

AMANDA MEDEIROS RECUERO

Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e síndrome dos ovários policísticos (SOP): associação do polimorfismo no gene da *patatin-like phospholipase domain containing 3* (PNPLA3) e alterações endócrinas e metabólicas

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

Programa de Ciências em
Gastroenterologia

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

**São Paulo
2022**

AMANDA MEDEIROS RECUERO

Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e síndrome dos ovários policísticos (SOP): associação do polimorfismo no gene da *patatin-like phospholipase domain containing 3* (PNPLA3) e alterações endócrinas e metabólicas

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

Programa de Ciências em
Gastroenterologia

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

**São Paulo
2022**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Recuero, Amanda Medeiros

Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e
síndrome dos ovários policísticos (SOP) : associação
do polimorfismo no gene da patatin-like
phospholipase domain containing 3 (PNPLA3) e
alterações endócrinas e metabólicas / Amanda Medeiros
Recuero. -- São Paulo, 2022.

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia.

Orientadora: Claudia Pinto Marques Souza de
Oliveira.

Descritores: 1.Doença hepática gordurosa não-
alcoólica 2.Síndrome dos ovários policísticos
3.Fibrose 4.Resistência insulínica 5.Síndrome
metabólica

USP/FM/DBD-093/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico esta tese:

Aos meus pais, **Aparecida e Edilmar**, meu exemplo na vida e que sempre valorizaram a busca pelo conhecimento.

Ao meu marido, **Saulo**, meu melhor amigo e maior incentivador nesta jornada.

À minha filha **Yasmin**, que ainda em meu ventre me ensina as maiores lições da minha vida.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por ser minha fonte inesgotável de força nos momentos mais difíceis desta jornada.

À Prof^a. Dra^a. Claudia Oliveira, que mais que orientadora, representa para mim inspiração na medicina, na ciência e na vida. Obrigada por todo o carinho, apoio e incentivo fundamentais em todos os momentos. Certamente sou uma médica e uma pessoa melhor graças a você.

Ao Dr. José Tadeu Stefano, pela dedicação e disponibilidade desde o início deste estudo. Seu olhar crítico e meticoloso acrescentou enormemente à qualidade desta tese.

À equipe do Ambulatório de Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica da Disciplina de Gastroenterologia do HCFMUSP por me apoiar durante toda a pesquisa e pela amizade que construímos.

À Dra. Fernanda Malta e toda equipe do LIM-07, em especial Ana Paula Salles, por todo o esforço e apoio técnico na etapa de processamento do polimorfismo.

À Dra. Denise Vezozzo e Dra. Karla Toda pelos ensinamentos em elastografia hepática e por me auxiliar durante todo o estudo nas mais diversas etapas. Sua amizade e seu auxílio fizeram muita diferença.

À Dra. Larissa Gomes, toda a equipe do Ambulatório de Endocrinologia e do Laboratório de Hormônios e Biologia Molecular (LIM-42) por me auxiliar não só no recrutamento, mas também na recuperação de dados para esta tese, além dos excelentes apontamentos na qualificação.

Ao Dr. Gustavo Maciel e toda a equipe do ambulatório de Ginecologia Endócrina e Climatério pelo apoio no recrutamento das pacientes e pela amizade construída com todos nesta jornada. Agradeço ainda todas as considerações feitas na qualificação, fundamentais para a finalização desta tese.

Ao Dr. Daniel Mazo, a quem muito admiro e cuja presença em minha banca de qualificação foi uma grande honra. Cada uma de suas palavras foi ouvida atentamente e considerada na elaboração desta tese.

À equipe da enfermagem de Gastroenterologia do HCFMUSP, pela qual nutro muito carinho, por não medir esforços em me auxiliar na recepção e coleta de amostras das pacientes.

Ao grupo de estatísticos com a coordenação do senhor Alex Jones Cassenote pela grande ajuda na elaboração dos dados.

Ao meu querido esposo, Saulo Recuero, pelo apoio incansável e pelo cuidado dedicado a mim e nossa filha. Temos muita sorte de te ter em nossas vidas. Teu amor foi e sempre será fundamental para mim.

Aos meus pais pelas palavras de apoio e conforto dadas. Vocês foram os primeiros a acreditar em meu potencial e esta tese é dedicada a tudo que já sacrificaram em favor do meu crescimento pessoal e profissional, assim como dos meus irmãos. Tudo que sou devo a vocês.

Por fim, agradeço a todas as pacientes que disponibilizaram seu tempo para participar desta pesquisa e tornaram esse estudo possível.

Normalização adotada

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

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

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

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

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1. Introdução	1
1.1. Doença hepática gordurosa não alcoólica	2
1.1.1. Fisiopatologia da DHGNA.....	4
1.1.2. História natural e fatores determinantes da progressão da DHGNA.....	7
1.1.3. Influência dos fatores genéticos na DHGNA	8
1.1.4. Polimorfismo no gene da PNPLA3 e DHGNA	10
1.1.5. Polimorfismo no gene PNPLA3 na DHGNA e associação com obesidade e SM	15
1.2. SOP e DHGNA.....	17
1.3. Justificativa.....	22
2. Objetivos	23
2.1. Objetivo Primário	24
2.2. Objetivos Secundários.....	24
3. Materiais e métodos	25
3.1. Aspectos éticos.....	26
3.2. Desenho do estudo	26
3.2.1. Critérios de Inclusão	26
3.2.2. Critérios de Exclusão.....	26
3.3. Variáveis e definições utilizadas no estudo.....	27
3.3.1. Variáveis demográficas e antropométricas	27
3.3.2. Hábitos de vida.....	Erro! Indicador não definido.
3.3.3. Definição da DHGNA.....	28
3.3.4. Avaliação não invasiva do grau de fibrose hepática e esteatose.....	28
3.3.5. Definição da SOP	30
3.3.6. Comorbidades associadas avaliadas	32
3.3.7. Definição de resistência insulínica	33
3.3.8. Definição de SM e seus componentes	33
3.3.9. Dados laboratoriais.....	33
3.3.10. Avaliação do polimorfismo do gene da PNPLA3.....	33
3.3.10.1. Extração do DNA genômico	34
3.3.10.2. Genotipagem do polimorfismo da PNPLA3 (rs738409 c.444 C>G, p. I148M)	34
3.4. Análise estatística	35
4. Resultados	37

4.1.	Características da população estudada.....	37
4.2.	Características da população estudada conforme a presença do polimorfismo no gene da PNPLA3	42
4.3.	Características da população estudada conforme a presença de esteatose hepática	45
4.4.	Modelo para predição de esteatose hepática na população estudada....	48
4.5.	Características da população estudada conforme a presença de fibrose clinicamente significativa.....	50
4.6.	Modelo para predição de fibrose clinicamente significativa nas mulheres com DHGNA.....	53
4.7.	Características da população estudada conforme a presença de fibrose avançada.....	54
4.8.	Modelo para predição de fibrose avançada nas mulheres com DHGNA.....	57
5.	Discussão	60
6.	Conclusões	80
7.	Anexos	82
8.	Bibliografia.....	93

Lista de abreviaturas

17-OHP	17-hidroxiprogesterona
ABCA1	<i>ATP Binding Cassette Subfamily A Member 1</i>
ABHD5	α/β hydrolase domain-containing 5
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ADPN	Adiponutrina
AGL	Ácidos graxos livres
ALT	Alanino aminotransferase
APRI	<i>AST to Platelet ratio index</i>
AST	Aspartato aminotransferase
AUC	Área sob a curva
AUROC	Área abaixo da curva ROC
CAP	Parâmetro do coeficiente de atenuação
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CC	Circunferência da cintura
CHC	Carcinoma hepatocelular
CK-18	Citoqueratina 18 clivada
DAMPs	Padrões moleculares associados ao dano
dB/m	Decibéis/metro
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DM2	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
DP	Desvio padrão
EASD	Associação Europeia para o Estudo da Diabetes
EASL	Associação Europeia para o Estudo do Fígado
EASO	Associação Europeia para o Estudo da Obesidade
EHNA	Esteatohepatite não alcoólica

EHT	Elastografia hepática transitória
EWAS	Estudos de associação ampla do exoma
FA	Fosfatase alcalina
FIB-4	<i>Fibrosis-4 score</i>
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GGT	Gama glutamil transferase
GCKR	Proteína reguladora da glicoquinase
GWAS	Estudos de associação genética de escala genômica
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HOMA-IR	<i>Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance</i>
HSD17B13	17-beta desidrogenase 13
IC95%	Intervalo de confiança de 95%
IKK β	Quinase inibidora do fator nuclear kappa-B subunidade beta
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL28B	Interleucina 28B
IMC	Índice de massa corpórea
INR	Razão normalizada internacional
JNK	Quinase c-Jun N-terminal
kPa	KiloPascal
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LH	Hormônio luteinizante
Lys	Lisina
LSM	Medida de rigidez hepática
LTGA	Lipase de triglicerídeos de tecido adiposo

MAFLD	<i>Metabolic associated fatty liver disease</i>
MBOAT7	<i>Membrane-bound O-acyltransferase domain-containing 7</i>
Met	Metionina
MERTK	Quinase Mer T
mRNA	Micro-RNA
NAFLD-FS	<i>NAFLD fibrosis score</i>
OP	Ovários policísticos
OR	<i>Odds ratio</i>
P25	Percentil 25
P75	Percentil 75
PIC	Conteúdo de informação de polimorfismo
PNPLA2	<i>Patatin-Like Phospholipase Domain Containing 2</i>
PNPLA3	<i>Patatin-Like Phospholipase Domain Containing 3</i>
PPAR δ	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma tipo gama
PRL	Prolactina
RCQ	Razão cintura-quadril
RCV	Risco cardiovascular
RI	Resistência insulínica
RR	Risco relativo
RT-PCR	Reações em cadeia da polimerase em tempo real
SDHEA	Sulfato de dehidroepiandrosterona
sdLDL	LDL do subtipo pequena e densa
SHBG	Globulina ligadora de hormônios sexuais
SM	Síndrome metabólica
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SOP	Síndrome dos ovários policísticos
SREBP-1c	Proteína de ligação ao elemento regulador de esterol 1c
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido

TG	Triglicerídeos
TM6SF2	<i>Transmembrane 6 superfamily member 2</i>
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
TSH	Hormônio estimulante da tireoide
US	Ultrassom
Ub	Moléculas de ubiquitina
VLDL	Lipoproteínas de densidade muito baixa

Lista de figuras

Figura 1 -	Representação hipotética do mecanismo pelo qual a variante I148M da PNPLA3 influencia o desenvolvimento de DHGNA por evasão da ubiquitinação	13
Figura 2 -	Representação da retenção de retinol intracelular nas células estreladas hepáticas.....	15
Figura 3 -	Representação da realização da elastografia hepática por Fibroscan®	29
Figura 4 -	Fluxograma de seleção da população estudada e sua categorização conforme presença de esteatose hepática.....	37
Figura 5 -	Curva ROC do modelo para predição de esteatose hepática incluindo área sob a curva (AUC), intervalo de confiança de 95% (IC95%) e nível descritivo (p-valor).....	49
Figura 6 -	Curva ROC do modelo proposto para predição de fibrose clinicamente significativa incluindo área sob a curva (AUC), intervalo de confiança de 95% (IC95%) e nível descritivo (p-valor)	54
Figura 7 -	Curva ROC do modelo proposto para predição de fibrose avançada incluindo área sob a curva (AUC), intervalo de confiança de 95% (IC95%) e nível descritivo (p-valor)	58

Lista de tabelas

Tabela 1 -	Estimativa do grau de fibrose hepática conforme valores de elastografia hepática transitória	30
Tabela 2 -	Estimativa do grau de esteatose hepática conforme valores do parâmetro do coeficiente de atenuação (CAP).....	30
Tabela 3 -	Classificação da SOP em fenótipos de acordo com as características apresentadas	32
Tabela 4 -	Características relacionadas à idade, presença de esteatose hepática, presença do polimorfismo da PNPLA3 e EHT observadas entre as mulheres investigadas incluindo frequência absoluta (n), relativa (%) e intervalo de confiança de 95% (IC95%)	38
Tabela 5 -	Características relacionadas à SOP observadas entre as mulheres investigadas incluindo frequência absoluta (n), relativa (%) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%)	40
Tabela 6 -	Características clínicas e metabólicas observadas entre as mulheres investigadas incluindo frequência absoluta (n), relativa (%) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%).....	41
Tabela 7 -	Estatísticas descritivas das variáveis quantitativas ligadas ao perfil hepático incluindo média, desvio padrão (DP), mediana, mínimo (Mín.) e máximo (Máx.)	41
Tabela 8 -	Estatísticas descritivas das variáveis quantitativas ligadas ao perfil etário, metabólico e hormonal incluindo média, desvio padrão (DP), mediana, mínimo (Mín.) e máximo (Máx.).....	42
Tabela 9 -	Fatores qualitativos ligados ao perfil hepático estratificados de acordo com o polimorfismo da PNPLA3 incluindo frequência absoluta (n), relativa (%) intervalo de confiança de 95% (IC95%) e nível descritivo (p-valor).....	43
Tabela 10 -	Fatores quantitativos ligados ao perfil hepático estratificados de acordo com o polimorfismo de PNPLA3 incluindo média, desvio padrão (\pm DP), mediana, intervalo interquartil (IQR) e nível descritivo (p-valor)	44

