661-7585

**Fax:** (11)2661-7585

**E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 3.691.104

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O pesquisador declara que o projeto será realizado com recursos próprios.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Adequadas.

**Recomendações:**

Não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Aprovado.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

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

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1443807.pdf	23/10/2019 18:47:05		Aceito
Folha de Rosto	FRCLAUDIADOLIVEIRA11269.pdf	23/10/2019 18:46:44	CLAUDIA PINTO MARQUES SOUZA DE OLIVEIRA	Aceito
Outros	Termo_de_compromisso.pdf	10/10/2019 15:14:19	CLAUDIA PINTO MARQUES SOUZA DE OLIVEIRA	Aceito
Outros	Questionarios.docx	10/10/2019 15:12:59	CLAUDIA PINTO MARQUES SOUZA DE OLIVEIRA	Aceito
Outros	Lista_documentos.pdf	10/10/2019 15:11:58	CLAUDIA PINTO MARQUES SOUZA DE OLIVEIRA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_anuencia.pdf	10/10/2019 15:11:24	CLAUDIA PINTO MARQUES SOUZA DE OLIVEIRA	Aceito

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

**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010

**UF:** SP **Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)2661-7585

**Fax:** (11)2661-7585

**E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



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



Continuação do Parecer: 3.691.104

Orçamento	Declaracao_custo.pdf	10/10/2019 15:10:59	CLAUDIA PINTO MARQUES SOUZA DE OLIVEIRA	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	10/10/2019 15:10:44	CLAUDIA PINTO MARQUES SOUZA DE OLIVEIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_atualizado.doc	10/10/2019 15:10:35	CLAUDIA PINTO MARQUES SOUZA DE OLIVEIRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	10/10/2019 15:10:10	CLAUDIA PINTO MARQUES SOUZA DE OLIVEIRA	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 07 de Novembro de 2019

---

**Assinado por:**  
**ALFREDO JOSE MANSUR**  
(Coordenador(a))

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

## 8.5 Anexo 5 – Carta de anuência



São Paulo, 08 de outubro de 2019.

Ilma. Sra.  
Profª. Dra. Cláudia Pinto Marques de Souza Oliveira  
DD. Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em  
Ciências em Gastroenterologia da FMUSP

Ref.: Carta de anuência

Prezados,

Declaro que a aluna Sílvia Massami Yoshimura, aluna executante do projeto de pesquisa intitulado: "Avaliação da Interação entre a Influência do Polimorfismo no Gene da Patatin-Like Phospholipase Domain Containing 3 (PNPLA3) e a Dieta em Pacientes com Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA)".

O projeto não trará custos para esta Instituição.

O vínculo da aluna justifica-se pelo desenvolvimento de sua pesquisa no Programa de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia do Departamento de Gastroenterologia da FMUSP que, após aprovação deste projeto, a mesma será aluna regularmente matriculada.

Atenciosamente,

  
Profª. Dra. Cláudia Pinto Marques Souza de Oliveira

Pesquisadora Responsável

## 9. REFERÊNCIAS:

- 1 SUMIDA, Y. et al. **Involvement of free radicals and oxidative stress in NAFLD/NASH: Free Radical Research.** 47: 869-880 p. 2013.
- 2 MENDEZ-SANCHEZ, N. et al. The Latin American Association for the Study of the Liver (ALEH) position statement on the redefinition of fatty liver disease. **Lancet Gastroenterol Hepatol**, v. 6, n. 1, p. 65-72, 01 2021. ISSN 2468-1253. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33181118> >.
- 3 SAMJI, N. S.; VERMA, R.; SATAPATHY, S. K. Magnitude of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Western Perspective. **J Clin Exp Hepatol**, v. 9, n. 4, p. 497-505, 2019 Jul-Aug 2019. ISSN 0973-6883. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31516266> >.
- 4 BUZZETTI, E.; PINZANI, M.; TSOCHATZIS, E. A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Metabolism**, v. 65, n. 8, p. 1038-48, Aug 2016. ISSN 1532-8600. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26823198> >.
- 5 FRIEDMAN, S. L. et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. **Nature Medicine**, v. 24, n. 7, p. 908-922, 2018-07-01 2018. ISSN 1078-8956. Acesso em: 2021-09-24T00:28:23.
- 6 CHALASANI, N. et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. **Hepatology**, v. 67, n. 1, p. 328-357, 01 2018. ISSN 1527-3350. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28714183> >.
- 7 BIANCO, C. et al. MAFLD vs NAFLD: Let the contest begin! **Liver International**, v. 40, n. 9, p. 2079-2081, 2020-09-01 2020. ISSN 1478-3223. Acesso em: 2022-04-16T14:59:14.
- 8 MANNE, V.; HANDA, P.; KOWDLEY, K. V. Pathophysiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease/Nonalcoholic Steatohepatitis. **Clin Liver Dis**, v. 22, n. 1, p. 23-37, Feb 2018. ISSN 1089-3261.
- 9 MASARONE, M. et al. Role of Oxidative Stress in Pathophysiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2018, p. 9547613, 2018. ISSN 1942-0994. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29991976> >.
- 10 DUWAERTS, C. C.; MAHER, J. J. Mechanisms of Liver Injury in Non-Alcoholic Steatohepatitis. **Current Hepatology Reports**, v. 13, n. 2, p. 119-129, 2014-06-01 2014. ISSN 2195-9595. Acesso em: 2021-10-03T15:48:23.
- 11 Y, F. et al. **Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease:** *Metabolism* 65: 1017-25 p. 2016.