Tabela 11 - Fatores quantitativos etário, metabólicos e hormonais estratificados de acordo com o polimorfismo de PNPLA3 incluindo média, desvio padrão (\pm DP), mediana, intervalo interquartil (IQR) e nível descritivo (p-valor)	45
Tabela 12 - Fatores qualitativos estratificados segundo presença e ausência de esteatose hepática incluindo frequência absoluta (n), relativa (%), intervalo de confiança de 95% (IC95%) e nível descritivo	46
Tabela 13 - Fatores quantitativos ligados ao perfil hepático estratificados segundo presença e ausência de esteatose hepática incluindo média, desvio padrão (\pm DP), mediana, intervalo interquartil (IQR) e nível descritivo (p-valor)	47
Tabela 14 - Fatores quantitativos etário, metabólicos e hormonais estratificados segundo presença e ausência de esteatose hepática incluindo média, desvio padrão (\pm DP), mediana, intervalo interquartil (IQR) e nível descritivo (p-valor)	48
Tabela 15 - Estimativas de odds ratio incluindo beta, erro padrão, nível descritivo (p-valor) e intervalo de confiança (IC95%) para predição de esteatose hepática	49
Tabela 16 - Fatores qualitativos estratificados de acordo com a presença de fibrose clinicamente significativa incluindo frequência absoluta (n), relativa (%) intervalo de confiança de 95% (IC95%) e nível descritivo (p-valor).....	51
Tabela 17 - Fatores quantitativos ligados ao perfil hepático estratificados de acordo com a presença de fibrose clinicamente significativa incluindo média, desvio padrão (\pm DP), mediana, intervalo interquartil (IQR) e nível descritivo (p-valor)	52
Tabela 18 - Fatores quantitativos metabólicos e hormonais estratificados de acordo com a presença de fibrose clinicamente significativa incluindo média, desvio padrão (\pm DP), mediana, intervalo interquartil (IQR) e nível descritivo (p-valor)	53
Tabela 19 - Estimativas de odds ratio ajustadas para idade e ALT incluindo beta, erro padrão, nível descritivo e IC95% para predição de fibrose clinicamente significativa	54
Tabela 20 - Fatores qualitativos estratificados conforme a presença de fibrose avançada incluindo frequência absoluta (n), relativa (%) intervalo de confiança de 95% (IC95%) e nível descritivo (p-valor)	55

Tabela 21 - Fatores quantitativos ligados ao perfil hepático estratificados de acordo com a presença de fibrose avançada incluindo média, desvio padrão (\pm DP), mediana, intervalo interquartil (IQR) e nível descritivo (p-valor)	56
Tabela 22 - Fatores quantitativos metabólicos e hormonais estratificados de acordo com a presença de fibrose avançada incluindo média, desvio padrão (\pm DP), mediana, intervalo interquartil (IQR) e nível descritivo (p-valor)	57
Tabela 23 - Estimativas de odds ratio ajustadas para idade incluindo beta, erro padrão, nível descritivo e IC95% para predição de fibrose avançada	58

RESUMO

Recuero AM. Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e síndrome dos ovários policísticos (SOP): associação do polimorfismo no gene da *patatin-like phospholipase domain containing 3* (PNPLA3) e alterações endócrinas e metabólicas [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

Introdução: A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) apresenta alta prevalência em mulheres portadoras de síndrome dos ovários policísticos (SOP), variando de 35 a 70%, comparado a cerca de 30% na ausência de SOP. A avaliação da DHGNA e seus fatores de risco nestas pacientes, adquire grande importância, uma vez que a doença se manifesta em idades mais precoces, além de haver maior prevalência de formas mais avançadas. Dentre os principais fatores de risco, o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) no gene da Patatin-like Phospholipase Domain Containing 3 (PNPLA3) rs738409 c.444 C>G, p. I148M, foi identificado como o principal fator de risco genético para o desenvolvimento e progressão da DHGNA. **Objetivos:** Determinar a frequência deste polimorfismo em pacientes com SOP e seu impacto na susceptibilidade e gravidade da DHGNA, além de avaliar a relação do mesmo com as alterações endócrinas e metabólicas. **Métodos:** Estudo transversal que avaliou pacientes com SOP atendidas em centro terciário. A presença de DHGNA foi determinada com base em ultrassom abdominal e exclusão de causas secundárias de hepatopatias. O grau de fibrose foi definido através da elastografia hepática transitória. Todas as pacientes foram avaliadas quanto à presença do polimorfismo rs738409 no gene da PNPLA3. **Resultados:** A amostra final foi de 163 pacientes, com evidência de DHGNA em 72,4% delas. O polimorfismo apresentou-se em heterozigose (CG) em 41,7% e em homozigose (GG) em 8% das pacientes. Mulheres com o polimorfismo apresentavam menores níveis de testosterona livre ($p=0,032$) e total ($p=0,021$). Alterações do índice de HOMA-IR ocorreram em 75% da amostra e, após regressão logística múltipla, foi o principal fator independente associado ao risco de desenvolvimento de DHGNA ($OR=4,313$, $p=0,022$), tendo seu efeito amplificado pela presença do polimorfismo (CG/GG) ($OR=12,198$, $p=0,017$). Valores de HDL ≥ 50 mg/dL apresentaram associação negativa com a DHGNA ($OR=0,237$, $p=0,003$). Idade superior a 32 anos também se associou a maior risco para DHGNA ($OR=3,833$,

p=0,007). Em relação a fibrose clinicamente significativa, somente síndrome metabólica (SM) manteve associação independente com o desfecho (OR=3,071, p=0,027) após regressão logística múltipla ajustada para idade e níveis de ALT. Por fim, SM (OR=13,030, p=0,020) e AST > 32 U/L (OR=9,039, p=0,009) foram fatores de risco independente para fibrose avançada. Conclusão: Em pacientes com SOP, o polimorfismo rs738409 do gene da PNPLA3 não apresenta associação independente com a DHGNA ou suas formas avançadas, tampouco com alterações metabólicas. A resistência insulínica é o principal fator de risco para DHGNA nestas mulheres e, quando em interação com o polimorfismo, atua de maneira sinérgica contribuindo para um risco ainda maior de desenvolvimento da doença. Idade superior a 32 anos associa-se a maior risco de DHGNA e maiores níveis de HDL conferem proteção ao desfecho. SM é o principal fator de risco associado a fibrose clinicamente significativa ou avançada nesta população.

Descritores: Doença hepática gordurosa não-alcoólica; Síndrome dos ovários policísticos; Fibrose; Resistência insulínica; Síndrome metabólica.

ABSTRACT

Recuero AM. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and polycystic ovary syndrome (PCOS): association with *patatin-like phospholipase domain-containing 3* gene (PNPLA3) polymorphism and endocrine and metabolic abnormalities [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

Introduction: Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) has a high prevalence in women with polycystic ovary syndrome (PCOS), ranging from 35 to 70%, compared to 30% in the absence of PCOS. Evaluation of NAFLD and its risk factors in PCOS patients is of great importance since the disease manifests at earlier ages and has a higher prevalence of more advanced forms in this group. Among the main risk factors, the single nucleotide polymorphism (SNP) in the Patatin-like Phospholipase Domain Containing 3 (PNPLA3) rs738409 c.444 C>G, p. I148M has been identified as the main genetic risk factor for the development and progression of NAFLD. **Methods:** This cross-sectional study evaluated patients with PCOS treated at a tertiary center. The diagnosis of NAFLD was determined based on abdominal ultrasound and exclusion of secondary causes of liver disease. The degree of fibrosis was defined based on transient hepatic elastography. All patients were evaluated for the presence of the rs738409 polymorphism in the PNPLA3 gene. **Results:** The final sample comprised 163 patients, with evidence of NAFLD in 72.4% of them. The polymorphism was heterozygous (GC) in 41.7% and homozygous (GG) in 8% of patients. Women with the polymorphism had lower free ($p=0.032$) and total ($p=0.021$) testosterone. Elevated HOMA-IR index occurred in 75% of the sample and, after multiple logistic regression, it was the main independent factor associated with NAFLD (OR=4.313, $p=0.022$), with its effect amplified by the presence of the polymorphism (CG/GG) (OR=12.198, $p=0.017$). HDL ≥ 50 mg/dL was negatively associated with NAFLD (OR=0.237, $p=0.003$). Age over 32 years was also associated with a higher risk for NAFLD (OR=3.833, $p=0.007$). Regarding clinically significant fibrosis, only metabolic syndrome (MS) maintained an independent association with the outcome (OR=3.071, $p=0.027$) after multiple logistic regression adjusted for age and ALT levels. Finally, MS (OR=13.030, $p=0.020$) and AST >32 U/L (OR=9.039, $p=0.009$) were independent risk factors for advanced fibrosis. **Conclusion:** In PCOS patients, the rs738409 polymorphism of the PNPLA3 gene is not independently associated with NAFLD or its

advanced forms, nor with metabolic alterations. Insulin resistance is the main risk factor for NAFLD in these women, and, when in interaction with the polymorphism, it acts synergistically, contributing to an even greater risk of developing the disease. Age over 32 years is associated with a higher risk of NAFLD, and higher HDL levels protect against this outcome. MS is the main risk factor associated with clinically significant or advanced fibrosis in this population.

Descriptors: Nonalcoholic fatty liver disease; Polycystic ovary syndrome; Fibrosis; Insulin resistance; Metabolic syndrome.

1. Introdução

1. Introdução

1.1. Doença hepática gordurosa não alcoólica

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é uma condição clínico patológica com amplo espectro de manifestações, podendo ser histologicamente classificada em esteatose simples e esteatohepatite não alcoólica (EHNA), cuja gravidade pode variar conforme o grau de fibrose, evolução para cirrose e suas complicações, como o carcinoma hepatocelular (CHC) (1). Histologicamente, o que difere as duas formas da doença é a presença de sinais de dano hepatocelular, ou seja, balonização hepatocitária, presente na EHNA (2). O diagnóstico requer a presença de esteatose em imagem ou análise histológica, além da exclusão de causas secundárias de hepatopatias e do consumo significativo de álcool (1). Atualmente, a DHGNA é a causa mais comum de hepatopatia na população ocidental, com uma prevalência estimada que varia de 6,3 a 33% na população em geral, de acordo com o grupo estudado e o método diagnóstico utilizado. Sua crescente prevalência acompanha os níveis crescentes de obesidade, *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), aumento do estilo de vida sedentário, associado ao excesso de ingestão calórica em relação ao gasto. Especialmente em países desenvolvidos, mesmo adultos não obesos possuem alterações metabólicas (3). Apesar da elevada prevalência da DHGNA, apenas 3 a 5% da população desenvolverá EHNA (2, 4, 5), e os fatores determinantes desta progressão são tema de extensa pesquisa. Sabe-se que existe uma forte associação da DHGNA com a síndrome metabólica (SM), bem como com seus componentes [obesidade, dislipidemia, hipertensão arterial sistêmica (HAS) e alterações glicêmicas e resistência insulínica (RI)], com prevalência de 70 a 90% da mesma neste grupo. Dados sugerem ainda que o hipotireoidismo,

hipopituitarismo, hipogonadismo, apnéia do sono e síndrome dos ovários policísticos (SOP) representam fatores de risco para o desenvolvimento da DHGNA, independente da presença de obesidade (2). A EHNA é também fator de risco para o desenvolvimento de patologias como DM2 e doença renal crônica, além de aumentar o risco cardiovascular (RCV) sendo, portanto, uma doença multissistêmica (6).

Recentemente, foi proposta uma nova nomenclatura para a DHGNA (7), passando a denominar-se *metabolic associated fatty liver disease* (MAFLD), após posicionamento de painel internacional de especialistas na área, em decorrência de sua forte correlação com alterações metabólicas nos indivíduos acometidos. Até o momento, os critérios diagnósticos para a DHGNA consistiam na presença de esteatose em exame de imagem ou histologia, como citado previamente, e na exclusão de causas secundárias de hepatopatias. De acordo com a nova nomenclatura proposta, o diagnóstico de MAFLD passa a ser baseado na presença de esteatose na histologia hepática, exame de imagem ou através de escores clínico-laboratoriais com biomarcadores, além de um dos três critérios a seguir: sobrepeso ou obesidade, DM2 ou evidência de distúrbio metabólico. A definição de distúrbio metabólico consiste na presença de pelo menos duas alterações metabólicas dentre as seguintes: circunferência da cintura (CC) ≥ 102 cm em homens e ≥ 88 cm em mulheres caucasianas (ou $\geq 90/80$ cm em homens e mulheres asiáticos, respectivamente), pressão arterial $\geq 130/85$ mmHg ou tratamento medicamentoso específico, triglicerídeos (TG) plasmáticos ≥ 150 mg/dL ou tratamento medicamentoso específico, HDL-colesterol < 40 mg/dL para homens e < 50 mg/dL para mulheres ou tratamento medicamentoso específico, pré-diabetes [(ou seja, níveis de glicose em jejum de 100 a 125 mg/dL ou níveis de glicose de 140 a 199 mg/dL 2 horas pós-sobrecarga de glicose ou hemoglobina glicada (HbA1c) de 5,7% a 6,4%)], valores do

Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance (HOMA-IR) $\geq 2,5$, proteína C reativa de alta sensibilidade plasmática > 2 mg/ L. A definição de MAFLD independe da presença de outras hepatopatias concomitantes ou da ingestão alcoólica.

1.1.1. Fisiopatologia da DHGNA

A DHGNA consiste em uma doença de causa multifatorial, resultante de uma complexa interação de fatores ambientais com um plano de fundo genético. Dentre os fatores ambientais, merecem destaque a dieta hipercalórica, rica em gordura saturada e em frutose (8), e o sedentarismo, ambos associados de maneira direta e indireta - via ganho ponderal - ao desenvolvimento da DHGNA. A causa mais comum da DHGNA consiste no desbalanço energético entre ingestão e gasto calórico, resultando em excesso de ácidos graxos não esterificados provenientes em grande parte do tecido adiposo visceral, e que se acumulam em depósitos adiposos ectópicos como fígado, músculo esquelético e pâncreas. Quando o influxo de TG no tecido hepático supera sua capacidade de beta-oxidação mitocondrial e sua excreção na forma de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) na corrente sanguínea, há o desenvolvimento da DHGNA (9). Cerca de 60% do aporte de lipídeos no fígado deriva da lipólise periférica, resultante da RI no tecido adiposo, levando à falha de sua supressão, enquanto que gorduras e açúcares provenientes diretamente da dieta contribuem com cerca de 35-40% deste aporte (10). O fígado também contribui com cerca de 25% do conteúdo lipídico dos hepatócitos por meio da lipogênese *de novo*, a partir de carboidratos da dieta, como glicose e frutose (10).

O desenvolvimento da DHGNA apresenta estreita correlação com a RI hepática, assim como periférica, em tecidos como músculo esquelético e adiposo (11). A RI é definida como o prejuízo na ação da insulina em desencadear uma cascata de eventos em tecidos alvo, especialmente músculo, tecido adiposo e fígado. Tanto a

disfunção do tecido adiposo quanto a RI são eventos fundamentais para a progressão para EHNA, com evidências que sustentam comunicação bidirecional entre fígado e tecido adiposo (11). Na RI ligada à obesidade, as altas concentrações séricas de ácidos graxos livres (AGL) e/ou o excesso de deposição ectópica de gordura no músculo ou fígado são implicadas em sua fisiopatogênese, apesar desta não estar completamente elucidada. No tecido adiposo, a RI resulta em um aumento da lipólise nos adipócitos, levando ao aumento de AGL circulantes, o que pode agravar a esteatose hepática e a RI no tecido muscular e hepático. Porém, estudos transversais com número pequeno de indivíduos, mas que avaliaram a ação da insulina por meio do *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico, demonstraram que a DHGNA está associada à RI hepática, no músculo esquelético e no tecido adiposo, independente da adiposidade, tanto em indivíduos magros como não-diabéticos obesos (11). No fígado, a RI impede a ação inibitória da insulina sobre a glicogenólise, promovendo hiperglicemia e hiperinsulinemia, agravando a RI. A hiperglicemia pode agravar ainda o estresse oxidativo que, por meio da ativação de quinases específicas, como quinase inibidora do fator nuclear kappa-B subunidade beta (IKK β) e quinase c-Jun N-terminal (JNK), inibe a cascata de sinalização insulínica (12).

O insulto hepático inicial devido ao excesso de lipídeos é seguido por interação em diferentes proporções de fatores como lipotoxicidade, ativação do sistema imune, predisposição genética, álcool e disbiose (13). A lipotoxicidade associada às formas saturadas de ácidos graxos não-esterificados, como lisofosfatidilcolina, palmitato, colesterol livre e ceramidas, leva ao estresse no retículo endoplasmático, disfunção lisossomal, ativação do inflamassoma, morte celular e ativação de resposta inflamatória em função do dano hepatocelular (13).

De maneira distinta do conceito inicial, que considerava a DHGNA apenas uma manifestação hepática da SM, metanálise recente demonstrou que a DHGNA é também fator determinante da SM, podendo inclusive precedê-la (14). Evidências convincentes suportam a DHGNA como fator no topo de uma cadeia de eventos biológicos que podem culminar no desenvolvimento de SM ou seus componentes, especialmente DM2. Esta quebra de paradigma ressalta a importância do rastreio da DHGNA e de seu tratamento na prevenção do desenvolvimento da SM e de suas complicações cardiovasculares (15). Em metanálise publicada em 2016 envolvendo mais de 117 mil pacientes de 20 estudos prospectivos, Ballestri e colaboradores demonstraram que a presença de DHGNA diagnosticada ao ultrassom (US) estava associada à incidência de SM, com um risco relativo (RR) de 3,22 (95% IC, 3,05-3,41), e à incidência de DM2, com RR de 1,86 (95% IC, 1,76-1,95) (15).

A DHGNA está ainda associada a um estado inflamatório de baixo grau crônico com consequências sistêmicas, ligadas a alterações no sistema imune celular e fatores humorais. Não só no fígado, mas também em outros órgãos, pode haver disfunção celular, apoptose e remodelamento tissular deletério ao órgão. Tais alterações levam a modificações metabólicas, sustentando o conceito de desordem imunometabólica ou inflamação metabólica (16). Existe crescente evidência de que a ocorrência de patologias como DM2, doenças cardiovasculares e declínio neurocognitivo está ligada ao grau de disfunção metabólica e inflamação hepática, via mediadores inflamatórios, como citocinas e proteínas de fase-aguda, hepatocinas, padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), assim como alterações no número, função, e estado de ativação de plaquetas e células imunes periféricas (17).

1.1.2. História natural e fatores determinantes da progressão da DHGNA

Apesar de sua alta prevalência, apenas alguns pacientes com DHGNA apresentarão progressão para fibrose e morbidades associadas. Sabe-se que a gravidade da histologia hepática, especialmente o grau de inflamação, é o principal determinante na progressão para formas avançadas de fibrose, sendo estas incomuns entre os pacientes portadores de esteatose isolada, e mais frequentes nos portadores de EHNA (18). No entanto, alguns estudos sugerem que a esteatose isolada pode não ser condição inteiramente benigna, com possibilidade de evolução para EHNA com fibrose avançada (19-21). Na literatura, ao menos 12 estudos de coorte analisaram a progressão da DHGNA por meio de biópsias pareadas, evidenciando que ao menos um terço dos pacientes com DHGNA e EHNA desenvolverão fibrose avançada (22). Tal progressão é caracteristicamente lenta, levando cerca de 14,3 anos para progredir um estágio de fibrose nos pacientes com esteatose isolada e 7,1 anos naqueles com EHNA (23). Além da histologia, outros fatores exercem influência na progressão da doença, como idade elevada, presença de DM2 ou RI, HAS, elevação de alanino aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) maior que ALT, pan-hipopituitarismo e maiores escores que avaliam o risco de fibrose como *fibrosis-4 score* (FIB-4), *NAFLD fibrosis score* (NAFLD-FS) e *AST to platelet ratio index* (APRI) (22-25). O álcool é também fator bem reconhecido de progressão da doença, de forma que mesmo seu consumo em pequenas quantidades favorece a progressão da EHNA, com pior histologia e risco de progressão da fibrose (13).

Pacientes com DHGNA apresentam maior mortalidade comparados à população em geral pareada por gênero e idade, sendo esta em sua maior parte devido eventos cardiovasculares e complicações do DM2, além de eventos

relacionados à descompensação hepática (22). O prognóstico a longo prazo é determinado principalmente pelo desenvolvimento e grau de fibrose hepática, com um aumento de todas as causas de mortalidade conforme estágio de fibrose, além de um aumento exponencial da mortalidade relacionada ao fígado. Pacientes com fibrose estadio 1 têm maior mortalidade por causas gerais, porém a mortalidade relacionada à doença hepática aumenta de maneira estatisticamente significativa a partir do estadio 2 (26).

O CHC apresenta incidência cumulativa com ampla variabilidade entre 0,25% e 7,6% nos pacientes com fibrose avançada, conforme o grupo estudado. Os pacientes com CHC associado à DHGNA apresentam idade mais avançada quando comparados àqueles com CHC sem DHGNA, além de mais comorbidades extra-hepáticas e menor prevalência de cirrose (2/ 3 dos casos) (1). Ao diagnóstico, há uma maior prevalência de estadios mais avançados do CHC, provavelmente devido uma vigilância menos sistemática, especialmente nos pacientes não-cirróticos. Nestes, os casos de CHC estão especialmente relacionados aos fatores de risco para DHGNA, sendo estes obesidade, DM2 e SM (22). O polimorfismo rs738409 do gene da *Patatin-Like Phospholipase Domain Containing 3* (PNPLA3) foi associado a um risco aumentado de CHC e pode fornecer substrato para uma vigilância individualizada do risco de neoplasia (1).

1.1.3. Influência dos fatores genéticos na DHGNA

Conforme abordado anteriormente, somente uma pequena parcela dos pacientes cursa com formas avançadas de DHGNA, mesmo em vigência de fatores de risco ambientais semelhantes. Acredita-se que fatores genéticos são responsáveis por tal diversidade na susceptibilidade e progressão da doença (27). Estudos epidemiológicos (28), familiares (29, 30) e com gêmeos (31) fornecem evidências da

influência genética determinante no fenótipo da DHGNA. Em estudos familiares, o risco de fibrose avançada foi 12,5 vezes maior em familiares de primeiro grau de pacientes com cirrose por DHGNA comparado à população em geral (18% vs. 1%, respectivamente), independente das alterações metabólicas. O desenvolvimento de estudos de associação genética de escala genômica (GWAS) permitiu a identificação de locus de susceptibilidade associados ao risco de esteatose. A grande variedade de genes associados com a DHGNA pode ser agrupada, conforme seus mecanismos, entre modificadores do metabolismo dos ácidos graxos e acúmulo de TG no fígado, determinantes da progressão para EHNA (por exemplo, modificadores do estresse oxidativo, resposta por endotoxinas ou citocinas e atividade da adipocina) e, por fim, aqueles que podem influenciar a fibrogênese hepática (32). Apesar da descrição de inúmeros fatores genéticos modificadores da DHGNA, apenas alguns deles foram validados de maneira independente (1). As variantes mais comuns descritas em GWAS ou estudos de associação ampla do exoma (EWAS), associadas de maneira independente com o desenvolvimento e/ou progressão da DHGNA/ EHNA incluem o polimorfismo rs738409 C>G do gene da PNPLA3, o polimorfismo rs58542926 C>T no gene *Transmembrane 6 superfamily member 2* (TM6SF2), o polimorfismo rs641738 no gene da *Membrane-bound O-acyltransferase domain-containing 7* (MBOAT7) e o polimorfismo rs1260326 do gene que codifica a proteína reguladora da glicoquinase (GCKR) (33). Polimorfismos dos genes da 17-beta desidrogenase 13 (HSD17B13), da interleucina 28B (IL28B) e da quinase Mer T (MERTK) têm sido associados à menor progressão para EHNA, formas avançadas de fibrose e CHC (33). Destes, o polimorfismo do gene da PNPLA3 é o fator de risco genético mais validado em diferentes populações e com maior associação à DHGNA e sua gravidade em relação aos demais (34, 35).

1.1.4. Polimorfismo no gene da PNPLA3 e DHGNA

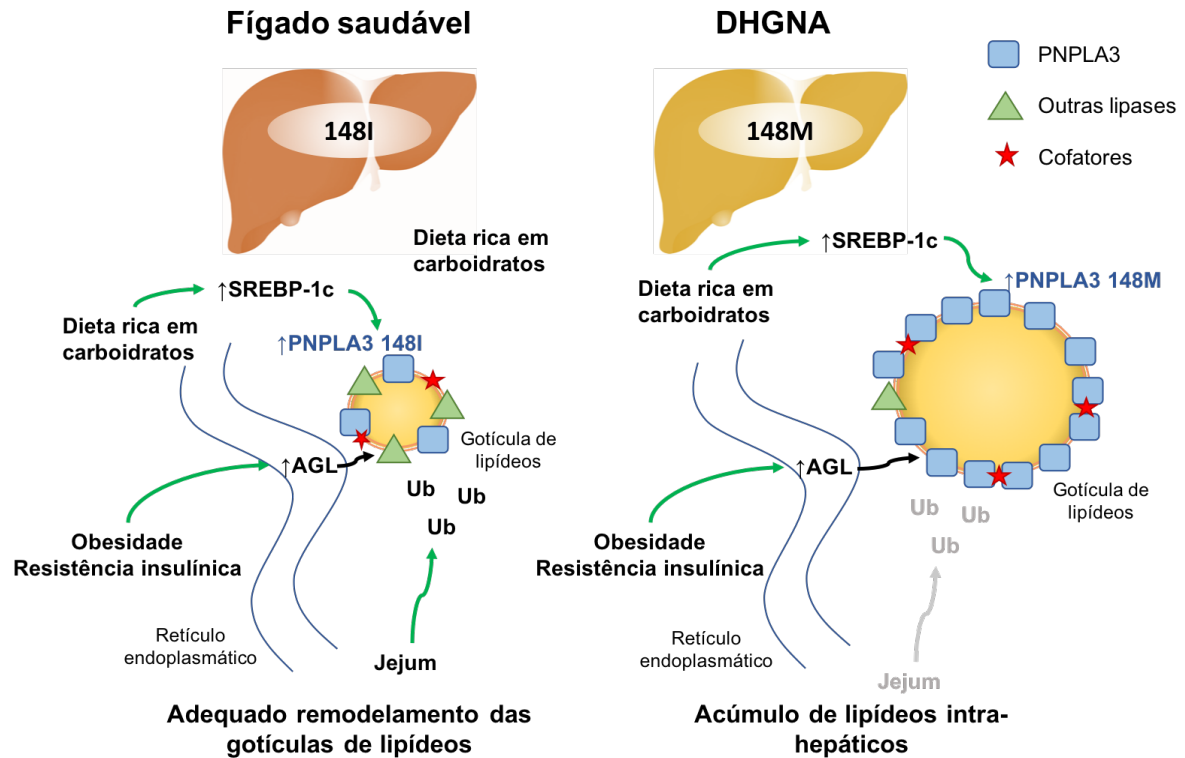
O polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) é a forma de variação na sequência do DNA mais comum em seres humanos, consistindo na substituição de um único nucleotídeo por outro, ocorrendo em uma frequência maior que 1% na população em geral. O SNP no gene da PNPLA3 (rs738409 c.444 C>G, p. I148M) foi identificado pela primeira vez por Romeo e colaboradores em um GWAS publicado em 2008 como principal fator associado às diferentes formas de manifestação da DHGNA interindivíduos, contribuindo para explicar a susceptibilidade distinta entre as diversas etnias (36). Neste estudo foram avaliadas 9229 variações genéticas não sinônimas, em uma população de 2111 indivíduos de diferentes etnias (afro-americanos, caucasianos e hispânicos), sendo observada forte associação do SNP rs738409 no gene da PNPLA3 com o conteúdo hepático de triacilglicerol, avaliado na espectroscopia por ressonância magnética. A associação foi independente da RI e do peso corporal, com maior prevalência em pacientes de origem hispânica. Inúmeros outros estudos subsequentes reproduziram a relação entre o SNP no gene da PNPLA3 e a DHGNA (37, 38), ligando tal variante não só ao desenvolvimento da doença, mas também a alterações de enzimas hepáticas (39) e a um perfil mais grave de EHNA com maior predisposição à progressão da fibrose (40, 41).