- 12 ARRESE, M. et al. Innate Immunity and Inflammation in NAFLD/NASH. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 61, n. 5, p. 1294-1303, 2016-05-01 2016. ISSN 0163-2116. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4948286> >. Acesso em: 2021-09-24T00:27:31.
- 13 ZHOU, J.-H. et al. Noninvasive evaluation of nonalcoholic fatty liver disease: Current evidence and practice. **World Journal of Gastroenterology**, v. 25, n. 11, p. 1307-1326, 2019-03-21 2019. ISSN 1007-9327. Disponível em: < <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i11.1307> >. Acesso em: 2021-09-21T21:18:52.
- 14 DIEHL, A. M.; DAY, C. Cause, Pathogenesis, and Treatment of Nonalcoholic Steatohepatitis. **N Engl J Med**, v. 377, n. 21, p. 2063-2072, 11 23 2017. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29166236> >.
- 15 ARAÚJO, A. R. et al. Global epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: What we need in the future. **Liver International**, v. 38, p. 47-51, 2018-02-01 2018. ISSN 1478-3223. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/liv.13643> >. Acesso em: 2021-09-08T13:02:15.
- 16 RIAZI, K. et al. Dietary Patterns and Components in Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD): What Key Messages Can Health Care Providers Offer? **Nutrients**, v. 11, n. 12, Nov 26 2019. ISSN 2072-6643. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31779112> >.
- 17 EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the Management of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Obesity Facts**, v. 9, n. 2, p. 65-90, 2016-01-01 2016. ISSN 1662-4025. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/journal/01688278> >. Acesso em: 2022-04-16T15:46:48.
- 18 GODOS, J. et al. Mediterranean diet and nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms of protection. **Int J Food Sci Nutr**, v. 68, n. 1, p. 18-27, Feb 2017. ISSN 1465-3478. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27484357> >.
- 19 ZELBER-SAGI, S.; SALOMONE, F.; MLYNARSKY, L. The Mediterranean dietary pattern as the diet of choice for non-alcoholic fatty liver disease: Evidence and plausible mechanisms. **Liver Int**, v. 37, n. 7, p. 936-949, Jul 2017. ISSN 1478-3223.
- 20 RYAN, M. C. et al. The Mediterranean diet improves hepatic steatosis and insulin sensitivity in individuals with non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of Hepatology**, v. 59, n. 1, p. 138-143, 2013-07-01 2013. ISSN 0168-8278. Disponível em: < [http://minerva-access.unimelb.edu.au/bitstream/11343/44003/1/Mediterranean%20Diet\\_Journal%20of%20Hepatology.pdf](http://minerva-access.unimelb.edu.au/bitstream/11343/44003/1/Mediterranean%20Diet_Journal%20of%20Hepatology.pdf) >. Acesso em: 2022-09-12T12:17:49.
- 21 AKHLAGHI, M.; GHASEMI-NASAB, M.; RIASATIAN, M. Mediterranean diet for patients with non-alcoholic fatty liver disease, a systematic review and meta-analysis of observational and