O gene PNPLA3, localizado no cromossomo 22, codifica a proteína adiponutrina (ADPN), composta por 481 aminoácidos, expressa no retículo endoplasmático e na superfície de gotículas de lipídeos nos hepatócitos e adipócitos (42). A ADPN, pertencente à família das *patatin-like phospholipase*, possui um domínio N-terminal semelhante ao da patatina, a proteína mais abundante dos tubérculos da batata (43). Nos seres humanos, apesar de presente em diversos tecidos, tem maior expressão no tecido hepático (42) e sua função tem sido tema de

ampla pesquisa com evidências de que pode exercer tanto atividade hidrolase triacilglicerol quanto transacetilase lipogênica (40) estando, portanto, envolvida na remodelação de gotículas de lipídeos nos hepatócitos. A insulina exerce papel central na regulação das alterações metabólicas em resposta ao nível de carboidratos da dieta. Ela regula a atividade de determinadas proteínas a curto prazo e pode ainda modificar seus níveis de transcrição a longo prazo, alterando suas quantidades circulantes. No fígado, é o fator de transcrição denominado proteína de ligação ao elemento regulador de esterol 1c (SREBP-1c) que medeia os efeitos de transcrição da insulina (44). Assim como outros genes envolvidos no metabolismo lipídico, o gene da PNPLA3 é alvo da SREBP-1c e tem sua transcrição fortemente estimulada pela ingestão de carboidratos.

Na forma variante da proteína, resultante do SNP rs738409 no gene da PNPLA3, há uma substituição de isoleucina por metionina (Met) na posição de aminoácido 148 (I148M). O mecanismo pelo qual a mesma favorece o acúmulo lipídico hepático vem sendo extensivamente estudado em modelos murinos e *in vitro*. A perda de função de hidrolase da forma variante foi demonstrada por alguns estudos (45-47) e, baseado nesta observação, cogitou-se que a isso se devia o acúmulo intra-hepático de TG. Tal hipótese foi questionada quando se demonstrou que a deficiência de ADPN em modelos murinos não contribuiu para o surgimento da DHGNA (48, 49). Além disso, um estudo utilizando camundongos demonstrou que a superexpressão da ADPN em sua forma selvagem levou ao maior acúmulo de TG nos hepatócitos (50), corroborando a hipótese de um predomínio na função lipogênica da proteína. Evidência adicional foi fornecida por Kumari e colaboradores ao comprovar que a ADPN catalisa a acilação do ácido lisofosfatídico em ácido fosfatídico, um importante passo na biossíntese de TG, e que a forma variante I148M promoveu aumento desta

atividade catalisadora, com maior síntese lipídica (43). Porém, a falha em observar essa atividade de aumento da síntese de TG pela forma variante, tanto *in vitro* quanto em modelos murinos (46, 51), reforça a existência de mecanismos adicionais que levem ao acúmulo intra-hepático de lipídeos. Dados da literatura sugerem a presença de uma proteína cataliticamente inativa que interfere na mobilização de TG das gotículas lipídicas (44, 52, 53), conforme demonstrado na Figura 1.



Fonte: Adaptado de Dongiovanni P, Valenti L (53)

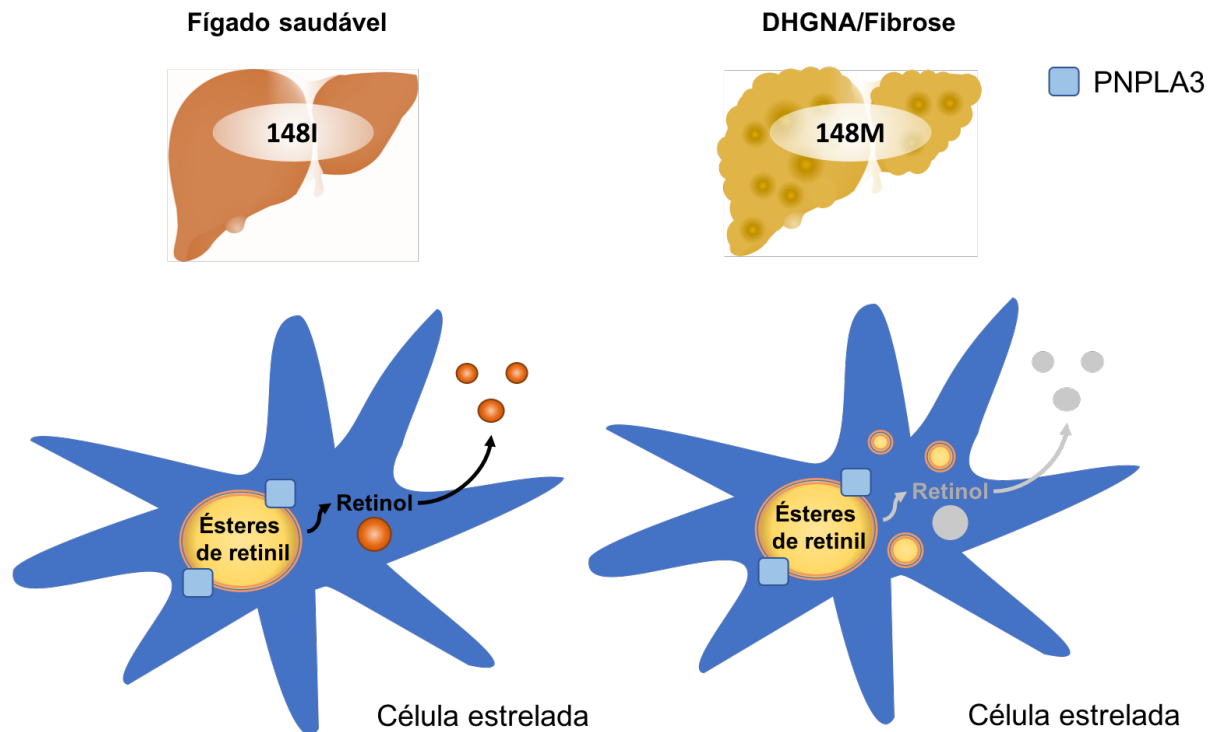
Figura 1 - Representação hipotética do mecanismo pelo qual a variante I148M da PNPLA3 influencia o desenvolvimento de DHGNA por evasão da ubiquitinação. A PNPLA3 é indicada pelo quadrado azul, cujo número é proporcional aos níveis da proteína. Outras lipases são indicadas pelos triângulos verdes, enquanto que cofatores são indicados por estrelas vermelhas. A ingestão de carboidratos favorece a elevação do fator de transcrição SREBP-1c, que estimula a transcrição do gene da PNPLA3 elevando os níveis da mesma. À esquerda, observa-se que na presença da forma selvagem da PNPLA3 há um adequado remodelamento das gotículas de lipídeos, com ótima hidrólise em associação com outras lipases e cofatores, seguida por ubiquitinação e degradação da proteína no jejum. Em contraste, à direita, a forma variante determina acúmulo da proteína disfuncional na superfície das gotículas lipídicas, dificultando o acesso de outras lipases aos triglicerídeos e/ou cofatores essenciais, favorecendo assim o acúmulo de lipídios intra-hepáticos. Abreviações: DHGNA, doença hepática gordurosa não alcoólica; PNPLA3, Patatin-like Phospholipase Domain Containing 3; SREBP-1c, proteína de ligação ao elemento regulador de esterol 1c; AGL, ácidos graxos livres; Ub, moléculas de ubiquitina.

Basuray e colaboradores compararam camundongos geneticamente modificados portando forma variante 148M da PNPLA3 a controles portadores da forma selvagem 148I. Os autores confirmaram que a síntese de TG, sua oxidação e secreção não estavam alteradas nos camundongos portadores da forma variante da proteína. No entanto, em comparação aos camundongos portadores da forma

selvagem, pôde-se observar níveis maiores e mais persistentes da PNPLA3, induzidos por dieta rica em sacarose. Além disso, após a inibição do sistema ubiquitina-proteossoma, responsável pela degradação de proteínas danificadas ou com erros de síntese, observou-se marcado acúmulo da ADPN em camundongos portadores de sua forma selvagem, enquanto que nos portadores homozigotos de sua forma variante o nível da proteína permaneceu inalterado. A ligação de moléculas de ubiquitina aos resíduos de lisina (Lys) ou Met da ADPN é um processo induzido pelo jejum, responsável pela regulação pós-translacional da atividade proteica, sua localização, e por sinalizá-la para a degradação proteossômica (54). Tal resultado sustenta a hipótese de que a variante 148M leva a um distúrbio na sua ubiquitinação e degradação proteossômica, resultando no acúmulo da ADPN variante 148M e menor mobilização de TG das gotículas lipídicas por outras lipases, especialmente a lipase de TG de tecido adiposo (LTGA) (52).

Novas evidências demonstram ainda o envolvimento da ADPN na liberação de retinol por células estreladas hepáticas em resposta a sinais metabólicos, como a insulina (45, 55, 56). Estudo conduzido com adultos com obesidade (57), com e sem DHGNA, demonstrou que a presença da forma variante da PNPLA 148M foi associada a menores níveis de retinol circulante no jejum, levantando a hipótese de retenção intracelular de retinol nas células estreladas hepáticas, conforme representado na Figura 2. As células estreladas hepáticas são capazes de alterar seu fenótipo de um estado quiescente de armazenamento de retinol para células ativas semelhantes a miofibroblastos em resposta ao estímulo inflamatório crônico. A liberação do retinol durante esta transformação fenotípica ainda não tem seu impacto mensurado no dano hepático (58). Estudos adicionais se fazem necessários para melhor elucidação do

papel da retenção intracelular do retinol em células estreladas na progressão do dano hepático e carcinogênese (57).



Fonte: Adaptado de Trépo E et al. (58)

Figura 2 - Representação da retenção de retinol intracelular nas células estreladas hepáticas. Nas células estreladas hepáticas, a PNPLA3 também é espessa nas gotículas de lipídeos, que contêm ésteres de retinil. À esquerda observa-se representação da atividade de hidrolase da proteína em sua forma selvagem, levando à liberação de retinol. A variante da PNPLA3 148M, representada à direita, determina acúmulo intracelular de ésteres de retinil. Abreviaturas: DHGNA, doença hepática gordurosa não alcoólica; PNPLA3, Patatin-like Phospholipase Domain Containing 3.

1.1.5. Polimorfismo no gene PNPLA3 na DHGNA e associação com obesidade e SM

A interação entre o índice de massa corpórea (IMC) e o gene da PNPLA3 tem sido largamente investigada. Estudo desenvolvido na população japonesa demonstrou que a prevalência de DHGNA recebe maior influência do polimorfismo rs738409 no gene da PNPLA3 em indivíduos não obesos do que obesos (59). Nishioji

e colaboradores adicionalmente evidenciaram que a interação deste SNP com o ganho de peso ≥ 10 kg após os 20 anos de idade exerce função decisiva na patogênese da DHGNA (59). Em contrapartida, estudo desenvolvido por Stender e colaboradores, evidenciou achados que se contrapõem aos do grupo japonês. Foram utilizados dados de 2675 participantes submetidos a espectroscopia por ressonância magnética para quantificação do conteúdo hepático de TG e genotipagem de diversos SNPs relacionados à DHGNA, inclusive do gene PNPLA3, para avaliar a interação genética com diversos subgrupos de IMC. Em pacientes magros ($\text{IMC} < 25 \text{ kg/m}^2$) a mediana do conteúdo hepático de TG aumentou de 1,8% em pacientes homozigotos CC, para 2,8% para pacientes homozigotos GG. Já em indivíduos obesos ($\text{IMC} > 35 \text{ kg/m}^2$) essa mediana triplicou de 4,7% (homozigotos CC) para 14,2% (homozigotos GG). Na análise quanto ao risco de cirrose, o aumento do IMC também pareceu atuar sinergicamente aos efeitos do risco genético ofertado pelo SNP. Esses achados corroboram a hipótese de que a obesidade amplifica os efeitos de aspectos genéticos sobre o risco de desenvolvimento de DHGNA e evolução para cirrose (60). Importante ainda é observar que, com base nesse estudo, a forma variante da proteína PNPLA3 fora de um contexto de obesidade e RI exerce mínimos efeitos sobre o conteúdo hepático de TG. Assim, o desbalanço energético, com maior aporte de substrato ao fígado, além da RI, são relevantes para o efeito pró-esteatótico e pró-lipotóxico da forma variante 148M da ADPN (61).

A relação entre a forma variante da PNPLA3 e a SM no contexto de DHGNA foi abordada em diversos estudos prévios. Após pesquisar o SNP rs738409 em 288 indivíduos com sobrepeso/obesidade, Mangge e colaboradores demonstraram diferença estatisticamente significativa entre portadores e não portadores de SM, com maior prevalência do SNP nos indivíduos com SM (62). Tais achados contradizem

outros estudos onde nenhuma correlação entre o SNP rs738409 e a SM foi evidenciada (63-67). Além disso, já foi demonstrado que indivíduos homozigotos GG apresentam menor prevalência de SM além de menor RCV do que indivíduos não portadores da forma variante (68).

A presença do polimorfismo do gene da PNPLA3 parece alterar a resposta a fatores nutricionais e de estilo de vida. Evidências apontam que carreadores do SNP no gene da PNPLA3 respondem de maneira mais sensível às mudanças no estilo de vida e se beneficiam fortemente de programas que visam a perda ponderal, dado este de fundamental importância no manejo clínico destes pacientes (69).

1.2. SOP e DHGNA

A SOP é a desordem endócrina mais comum a acometer mulheres em idade reprodutiva (70), tendo sido inicialmente descrita em 1935 por Stein e Leventhal como uma desordem abrangendo irregularidade menstrual, infertilidade, hirsutismo e aumento dos ovários com morfologia micropolicística (71). De maneira semelhante à DHGNA, possui amplo espectro de apresentação clínica, sendo fortemente associada à SM, RI e obesidade (72-74). Estima-se que acometa de 6 a 10% das mulheres em idade reprodutiva (75-77), uma vez considerada sua definição clássica, que consiste na presença de hiperandrogenismo e disfunção ovulatória. Ao se considerar os critérios de Rotterdam, onde são incluídos fenótipos sem evidência necessária de hiperandrogenismo, a prevalência pode chegar a 18%. Múltiplos fatores genéticos, metabólicos e hormonais interagem na fisiopatogênese da SOP (72, 78, 79).

A SOP está associada na grande maioria dos casos a baixos níveis de hormônio folículo-estimulante (FSH) e altos níveis de androgênios. O hiperandrogenismo leva ao mau desenvolvimento dos folículos nos ovários, prejudicando o adequado amadurecimento dos óvulos, dando origem aos cistos vistos

em pacientes com SOP (80). Sabe-se que a SOP está associada a um maior risco de desenvolvimento de DM2 e dislipidemia (81), porém sua associação com um maior risco de eventos cardiovasculares ainda não está clara, em grande parte por uma necessidade de estudos de longo prazo, acompanhando estas pacientes inclusive no período pós-menopausa (82). Diversas evidências na literatura, no entanto, apontam para o desenvolvimento de maneira precoce de doença cardiovascular subclínica em relação aos controles, devido disfunção endotelial observada neste grupo (83, 84).

A SOP oferece um risco aumentado para DHGNA, com base em inúmeros estudos que demonstram uma prevalência elevada nesta população, independente da existência de SM. Em metanálise de 17 estudos, onde foram considerados 2734 casos e 2561 controles, Rocha e colaboradores encontraram um risco 2,5 vezes maior de mulheres portadoras de SOP desenvolverem DHGNA comparadas aos controles (85). A prevalência de DHGNA em mulheres com SOP varia de 35 a 70%, comparado a cerca de 30% na ausência de SOP, ajustando-se para idade, IMC e CC (86). Nota-se também uma alta prevalência de SOP em mulheres com DHGNA, como evidenciaram dois estudos em centros terciários, variando de 50-70% (87, 88). A RI é fator comum e exerce papel central na fisiopatogenia de ambas as afecções na maioria dos casos, especialmente quando ligada à obesidade (85, 89).

Cerca de 61 a 76% das mulheres com SOP possuem obesidade, o que piora seus desfechos metabólicos e reprodutivos. Da mesma maneira, a adiposidade central, independente do IMC, também agrava tais desfechos. Inúmeros estudos revelam que a frequência de DHGNA é significativamente maior entre mulheres com SOP e obesidade do que em mulheres com SOP não-obesas (90). Entretanto, metanálise de estudos que compararam mulheres com SOP e mulheres saudáveis de

mesmo IMC demonstrou maior risco de DHGNA nas mulheres portadoras de SOP (85).

A elevada prevalência de DHGNA em pacientes jovens com SOP, independentemente da presença de obesidade e/ ou SM, mostra que esta associação não é explicada apenas pela sobreposição da obesidade em ambas as condições, mas provavelmente também por outros mecanismos fisiopatológicos (91). Jones e colaboradores demonstraram ainda que mulheres com SOP e hiperandrogenismo apresentam maior prevalência de DHGNA comparadas a mulheres com SOP sem hiperandrogenismo, mesmo após ajustes para potenciais confundidores como IMC, adiposidade e RI (91). Alguns estudos demonstraram os possíveis efeitos pró-apoptóticos dos androgênios nos hepatócitos, inclusive com níveis aumentados do marcador de apoptose citoqueratina 18 clivada (CK-18) em mulheres com SOP em relação aos controles, independente do IMC (92). Tal elevação das concentrações de CK-18 precede a progressão de DHGNA para EHNA podendo indicar, portanto, um maior dano hepático nas mulheres com SOP e DHGNA, com apoptose precoce (93). Uma vez desenvolvido o dano hepático, o mesmo pode afetar diretamente o metabolismo androgênico e, conseqüentemente, alterar o perfil hormonal das mulheres com SOP (86).

Uma menor produção e secreção hepática da globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG) é observada no contexto de obesidade, RI e aumento dos androgênios livres circulantes. A SHBG atua como agente central na regulação da sinalização esteroideal, removendo testosterona e estradiol e reduzindo, portanto, sua biodisponibilidade nos tecidos-alvos (94). Uma vez que a SHBG atua na regulação da lipogênese *de novo* hepática, reduzindo os níveis de carboxilase acetil-CoA, é importante destacar a evidência de menor expressão de micro-RNA (mRNA) da SHBG

em amostras de biópsias hepáticas proporcionalmente ao grau de esteatose. Adicionalmente, os níveis de mRNA da SHBG são inversamente proporcionais ao nível de RI (94).

Aumento da gordura visceral e disfunção do tecido adiposo estão associados à patogênese tanto da DHGNA quanto da SOP. Mulheres com SOP apresentam maior adiposidade global e maiores quantidades de tecido adiposo visceral, especialmente em depósitos intraperitoneais e mesentéricos (94). Estudo que avaliou 117 pacientes chinesas com SOP demonstrou que mensurações ultrassonográficas da gordura visceral mesentérica são um fator determinante independente para o desenvolvimento de esteatose hepática, com um maior RCV associado a maiores medidas de espessura da camada íntima-média da carótida (95). Além da distribuição, as mulheres com SOP apresentam alterações no tecido adiposo não evidenciadas em mulheres obesas sem SOP, com diâmetro dos adipócitos cerca de 25% maior, associado ainda à RI local. É digno de nota que os androgênios são capazes de induzir RI em células do tecido adiposo subcutâneo *in vitro* (94). Outros possíveis mediadores entre o hiperandrogenismo, RI e DHGNA, em mulheres com SOP, são as adipocinas (86). Os androgênios promovem aumento da gordura visceral (96), exercendo um efeito direto e inverso na secreção de adipocinas (97-99). Estudos prévios comprovam os efeitos antiesteatóticos, antiapoptóticos e anti-inflamatórios da adiponectina (100, 101), sendo demonstrados níveis reduzidos da mesma em pacientes com DHGNA em relação aos controles e em pacientes com EHNA comparados àqueles com esteatose isolada (102-104). Além da redução dos níveis da adiponectina, a expressão de seus receptores é menor em pacientes com EHNA do que naqueles com esteatose isolada, e está inversamente relacionada ao grau de inflamação e fibrose (105, 106). Somado à isso, mulheres com SOP apresentam menores níveis de adiponectina quando

comparadas aos controles pareados pelo IMC (94). Apesar dos potenciais efeitos protetores da adiponectina, a maioria das demais adipocinas, como a leptina, induz esteatose hepática (86).

O papel da RI no desenvolvimento da SOP vem sendo alvo de inúmeros estudos (107, 108), com evidências consistentes de uma estreita correlação entre ambas, independentemente da presença de obesidade (108). Estudo utilizando o *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico, considerado o método padrão-ouro para a avaliação da sensibilidade à insulina, demonstrou RI no tecido periférico (músculo esquelético e tecido adiposo), independente da presença de obesidade, adiposidade central ou presença de intolerância à glicose e/ ou DM2 (109). Stepto e colaboradores (108) demonstraram maior RI em mulheres magras com SOP do que no grupo controle de IMC comparável, levantando a hipótese de mecanismos que levem a uma RI “intrínseca” nessas mulheres. Pesquisas que avaliaram tais mecanismos sugerem uma sinalização periférica da insulina aberrante através do substrato do receptor da insulina I (108). Sabe-se que os ovários possuem receptores da insulina em abundância e que a mesma potencializa a produção de androgênios induzida pelo hormônio luteinizante (LH), tendo efeitos mais expressivos em mulheres com SOP devido maior sensibilidade das células da teca interna ao LH (90).

Obesidade e RI representam fatores patogênicos centrais da SOP e DHGNA. Revisão sistemática demonstrou a presença de RI em 50 a 80% das mulheres com SOP e DHGNA (80). Como exposto anteriormente, a RI tem sido associada de maneira independente ao desenvolvimento da DHGNA e esta última pode agravar a RI. Desta forma, mulheres que apresentam SOP e DHGNA apresentam pior perfil metabólico em comparação com mulheres sem DHGNA, tendendo a apresentar maior

IMC, maior razão cintura-quadril (RCQ), maiores índices de HOMA-IR e maiores níveis de insulina (110).

Uma série de fatores inflamatórios e derivados de macrófagos também está envolvida na fisiopatogênese da SOP, como a resistina, o fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$), interleucinas e proteína C reativa (PCR) (94). Indivíduos com RI apresentam maiores níveis de $\text{TNF}\alpha$ e este possui maior expressão tanto na SOP quanto na DHGNA, independentemente da obesidade. Níveis elevados de $\text{TNF}\alpha$ podem ativar quinases que induzem produção de citocinas e que atenuam a expressão e atividade da adiponectina (94). Além disso, o $\text{TNF}\alpha$, interleucina 1 beta ($\text{IL-1}\beta$) e o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma tipo gama ($\text{PPAR}\delta$) reduzem os níveis de SHBG, aumentando os níveis de androgênios livres em pacientes com SOP (94).

1.3. Justificativa

A avaliação de DHGNA em mulheres com SOP é fundamental, uma vez que este grupo desenvolve a doença em idades mais precoces comparado a outros grupos com DHGNA, além de apresentar formas mais avançadas com maior frequência (86, 94) e antes dos 40 anos (88, 111). A possibilidade de identificar fatores de risco adicionais para DHGNA e sua progressão para formas avançadas com fibrose em mulheres com SOP adquire grande importância diante de tal cenário, permitindo individualizar não só seu tratamento, mas também o seguimento.

2. Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo Primário

Determinar a frequência do polimorfismo do gene da PNPLA3 e seu impacto na susceptibilidade e gravidade da DHGNA em pacientes com SOP.

2.2. Objetivos Secundários

- Avaliar a relação do polimorfismo da PNPLA3 com o perfil endócrino e metabólico destas pacientes.
- Avaliar outros fatores associados à DHGNA e fibrose hepática em pacientes com SOP.

3. Materiais e métodos

3. Materiais e métodos

3.1. Aspectos éticos

Este estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), em 21 de março de 2018, sob número de parecer 2.554.658 (Anexo 1). Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi fornecido às pacientes, com leitura, compreensão e assinatura do documento previamente à participação no estudo (Anexo 2).

3.2. Desenho do estudo

Estudo transversal, que avaliou pacientes com SOP atendidas no HCFMUSP nos ambulatórios de Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (A2MG700) da Disciplina de Gastroenterologia, de Síndromes Hiperandrogênicas da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia e de Ginecologia Endócrina e Climatério da Disciplina de Clínica Ginecológica. A amostra foi obtida por conveniência, de acordo com o acesso das pacientes aos respectivos ambulatórios.

3.2.1. Critérios de Inclusão

Mulheres com diagnóstico de SOP em acompanhamento nos respectivos ambulatórios.

3.2.2. Critérios de Exclusão

- Consumo de álcool ≥ 20 g por dia.
- Presença de causas secundárias de hepatopatias (hepatites virais, hepatite autoimune, doença de Wilson, hemocromatose, doença celíaca, doenças hepáticas

colestáticas, uso prévio ou atual de drogas hepatotóxicas, deficiência de alfa-1-antitripsina, dentre outras).

- Pacientes portadoras de vírus da imunodeficiência humana (HIV).
- Pacientes gestantes.
- Recusa à participação da pesquisa.

3.3. Variáveis e definições utilizadas no estudo

3.3.1. Variáveis demográficas, antropométricas e história de tabagismo

Variáveis demográficas e antropométricas (idade, peso, estatura, CC, circunferência do quadril e cálculo da relação cintura-quadril (RCQ) e do IMC) foram obtidas no momento da consulta médica. O índice de massa corporal (IMC) foi calculado considerando-se o peso em quilogramas (kg) e a altura em metros (m), conforme a fórmula $IMC = \text{Peso (kg)} / \text{Altura (m)}^2$. Conforme o IMC, as pacientes foram classificadas em baixo peso ($< 18,5 \text{ kg/ m}^2$), peso normal ($18,5 - 24,9 \text{ kg/ m}^2$), sobrepeso ($25 - 29,9 \text{ kg/ m}^2$), obesidade grau I ($30 - 34,9 \text{ kg/ m}^2$), obesidade grau II ($35 - 39,9 \text{ kg/ m}^2$) e obesidade grau III ($> 40 \text{ kg/ m}^2$) (112). A relação cintura quadril (RCQ) foi calculada conforme a fórmula: $RCQ = \text{circunferência da cintura (cm)} / \text{circunferência do quadril (cm)}$.

Mulheres que se autodeclararam consumidoras de cigarro diariamente ou ocasionalmente foram consideradas tabagistas atuais. Aquelas que referiam história prévia de tabagismo foram definidas como tabagistas pregressas e aquelas que nunca fumaram como não tabagistas.