- clinical investigations. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, v. 19, n. 1, p. 575-584, 2020-06-01 2020. ISSN 2251-6581. Acesso em: 2021-10-16T16:50:18.
- 22 MARCHESINI, G.; PETTA, S.; DALLE GRAVE, R. Diet, weight loss, and liver health in nonalcoholic fatty liver disease: Pathophysiology, evidence, and practice. **Hepatology**, v. 63, n. 6, p. 2032-43, Jun 2016. ISSN 0270-9139.
- 23 PERDOMO, C. M.; FRÜHBECK, G.; ESCALADA, J. Impact of Nutritional Changes on Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Nutrients**, v. 11, n. 3, Mar 21 2019. ISSN 2072-6643.
- 24 HENKEL, J. et al. Induction of steatohepatitis (NASH) with insulin resistance in wildtype B6 mice by a western-type diet containing soybean oil and cholesterol. **Mol Med**, v. 23, p. 70-82, May 2017. ISSN 1076-1551 (Print) 1076-1551.
- 25 HYDES, T. J. et al. Evidence-based clinical advice for nutrition and dietary weight loss strategies for the management of NAFLD and NASH. **Clin Mol Hepatol**, v. 26, n. 4, p. 383-400, 10 2020. ISSN 2287-285X. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32674529> >.
- 26 BOADA, L. D.; HENRÍQUEZ-HERNÁNDEZ, L. A.; LUZARDO, O. P. The impact of red and processed meat consumption on cancer and other health outcomes: Epidemiological evidences. **Food Chem Toxicol**, v. 92, p. 236-44, Jun 2016. ISSN 0278-6915.
- 27 TURESKY, R. J. Mechanistic Evidence for Red Meat and Processed Meat Intake and Cancer Risk: A Follow-up on the International Agency for Research on Cancer Evaluation of 2015. **CHIMIA**, v. 72, n. 10, p. 718, 2018-10-31 2018. ISSN 2673-2424. Acesso em: 2022-10-01T15:19:46.
- 28 ZELBER-SAGI, S. et al. High red and processed meat consumption is associated with non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance. **J Hepatol**, v. 68, n. 6, p. 1239-1246, Jun 2018. ISSN 0168-8278.
- 29 MANA, M. F. et al. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Long-Term Type 2 Diabetes: Role of rs738409 PNPLA3 and rs499765 FGF21 Polymorphisms and Serum Biomarkers. **Molecules**, v. 27, n. 10, p. 3193, 2022-05-17 2022. ISSN 1420-3049. Acesso em: 2022-10-01T22:05:33.
- 30 NISHIOJI, K. et al. The Impact of PNPLA3 rs738409 Genetic Polymorphism and Weight Gain  $\geq 10$  kg after Age 20 on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Non-Obese Japanese Individuals. **PLoS One**, v. 10, n. 10, p. e0140427, 2015. ISSN 1932-6203.
- 31 KUMARI, M. et al. Adiponutrin functions as a nutritionally regulated lysophosphatidic acid acyltransferase. **Cell Metab**, v. 15, n. 5, p. 691-702, May 2 2012. ISSN 1550-4131 (Print) 1550-4131.

- 32 WINBERG, M. E. et al. Adiponutrin: a multimeric plasma protein. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 446, n. 4, p. 1114-9, Apr 18 2014. ISSN 0006-291x.
- 33 ASTARINI, F. D.; RATNASARI, N.; WASITYASTUTI, W. Update on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease-Associated Single Nucleotide Polymorphisms and Their Involvement in Liver Steatosis, Inflammation, and Fibrosis: A Narrative Review. **Iranian Biomedical Journal**, v. 26, n. 4, p. 252-268, 2022-07-01 2022. ISSN 1028-852X. Acesso em: 2022-09-25T11:54:42.
- 34 BRUSCHI, F. V. et al. PNPLA3 expression and its impact on the liver: current perspectives. **Hepat Med**, v. 9, p. 55-66, 2017. ISSN 1179-1535 (Print) 1179-1535.
- 35 MAZO, D. F. et al. Validation of PNPLA3 polymorphisms as risk factor for NAFLD and liver fibrosis in an admixed population. **Ann Hepatol**, v. 18, n. 3, p. 466-471, May-Jun 2019. ISSN 1665-2681 (Print) 1665-2681.
- 36 O, A. B. P.; DA, E. D. O. E.; METABÓLICA, S. **Diretrizes Brasileiras de Obesidade**. São Paulo: 188 p. 2016.
- 37 TAVARES, E. L. et al. Avaliação nutricional de idosos: desafios da atualidade. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 18, n. 3, p. 643-650, 2015-09-01 2015. ISSN 1809-9823. Disponível em: < [http://www.scielo.br/pdf/rbgg/v18n3/en\\_1809-9823-rbgg-18-03-00643.pdf](http://www.scielo.br/pdf/rbgg/v18n3/en_1809-9823-rbgg-18-03-00643.pdf) >. Acesso em: 2022-09-24T12:49:00.
- 38 I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 84, p. 3-28, 2005-04-01 2005. ISSN 0066-782X. Acesso em: 2023-03-09T18:41:27.
- 39 GIRALDI, L. et al. Mediterranean diet and the prevention of non-alcoholic fatty liver disease: results from a case-control study. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 24, n. 13, p. 7391-7398, 07 2020. ISSN 2284-0729. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32706078> >.
- 40 CARIU, B. et al. Nonalcoholic fatty liver disease as a metabolic disease in humans: A literature review. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 23, n. 5, p. 1069-1083, 2021-05-01 2021. ISSN 1462-8902. Acesso em: 2022-02-05T15:17:13.
- 41 NAIK, A.; KOŠIR, R.; ROZMAN, D. Genomic aspects of NAFLD pathogenesis. **Genomics**, v. 102, n. 2, p. 84-95, 2013-08-01 2013. ISSN 0888-7543. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2013.03.007> >. Acesso em: 2022-02-05T17:47:27.
- 42 WEHMEYER, M. H. et al. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with excessive calorie intake rather than a distinctive dietary pattern. **Medicine (Baltimore)**, v. 95, n. 23, p. e3887, Jun 2016. ISSN 1536-5964. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27281105> >.