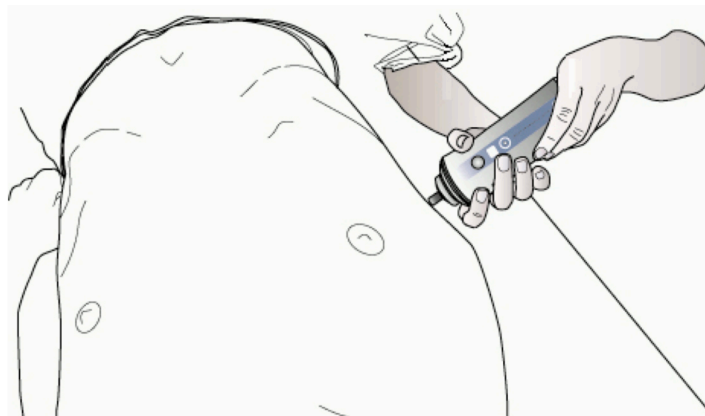
3.3.2. Definição da DHGNA

As pacientes com SOP inicialmente selecionadas foram avaliadas quanto à presença de esteatose hepática por meio de US de abdome realizado por radiologista experiente, com aparelho Toshiba modelo SSA-240A® (Toshiba; Tóquio, Japão). O diagnóstico de acordo com este método aferiu a intensidade do brilho ou ecogenicidade difusamente aumentada do parênquima hepático, a discrepância ecogênica do fígado e do rim, e a perda de ecogenicidade das paredes venosas portais. A biópsia hepática foi realizada apenas nas pacientes com indicação clínica, não sendo o objetivo deste estudo a avaliação histológica. Foram realizados testes para rastreio de causas secundárias de hepatopatias através da realização de sorologias de hepatites virais (B e C), HIV, autoanticorpos hepáticos, níveis séricos de ferro, saturação de transferrina, ceruloplasmina, cobre e alfa 1-antitripsina. Foram excluídas pacientes com história de abuso de substâncias, especialmente consumo de álcool ≥ 20 g por dia, questionada durante a anamnese. Pacientes com história de uso prévio de medicações esteatogênicas (corticosteróides, metotrexato, amiodarona ou tamoxifeno) também foram excluídas.

3.3.3. Avaliação não invasiva do grau de fibrose hepática e esteatose

Todas as pacientes com diagnóstico de DHGNA foram submetidas a elastografia hepática transitória (EHT) por Fibroscan® (Echosens, Paris, France), equipado com probe M e XL, sendo realizada por examinador experiente. As mesmas eram orientadas a comparecer para o exame em jejum de pelo menos 04 horas. Com a paciente em decúbito dorsal, com o braço direito em abdução máxima, era realizada avaliação do melhor ponto para aferição das medidas com auxílio de US, definindo-

se local livre de estruturas vasculares, na linha axilar média direita, e avaliando-se a distância pele-cápsula hepática para definição do probe mais adequado a ser empregado. O probe XL foi empregado nas pacientes com IMC ≥ 30 kg/ m² e distância pele-cápsula hepática $> 2,5$ cm. No local definido, em espaço intercostal, em topografia correspondente ao lobo hepático direito, com o probe posicionado perpendicularmente à pele do paciente, eram realizados os disparos. Vibrações de baixa frequência eram então transmitidas para a pele, induzindo uma onda de cisalhamento que se propaga através do fígado de maneira esférica, cuja velocidade é convertida pelo aparelho em medida de rigidez hepática (LSM), expressa em kiloPascal (kPa). Era necessário o mínimo de dez medidas válidas com taxa de sucesso $> 60\%$ e intervalo interquartil $\leq 30\%$ para definir o exame como válido. Resultados que não seguiam tais critérios não eram considerados confiáveis e não foram utilizados no estudo. Representação do método de realização da EHT pode ser visualizada na Figura 3. Os valores da EHT e sua correspondência com estadiamento da fibrose de acordo com a classificação de Kleiner (113) foi realizado conforme descrito na Tabela 1.



Fonte: Mueller S (114)

Figura 3 - Representação da realização da elastografia hepática por Fibroscan®. Com a paciente posicionada em decúbito dorsal, com membro superior direito em abdução máxima, o probe era posicionado em espaço intercostal direito, perpendicular à pele do paciente, após avaliação do melhor ponto para aferição através de ultrassom. Ao menos dez disparos eram efetuados para obtenção de no mínimo dez medidas válidas.

Tabela 1 - Estimativa do grau de fibrose hepática conforme valores de elastografia hepática transitória (115)

	F0	F1	F2	F3	F4
Valores da elastografia hepática transitória (kPa)	< 5,8	5,8-6,9	7,0-8,6	8,7-11,4	> 11,4

Concomitante à mensuração do grau de rigidez hepática pelo Fibroscan® foi ainda realizado avaliação do parâmetro do coeficiente de atenuação [(do inglês: *Controlled Attenuation Parameter* (CAP)] expresso em decibéis/metro (dB/ m), o qual permite uma imediata detecção e avaliação do grau de esteatose hepática. A correspondência dos valores de CAP obtidos com o grau de esteatose é representada na Tabela 2.

Tabela 2 - Estimativa do grau de esteatose hepática conforme valores do parâmetro do coeficiente de atenuação (CAP) (116)

	G0	G1	G2	G3
Valores do parâmetro do coeficiente de atenuação (dB/m)	< 231	231-267	268-300	> 300

Os valores dos escores de FIB-4 (117) e/ ou NAFLD-FS (2, 118) foram calculados conforme fórmulas abaixo.

$$FIB\ 4 = \frac{Idade\ (anos) \times AST\ (UI/L)}{Plaquetas\ (10^9) \times \sqrt{ALT\ (UI/L)}}$$

$$NAFLD\ fibrosis\ score = -1.675 + 0.037 \times idade\ (anos) + 0.094 \times IMC\ (kg/m^2) + 1.13 \times glicemia\ de\ jejum\ alterada\ ou\ diabetes\ (sim = 1, não = 0) + 0.99 \times AST/ALT - 0.013 \times plaquetas\ (\times\ 10^9/L) - 0.66 \times albumina\ (g/dL)$$

3.3.4. Definição da SOP

O diagnóstico da SOP foi estabelecido utilizando os critérios de Rotterdam 2003 (119), em que a presença de duas das três características mencionadas a seguir

confirma o diagnóstico: hiperandrogenismo clínico e/ou hiperandrogenemia, oligo/anovulação crônica e ovários policísticos (OP) ao US, excluindo causas secundárias. Hiperandrogenismo foi definido pela presença de hirsutismo, sendo este o sinal clínico mais reconhecidamente ligado a esta disfunção (120). Hirsutismo foi definido por score modificado de Ferriman-Gallwey ≥ 8 (121, 122). Hiperandrogenemia pelo aumento das concentrações de testosterona total e/ou livre e/ou androstenediona e/ou sulfato de dehidroepiandrosterona (SDHEA), no momento do diagnóstico. Para pacientes que já apresentavam diagnóstico prévio de SOP ao recrutamento, os níveis hormonais ao diagnóstico foram obtidos dos registros em prontuário. Níveis de testosterona total foram determinados por eletroquimioluminescência (ECLIA, Cobas e601, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Oligo/anovulação foi diagnosticada pela presença de oligomenorréia (menos de 9 ciclos menstruais por ano) (123) ou progesterona na fase lútea < 4 ng/ mL em dois ciclos subsequentes. A definição de OP ao US foi a presença de ≥ 12 cistos foliculares com distribuição periférica e tamanho < 1 cm e/ ou a presença de ovários com volume > 10 cc, uni ou bilateralmente (119). Para o diagnóstico de SOP era necessário ainda a exclusão de hipotireoidismo através da dosagem de TSH, hiperprolactinemia através da dosagem de prolactina (PRL), forma não clássica da deficiência da 21-hidroxilase através do teste da cortrosina - dosagem da 17-hidroxiprogesterona (17-OHP) após estímulo com hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) sintético, quando indicado, síndrome de Cushing através de história clínica e exame físico evidenciando ganho de peso excessivo, pletora facial, giba, atrofia muscular, estrias violáceas em abdome e fragilidade capilar, e de tumores androgênicos através de história e exame físico evidenciando sinais e sintomas de virilização.

As diferentes características da SOP foram agrupadas e classificadas em fenótipos de acordo com estudos previamente publicados (124), conforme descrito na Tabela 3. A SOP é classificada em 4 fenótipos distintos, de acordo com a presença ou ausência de três características: hiperandrogenismo clínico e/ou hiperandrogenemia, disfunção ovulatória e morfologia de OP ao US transvaginal.

Tabela 3 - Classificação da SOP em fenótipos de acordo com as características apresentadas

	Fenótipo A	Fenótipo B	Fenótipo C	Fenótipo D
Hiperandrogenismo clínico e/ ou hiperandrogenemia	Presente	Presente	Presente	Ausente
Oligo/ anovulação crônica	Presente	Presente	Ausente	Presente
Morfologia de ovários policísticos ao US	Presente	Ausente	Presente	Presente

3.3.5. Comorbidades associadas avaliadas

Foi avaliada a presença das seguintes comorbidades: diabetes [glicemia de jejum ≥ 126 mg/dl e/ou glicemia 120 min ≥ 200 mg/ dL e/ou hemoglobina glicada (HbA1c) $\geq 6,5\%$], pré-diabetes (glicemia de jejum ≥ 100 e < 126 mg/ dL e/ou glicemia 120 min ≥ 140 a < 200 mg/ dL e/ ou HbA1c $\geq 5,7$ e $< 6,5\%$) (125), insuficiência coronariana (diagnóstico de angina ou infarto agudo do miocárdio prévios), HAS (pressão sistólica ≥ 130 mmHg ou diastólica ≥ 80 mmHg) (126), dislipidemia [Lipoproteína de baixa densidade (LDL) ≥ 160 mg/ dL e/ou TG ≥ 150 mg/ dL em jejum e/ou Lipoproteína de alta densidade (HDL) < 50 mg/ dL] (127), obesidade (IMC ≥ 30 kg/ m²) e diagnóstico prévio de hipotireoidismo.

3.3.6. Definição de resistência insulínica

A RI foi estimada utilizando-se o HOMA-IR, calculado de acordo com fórmula que se segue: $[\text{insulinemia em jejum (mU/ L)} \times \text{glicemia de jejum (mmol/ L)}] / 22,5$ (128). O valor $\geq 2,5$ foi usado como ponto de corte para definir RI (129).

3.3.7. Definição de SM e seus componentes

SM foi definida de acordo com as recomendações do *Adult Treatment Panel III Report* (130): glicemia de jejum ≥ 110 mg/ dL, TG ≥ 150 mg/ dL, HDL < 50 mg/ dL; pressão sistólica ≥ 130 mmHg ou diastólica ≥ 85 mmHg e obesidade abdominal (CC ≥ 88 cm).

3.3.8. Dados laboratoriais

Foram avaliados os seguintes exames bioquímicos e hormonais séricos após 12 horas de jejum: hemograma completo, albumina, tempo de protrombina, colesterol total e frações, TG, glicemia, insulina, HbA1c, ALT, AST, fosfatase alcalina (FA) e gama glutamil transferase (GGT), testosterona total e livre, androstenediona, SDHEA, 17-OHP, prolactina (PRL), hormônio estimulante da tireoide (TSH), LH, FSH e estradiol. As pacientes foram submetidas ao teste oral de tolerância à glicose com administração de 75 g de glicose anidra com dosagem de glicemia e insulina basal e 120 minutos após a administração da glicose.

3.3.9. Avaliação do polimorfismo do gene da PNPLA3

A fim de avaliar o polimorfismo no gene PNPLA3, foram colhidos 15 mL de sangue periférico de cada uma das pacientes para a extração do DNA genômico a partir de leucócitos e posterior avaliação do polimorfismo no gene PNPLA3 (rs738409 c.444 C>G, p. I148M) e sua genotipagem.

3.3.9.1. Extração do DNA genômico

A extração de DNA foi realizada a partir de amostras de sangue total utilizando o QIAamp DNA® Blood mini kit (Qiagen®, Hilden, Alemanha), seguindo as orientações do fabricante. O DNA foi eluído em 50 µL de tampão e armazenado a -80 °C até o momento do uso. Para a quantificação de DNA foi utilizado o equipamento Qubit (Fluorometer. Qubit® 2.0. Invitrogen a Thermo Fischer Brand, Carlsbad, CA, EUA).

3.3.9.2. Genotipagem do polimorfismo da PNPLA3 (rs738409 c.444 C>G, p. I148M)

O polimorfismo no gene PNPLA3 (rs738409) teve seu genótipo determinado em todas as amostras por equipe não ciente do quadro clínico ou enfermidade do paciente. O DNA extraído foi utilizado para a montagem das reações em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) que foram realizadas no equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Para a preparação da reação, foi utilizado o reagente TaqMan Genotyping Master Mix e TaqMan SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), que contém duas sequências de primers específicos para amplificar o polimorfismo de interesse e duas sondas alelo-específicas para detectar os alelos do polimorfismo de interesse. A presença de duas sondas em cada reação permite a genotipagem de duas possíveis variantes do SNP: a sonda do alelo 1 é marcada com o Reporter VIC, e a sonda do alelo 2 é marcada com o Reporter FAM, que apresentam fluorescências diferentes durante a reação. O assay utilizado para o SNP estudado foi o ID: C_7241_10. Controles de qualidade foram realizados para verificar a reprodutibilidade dos resultados.

3.4. Análise estatística

O processo de análise de dados da presente pesquisa iniciou-se com uma exploração descritiva. As tabelas descritivas das variáveis qualitativas incluíram a frequência absoluta e relativa, intervalo de confiança de 95% (IC95%) e nível descritivo e das quantitativas incluíram as medidas de tendência central e dispersão. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliado para a amostra em questão. A heterozigosidade e o conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) foram calculados para a amostra e entre os grupos de interesse.

Para estudar a distribuição das variáveis qualitativas nominais ou ordinais de acordo com os grupos de mulheres com esteatose, fibrose clinicamente significativa e fibrose avançada foi empregado o teste de qui-quadrado ou teste exato de Fischer, quando necessário. O teste de Mann-Whitney foi usado para a comparação da distribuição das variáveis quantitativas discretas ou contínuas entre grupos.

Diferentes modelos de regressão logística binária foram propostos para avaliar o impacto conjunto dos fatores de interesse em relação à presença de esteatose hepática, de fibrose clinicamente significativa e de fibrose avançada. A estratégia de seleção das variáveis levou em consideração o método hierárquico. A avaliação do ajuste foi realizada com teste de Hosmer-Lemeshow. Uma curva ROC foi utilizada para verificar a capacidade de predição de cada um dos modelos.

Todos os testes levaram em consideração um α bidirecional de 0.05 e IC95%, e foram realizados com apoio computacional dos softwares R (<https://www.r-project.org/>), IBM SPSS 25 (Statistical Package for the Social Sciences) e Excel 2016® (Microsoft Office).

4. Resultados

4. Resultados

Foram recrutadas 172 pacientes, sendo 7 delas excluídas por desistência e recusa em realizar exames, uma delas por se tratar de esteatose hepática associada à deficiência de alfa-1-antitripsina, e uma por evidência de hepatite medicamentosa após biópsia hepática realizada por indicação clínica, conforme descrito na Figura 4. Foram avaliadas, portanto, 163 mulheres com SOP.

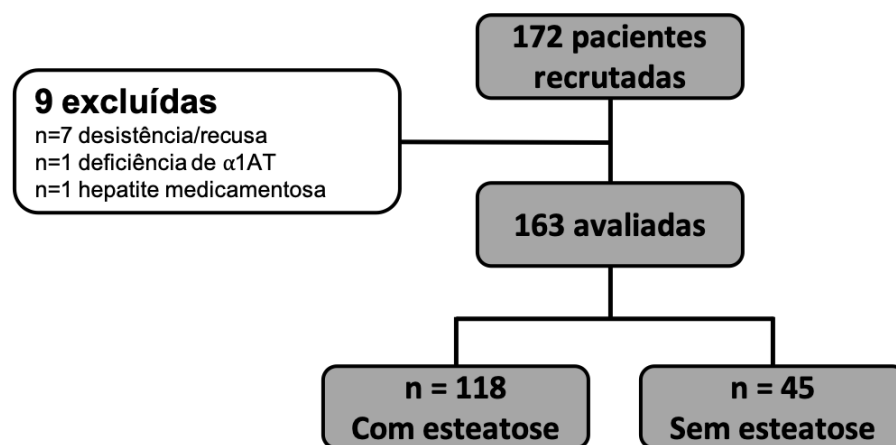


Figura 4 - Fluxograma de seleção da população estudada e sua categorização conforme presença de esteatose hepática.

4.1. Características da população estudada

Dentre as pacientes, 82 tinham até 32 anos de idade e a média de idade observada foi de 32,5 anos ($\pm 8,1$ anos), sendo a mínima de 16 anos e a máxima de 56 anos. Na Tabela 4 pode-se verificar a frequência de esteatose em 72,4% (IC95% 65,2%-78,8%) das participantes. O polimorfismo do gene PNPLA3 em heterozigose (CG) ocorreu em 41,7% (IC95 34,3%-49,4%) e em homozigose (GG) em 8,0% (IC95% 4,5%-12,9%) da população estudada.

Dentre as pacientes com esteatose hepática avaliadas com EHT por Fibroscan®, 8 (6,8%) não apresentavam esteatose hepática após mensuração do CAP. Destas, apenas uma apresentou fibrose avançada à elastografia (LSM = 11,3 kPa), enquanto as demais apresentavam fibrose leve [LSM 5,8-6,9 kPa (n = 3)] ou ausente [LSM < 5,8 kPa (n = 4)]. As pacientes com evidência de esteatose hepática pelo CAP, distribuíram-se da seguinte maneira: 22% (n = 26) com esteatose de grau leve (G1), 19,5% (n = 23) com esteatose moderada (G2) e 51,7% (n = 61) com esteatose intensa (G3). Em relação a LSM, pouco menos da metade das pacientes apresentava algum grau de fibrose, com 45,8% (n = 54) com fibrose ≥ F1 (LSM ≥ 5,8 kPa). Destas, 26 (22,0% da amostra) apresentavam valores correspondentes a fibrose grau 1 (5,8 - 6,9 kPa), 14 (11,9%) a fibrose grau 2 (7,0 - 8,6 kPa), 12 (10,2%) a fibrose grau 3 (8,7 - 11,4 kPa) e 2 (1,7%) a cirrose hepática (> 11,4 kPa) (Tabela 4).

Tabela 4 - Características relacionadas à idade, presença de esteatose hepática, presença do polimorfismo da PNPLA3 e EHT observadas entre as mulheres investigadas incluindo frequência absoluta (n), relativa (%) e intervalo de confiança de 95% (IC95%)

	n	% (IC 95%)
Idade ≤ 32 anos	82	50,3% (42,7%-57,1%)
Esteatose		
Não	45	27,6% (21,2%-34,8%)
Sim	118	72,4% (65,2%-78,8%)
Polimorfismo PNPLA3		
CC	82	50,3% (42,7%-57,9%)
CG	68	41,7% (34,3%-49,4%)
GG	13	8,0% (4,5%-12,9%)
CAP (dB/ m)*		
<231	8	6,8% (3,3%-12,4%)
231-267	26	22,0% (15,3%-30,1%)
268-300	23	19,5% (13,1%-27,3%)
>300	61	51,7% (42,7%-60,6%)
LSM (kPa)*		
<5,8	64	54,2% (45,2%-63,0%)
5,8-6,9	26	22,0% (15,3%-30,1%)
7,0-8,6	14	11,9% (7,0%-18,6%)
8,7-11,4	12	10,2% (5,7%-16,6%)
>11,4	2	1,7% (0,4%-5,3%)

*Elastografia hepática não realizada em 45 pacientes devido ausência de esteatose hepática ao ultrassom.

ABREVIATURAS: EHT, elastografia hepática transitória; CAP, parâmetro do coeficiente de atenuação; LSM, medida de rigidez hepática.

Nenhuma das pacientes apresentou nódulos compatíveis com CHC à investigação radiológica. Todas as pacientes com evidência de fibrose significativa (\geq F2) que não estavam em seguimento com hepatologista foram encaminhadas para avaliação e seguimento no Ambulatório de Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (A2MG700) da Disciplina de Gastroenterologia do HCFMUSP. As demais foram encaminhadas para seguimento com hepatologista em Ambulatório de Especialidades. Todas foram orientadas quanto à necessidade de mudança de estilo de vida.

O polimorfismo da PNPLA3 estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg entre os grupos. A heterozigosidade global da PNPLA3 na amostra em questão foi de 0,486, com PIC de 0,368. A heterozigosidade foi de 0,493 com PIC de 0,371 entre as mulheres com esteatose e de 0,458 com PIC de 0,353 nas mulheres sem esta característica. Já entre as mulheres com fibrose clinicamente significativa (\geq F2), a heterozigosidade foi de 0,484 e PIC de 0,366 vs. 0,497 e PIC de 0,373 entre as mulheres com fibrose \leq F1. Por fim, entre as mulheres com fibrose avançada (\geq F3) a heterozigosidade foi de 0,408 com PIC de 0,325 semelhante ao grupo sem fibrose avançada (\leq F2), cuja heterozigosidade foi de 0,481 com PIC de 0,365.

Em relação às características da SOP na população estudada (Tabela 5), 82,4% (IC95%: 75,9%-87,7%) das mulheres apresentaram alterações morfológicas características de OP ao US transvaginal. Hiperandrogenismo/nemia e irregularidade menstrual se apresentaram na mesma proporção na população estudada, acometendo 95,7% (IC95%: 91,8%-98,1%) dessas mulheres. O fenótipo A, que apresenta todas as características da SOP pelos critérios de Rotterdam, foi o mais comum, presente em 73,8% (IC95%: 66,6%-80,1%) das mulheres.

Tabela 5 - Características relacionadas à SOP observadas entre as mulheres investigadas incluindo frequência absoluta (n), relativa (%) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%)

	n	% (IC 95%)
US TV - Ovários policísticos		
Normal	28	17,6% (12,3%-24,1%)
Alterações morfológicas	131	82,4% (75,9%-87,7%)
Hiperandrogenismo/nemia	156	95,7% (91,8%-98,1%)
Irregularidade menstrual	156	95,7% (91,8%-98,1%)
Fenótipo SOP		
A	118	73,8% (66,6%-80,1%)
B	27	16,9% (11,7%-23,2%)
C	8	5,0% (2,4%-9,2%)
D	7	4,4% (2,0%-8,4%)

ABREVIATURAS: US TV, ultrassom transvaginal; SOP, síndrome dos ovários policísticos.

Apenas 19,8% (IC95%: 15,8%-28,4%) das pacientes apresentava perfil glicêmico normal. O perfil glicêmico caracterizado pela RI sem evidência de DM2 ou pré-diabetes foi o mais frequente, acometendo 50,0% (IC95%: 42,4%-57,6%) da população, enquanto 75,0% (IC95%: 67,9%-81,2%) das mulheres apresentaram HOMA-IR \geq 2,5. Já a prevalência de SM foi de 42,6% (IC95%: 35,2%-50,3%) (Tabela 6). A maior parte da população apresentava obesidade (IMC \geq 30 kg/ m²), com predomínio de obesidade grau 1 [26,4% (IC95%: 20,1%-33,5%)] e grau 2 [25,1% (IC95%: 19,0%-32,2%)].

Tabela 6 - Características clínicas e metabólicas observadas entre as mulheres investigadas incluindo frequência absoluta (n), relativa (%) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%)

	n	% (IC 95%)
Perfil glicêmico		
Normal	32	19,8% (14,2%-26,4%)
RI sem DM2 ou pré-diabetes	81	50,0% (42,4%-57,6%)
Pré-diabetes	28	17,3% (12,1%-23,7%)
DM2	21	13,0% (8,5%-18,8%)
Uso de metformina	55	33,7% (26,8%-41,2%)
Uso de insulina	1	0,6% (0,1%-2,8%)
Síndrome metabólica	69	42,6% (35,2%-50,3%)
HAS	30	18,4% (13,0%-24,9%)
Cirurgia bariátrica prévia	5	3,1% (1,2%-6,6%)
Hipotireoidismo	16	9,9% (6,0%-15,2%)
Tabagismo		
Ausente	146	89,6% (84,2%-93,6%)
Atual	9	5,5% (2,8%-9,8%)
Pregresso	8	4,9% (2,3%-9,0%)
HOMA-IR \geq 2,5	120	75,0% (67,9%-81,2%)
Classificação por IMC		
Normal	20	12,3% (7,9%-18,0%)
Sobrepeso	37	22,7% (16,8%-29,6%)
Obesidade grau 1	43	26,4% (20,1%-33,5%)
Obesidade grau 2	41	25,1% (19,0%-32,2%)
Obesidade grau 3	22	13,5% (8,9%-19,4%)

ABREVIATURAS: RI, resistência insulínica; DM2, *Diabetes mellitus* tipo 2; HAS, hipertensão arterial sistêmica; HOMA-IR, *Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance*; IMC, índice de massa corpórea.

A Tabela 7 apresenta as estatísticas descritivas das variáveis quantitativas ligadas ao perfil hepático avaliadas no estudo. As medidas de LSM e CAP resultaram em médias de 6,2 kPa (\pm 2,5 kPa) e 302,0 dB/m (\pm 52,0 dB/ m).

Tabela 7 - Estatísticas descritivas das variáveis quantitativas ligadas ao perfil hepático incluindo média, desvio padrão (DP), mediana, mínimo (Mín.) e máximo (Máx.)

	Média	DP	Mediana	Mín.	Máx.
NAFLD-FS	-2,9	1,4	-3,1	-5,9	2,8
FIB-4	0,5	0,2	0,5	0,2	1,5
Bilirrubina total (mg/ dL)	0,4	0,2	0,4	0,1	1,1
AST (U/ L)	20,0	9,0	18,0	10,0	58,0
ALT (U/ L)	25,0	16,0	19,0	4,0	95,0
GGT (U/ L)	30,0	22,0	23,0	7,0	141,0
Fosfatase alcalina (U/ L)	72,0	22,0	71,0	32,0	150,0
Plaquetas (mil/ mm³)	292,0	60,0	287,0	152,0	471,0
INR	1,0	0,0	1,0	0,9	1,1
Albumina (g/ dL)	4,5	0,3	4,5	3,6	5,2
Ferritina (ng/ mL)	112,6	103,4	84,0	7,0	543,0
LSM (kPa)	6,2	2,5	5,7	3,0	22,8
CAP (dB/ m)	302,0	52,0	302,0	172,0	400,0

ABREVIATURAS: NAFLD-FS, *NAFLD fibrosis score*; FIB-4, *fibrosis-4 score*; AST, aspartato aminotransferase; ALT, alanina aminotransferase; GGT, gama glutamil transferase; INR, Razão normalizada internacional; LSM, medida de rigidez hepática; CAP, parâmetro do coeficiente de atenuação.

Entre as mulheres investigadas foi observado IMC médio de 33,0 kg/ m² (\pm 6,9 kg/ m²) e uma CC média de 99,7cm (\pm 17,0 cm). O lipidograma apontou para um colesterol total médio de 182,0 mg /dL (\pm 36,0 mg/ dL), TG de 151,0 mg/ dL (\pm 98,0 mg/ dL) e HDL de 49,0 mg/ dL (\pm 12,0 mg/ dL). Em relação ao metabolismo glicídico, a insulina média observada foi de 27,2 μ U/ mL (24,5 μ U/ mL), a glicemia de jejum de 94,0 mg/ dL (\pm 35,0 mg/ dL), o HOMA-IR 6,6 (\pm 6,9) e a HbA1c de 5,7% (\pm 1,1%). Outras medidas são apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 - Estatísticas descritivas das variáveis quantitativas ligadas ao perfil etário, metabólico e hormonal incluindo média, desvio padrão (DP), mediana, mínimo (Mín.) e máximo (Máx.)