- 43 G, R. et al. **Nutrient intake in Italian obese patients: relationships with insulin resistance and markers of non-alcoholic fatty liver disease.**: Nutrition. 27: 672-676 p. 2011.
- 44 ABENAVOLI, L. et al. Effect of Mediterranean Diet and Antioxidant Formulation in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Randomized Study. **Nutrients**, v. 9, n. 8, Aug 12 2017. ISSN 2072-6643.
- 45 ZELBER-SAGI, S. Dietary Treatment for NAFLD: New Clinical and Epidemiological Evidence and Updated Recommendations. **Semin Liver Dis**, v. 41, n. 3, p. 248-262, Aug 2021. ISSN 1098-8971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34139786> >.
- 46 PENG, H. et al. Association of meat consumption with NAFLD risk and liver-related biochemical indexes in older Chinese: a cross-sectional study. **BMC Gastroenterology**, v. 21, n. 1, 2021-12-01 2021. ISSN 1471-230X. Acesso em: 2021-09-28T13:06:18.
- 47 IVANCOVSKY-WAJCMAN, D. et al. High Meat Consumption Is Prospectively Associated with the Risk of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Presumed Significant Fibrosis. **Nutrients**, v. 14, n. 17, p. 3533, 2022-08-27 2022. ISSN 2072-6643. Acesso em: 2022-09-25T11:42:55.
- 48 NOUREDDIN, M. et al. Diet Associations With Nonalcoholic Fatty Liver Disease in an Ethnically Diverse Population: The Multiethnic Cohort. **Hepatology**, v. 71, n. 6, p. 1940-1952, 06 2020. ISSN 1527-3350. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31553803> >.
- 49 SOLEIMANI, D. et al. Dietary patterns in relation to hepatic fibrosis among patients with nonalcoholic fatty liver disease. **Diabetes Metab Syndr Obes**, v. 12, p. 315-324, 2019. ISSN 1178-7007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30881075> >.
- 50 KARAMFILOVA, V. et al. PNPLA3 I148M Polymorphism in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease, Obesity and Prediabetes. **J Gastrointestin Liver Dis**, v. 28, n. 4, p. 433-438, Dec 9 2019. ISSN 1841-8724.
- 51 DAI, G. et al. Association between PNPLA3 rs738409 polymorphism and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) susceptibility and severity: A meta-analysis. **Medicine (Baltimore)**, v. 98, n. 7, p. e14324, Feb 2019. ISSN 1536-5964. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30762732> >.
- 52 SEKO, Y. et al. The Effect of Genetic Polymorphism in Response to Body Weight Reduction in Japanese Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Genes (Basel)**, v. 12, n. 5, 04 22 2021. ISSN 2073-4425. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33922278> >.
- 53 WANG, J.-Z. et al. PNPLA3 rs738409 underlies treatment response in nonalcoholic fatty liver disease. **World Journal of Clinical Cases**, v. 6, n. 8, p. 167-175, 2018-08-16 2018. ISSN 2307-8960. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6107533> >. Acesso em: 2022-04-16T15:40:15.

- 54 SLIZ, E. et al. NAFLD risk alleles in PNPLA3, TM6SF2, GCKR and LYPLAL1 show divergent metabolic effects. **Hum Mol Genet**, v. 27, n. 12, p. 2214-2223, 06 15 2018. ISSN 1460-2083. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29648650> >.