	Média	DP	Mediana	Mín.	Máx.
Idade (anos)	32,5	8,1	32,0	16,0	56,0
Peso (kg)	86,8	20,6	84,2	45,0	144,7
IMC (kg/ m ²)	33,0	6,9	32,0	18,7	53,0
Circunferência cintura (cm)	99,7	17,0	100,0	62,0	145,0
Relação cintura-quadril	0,9	0,1	0,9	0,7	1,1
Colesterol total (mg/ dL)	182,0	36,0	177,0	103,0	279,0
Triglicerídeos (mg/ dL)	151,0	98,0	123,0	41,0	585,0
HDL (mg/ dL)	49,0	12,0	49,0	22,0	80,0
LDL (mg/ dL)	107,0	30,0	106,0	39,0	185,0
Insulina (μ U/ mL)	27,2	24,5	19,1	2,4	156,6
Glicemia de jejum (mg/ dL)	94,0	35,0	89,0	56,0	392,0
HOMA-IR	6,6	6,9	4,3	0,5	44,8
HbA1c (%)	5,7	1,1	5,5	4,1	13,7
Testosterona total (ng/ dL)	59,1	37,1	53,5	12,0	285,0
Testosterona livre (ng/ dL)	36,0	24,0	33,0	1,0	119,0
Androstenediona (ng/ dL)	2,4	4,7	1,7	0,2	57,0
SDHEA (ng/ mL)	2130,0	1376,0	1938,0	57,0	8976,0

ABREVIATURAS: IMC, índice de massa corpórea; HDL, Lipoproteína de alta densidade; LDL, Lipoproteína de baixa densidade; HOMA-IR, *Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance*; HbA1c, hemoglobina glicada; SDHEA, Sulfato de dehidroepiandrosterona.

4.2. Características da população estudada conforme a presença do polimorfismo no gene da PNPLA3

Também foi proposta uma avaliação de todas as variáveis estudadas estratificadas segundo a presença do polimorfismo de PNPLA3. Nenhuma variável qualitativa associou-se significativamente com a presença do polimorfismo. A Tabela 9 apresenta as variáveis qualitativas ligadas ao perfil hepático estratificadas de acordo

com a presença do polimorfismo. A estratificação das variáveis qualitativas metabólicas e hormonais de acordo com a presença do polimorfismo pode ser vista no Anexo 3.

Tabela 9 - Fatores qualitativos ligados ao perfil hepático estratificados de acordo com o polimorfismo da PNPLA3 incluindo frequência absoluta (n), relativa (%) intervalo de confiança de 95% (IC95%) e nível descritivo (p-valor)

		PNPLA3				p-valor
		CC (n = 82)		CG/GG (n = 81)		
		n	% (IC95%)	n	% (IC95%)	
Esteatose hepática						
	Não	27	32,9% (23,5%-43,6%)	18	22,2% (14,2%-32,1%)	0,161
	Sim	55	67,1% (56,4%-76,5%)	63	77,8% (67,9%-85,8%)	
CAP (dB/ m)*						
	< 231	2	3,6% (0,8%-11,2%)	6	9,5% (4,1%-18,6%)	0,176
	231-267	12	21,8% (12,5%-34,0%)	14	22,2% (13,3%-33,6%)	
	268-300	15	27,3% (16,9%-40,0%)	8	12,7% (6,2%-22,5%)	
	> 300	26	47,3% (33,5%-59,5%)	35	55,6% (43,3%-67,3%)	
LSM (kPa)*						
	< 5,8	31	56,4% (43,2%-68,9%)	33	52,4% (40,2%-64,4%)	0,684
	5,8-6,9	13	23,6% (13,9%-36,0%)	13	20,6% (12,1%-31,8%)	
	7,0-8,6	7	12,7% (5,9%-23,4%)	7	11,1% (5,1%-20,6%)	
	8,7-11,4	4	7,4% (2,6%-16,7%)	8	12,7% (6,2%-22,5%)	
	> 11,4	0	-	2	3,2% (0,7%-9,8%)	

Valor p baseado no teste exato de Fischer.

*Elastografia hepática não realizada em 45 pacientes devido ausência de esteatose hepática ao ultrassom.

ABREVIATURAS: CAP, parâmetro do coeficiente de atenuação; LSM, medida de rigidez hepática.

A Tabela 10 descreve as variáveis quantitativas ligadas ao perfil hepático de acordo com a presença do polimorfismo. Embora as médias de FIB-4 sejam semelhantes entre os grupos, a mediana foi maior no grupo CG/GG ($p=0,039$).

Tabela 10 - Fatores quantitativos ligados ao perfil hepático estratificados de acordo com o polimorfismo de PNPLA3 incluindo média, desvio padrão (\pm DP), mediana, intervalo interquartil (IQR) e nível descritivo (p -valor)

	PNPLA3				p-Valor
	CC (n = 82)		CG/GG (n = 81)		
	Média (±DP)	Mediana (IQR)	Média (±DP)	Mediana (IQR)	
NAFLD-FS	-3,0 (±1,3)	-3,1 (-3,8--2,3)	-2,8 (±1,4)	-3,1 (-3,7--2,0)	0,270
FIB-4	0,5 (±0,2)	0,4 (0,3-0,6)	0,5 (±0,2)	0,5 (0,4-0,6)	0,039*
Bilirrubina total (mg/ dL)	0,4 (±0,2)	0,4 (0,3-0,5)	0,4 (±0,2)	0,4 (0,3-0,5)	0,186
AST (U /L)	18,0 (±5,0)	17,0 (15,0-21,0)	22,0 (±11,0)	19,0 (16,0-23,0)	0,056
ALT (U/ L)	21,0 (±10,0)	18,0 (14,0-27,0)	28,0 (±20,0)	21,0 (15,0-33,0)	0,052
GGT (U/ L)	29,0 (±21,0)	20,0 (16,0-37,0)	31,0 (±23,0)	24,0 (16,0-37,0)	0,371
Fosfatase alcalina (U/ L)	71,0 (±20,0)	71,0 (59,0-80,0)	73,0 (±24,0)	70,0 (58,0-84,0)	0,947
Plaquetas (mil/ mm ³)	298,0 (±55,0)	295,0 (261,0-337,0)	285,0 (±64,0)	276,0 (237,0-314,0)	0,083
INR	1,0 (±0,0)	1,0 (1,0-1,0)	1,0 (±0,0)	1,0 (1,0-1,0)	0,149
Albumina (g/ dL)	4,5 (±0,3)	4,5 (4,2-4,7)	4,5 (±0,3)	4,5 (4,2-4,7)	0,909
Ferritina (ng/ mL)	110,1 (±106,9)	69,5 (46,0-134,0)	114,9 (±100,6)	88,0 (38,0-152,0)	0,492
LSM (kPa)	5,7 (±1,6)	5,5 (4,5-6,7)	6,7 (±3,1)	5,7 (4,9-7,3)	0,092
CAP (dB/ m)	303.0 (±51.0)	295.0 (265.0-346.0)	302.0 (±54.0)	307.0 (258.0-344.0)	0,981

Valores de p baseado no Teste U de Mann-Whitney. * $p<0,05$

ABREVIATURAS: NAFLD-FS, *NAFLD fibrosis score*; FIB-4, *fibrosis-4 score*; AST, aspartato aminotransferase; ALT, alanina aminotransferase; GGT, gama glutamil transferase; INR, Razão normalizada internacional; LSM, medida de rigidez hepática; CAP, parâmetro do coeficiente de atenuação.

Na Tabela 11, é demonstrada uma diferença estatisticamente significativa de idade entre os grupos, com as pacientes portadoras do polimorfismo apresentando média de idade 3 anos maior ($p = 0,044$). As variáveis testosterona total ($p = 0,041$) e testosterona livre ($p = 0,031$) apresentaram valores estatisticamente menores nos indivíduos com variante CG/GG.

Tabela 11 - Fatores quantitativos etário, metabólicos e hormonais estratificados de acordo com o polimorfismo de PNPLA3 incluindo média, desvio padrão (\pm DP), mediana, intervalo interquartil (IQR) e nível descritivo (p-valor)

	PNPLA3				p-Valor
	CC (n = 82)		CG/GG (n = 81)		
	Média (± DP)	Mediana (IQR)	Média (± DP)	Mediana (IQR)	
Idade (anos)	31,0 (± 8,0)	30,0 (25,0-37,0)	34,0 (± 8,0)	34,0 (28,0-38,0)	0,044*
Peso (kg)	86,9 (± 21,5)	83,1 (71,7-98,8)	86,8 (± 19,7)	84,9 (69,9-101,0)	0,979
IMC (kg/ m²)	33,1 (± 7,1)	33,1 (28,7-36,8)	32,8 (± 6,8)	32,0 (27,5-37,6)	0,911
Circunferência cintura (cm)	99,9 (± 17,2)	100,0 (87,0-110,0)	99,6 (± 16,9)	100,0 (85,0-112,0)	0,914
Relação cintura-quadril	0,9 (± 0,1)	0,9 (0,8-1,0)	0,9 (± 0,1)	0,9 (0,8-0,9)	0,372
Colesterol total (mg/ dL)	186,0 (± 35,0)	185,0 (161,0-207,0)	178,0 (± 36,0)	175,0 (153,0-192,0)	0,093
Triglicerídeos (mg/ dL)	162,0 (± 114,0)	124,0 (91,0-199,0)	140,0 (± 76,0)	123,0 (85,0-180,0)	0,530
HDL (mg/ dL)	47,0 (± 13,0)	45,0 (39,0-55,0)	50,0 (± 12,0)	49,0 (41,0-57,0)	0,167
LDL (mg/ dL)	110,0 (± 28,0)	111,0 (92,0-131,0)	104,0 (± 31,0)	104,0 (83,0-118,0)	0,093
Insulina (µU/ mL)	25,3 (± 20,0)	18,6 (12,5-35,9)	29,1 (± 28,4)	19,8 (12,3-37,6)	0,686
Glicemia de jejum (mg/ dL)	91,0 (± 16,0)	89,0 (81,0-99,0)	97,0 (± 46,0)	89,0 (81,0-96,0)	0,596
HOMA-IR	5,9 (± 5,3)	4,2 (2,8-6,8)	7,3 (± 8,2)	4,3 (2,5-8,3)	0,603
HbA1c (%)	5,6 (± 0,8)	5,5 (5,2-5,8)	5,7 (± 1,4)	5,5 (5,1-5,7)	0,537
Testosterona total (ng/ dL)	63,0 (± 33,1)	62,5 (40,0-78,0)	55,0 (± 40,7)	49,0 (30,0-65,0)	0,021*
Testosterona livre (ng/ dL)	40,0 (± 25,0)	38,0 (23,0-52,0)	32,0 (± 22,0)	30,0 (17,0-44,0)	0,032*
Androstenediona (ng/ dL)	2,7 (± 6,3)	1,8 (1,1-2,5)	2,0 (± 1,6)	1,5 (1,0-2,6)	0,619
SDHEA (ng/ mL)	2189,0 (± 1305,0)	2070,0 (1214,0-2852,0)	2067,0 (± 1453,0)	1815,0 (1030,0-2660,0)	0,386

Valores de p baseado no Teste U de Mann-Whitney. *p<0,05

ABREVIATURAS: IMC, índice de massa corpórea; HDL, Lipoproteína de alta densidade; LDL, Lipoproteína de baixa densidade; HOMA-IR, *Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance*; HbA1c, hemoglobina glicada; SDHEA, Sulfato de dehidroepiandrosterona.

4.3. Características da população estudada conforme a presença de esteatose hepática

Na Tabela 12 é possível verificar quais variáveis qualitativas foram associadas à presença ou ausência de esteatose hepática. A esteatose foi mais frequente nas mulheres com alterações morfológicas ovarianas ao US ($p = 0,035$), com alterações do perfil glicêmico ($p < 0,001$), com SM ($p < 0,001$), com HOMA-IR $\geq 2,5$ ($p < 0,001$), hipertensas ($p < 0,001$), em uso de metformina ($p = 0,001$) e com diferentes graus de obesidade ($p < 0,001$).

Tabela 12 - Fatores qualitativos estratificados segundo presença e ausência de esteatose hepática incluindo frequência absoluta (n), relativa (%), intervalo de confiança de 95% (IC95%) e nível descritivo

ESTEATOSE HEPÁTICA						
		Não (n = 45)		Sim (n =118)		p-valor
		n	% (IC95%)	n	% (IC95%)	
Polimorfismo PNPLA3						
	CC	27	60,0% (45,4%-73,3%)	55	46,6% (37,8%-55,6%)	0,315
	CG	16	35,6% (22,8%-50,1%)	52	44,1% (35,3%-53,1%)	
	GG	2	4,4% (0,9%-13,5%)	11	9,3% (5,1%-15,6%)	
US TV - Ovários policísticos						
	Normal	3	6,8% (2,0%-17,1%)	25	21,7% (15,0%-29,9%)	0,035*
	Alterações morfológicas ao US	41	93,2% (82,9%-98,0%)	90	78,3% (70,1%-85,0%)	
Hiperandrogenismo/nemia						
	Não	3	6,7% (1,9%-16,7%)	4	3,4% (1,2%-7,9%)	0,396
	Sim	42	93,3% (83,3%-98,1%)	114	96,6% (92,1%-98,8%)	
Irregularidade menstrual						
	Não	1	2,2% (0,2%-9,9%)	6	5,1% (2,1%-10,2%)	0,675
	Sim	44	97,8% (90,1%-99,8%)	112	94,9% (89,8%-97,9%)	
Fenótipo SOP						
	A	37	84,1% (71,3%-92,6%)	81	69,8% (61,1%-77,6%)	0,079
	B	3	6,8% (2,0%-17,1%)	24	20,7% (14,1%-28,7%)	
	C	1	2,3% (0,2%-10,1%)	7	6,0% (2,7%-11,5%)	
	D	3	6,8% (2,0%-17,1%)	4	3,4% (1,2%-8,0%)	
Perfil glicêmico						
	Normal	22	50,0% (35,6%-64,4%)	10	8,5% (4,4%-14,5%)	<0,001*
	RI sem DM2 ou pré-diabetes	19	43,2% (29,4%-57,9%)	62	52,5% (43,6%-61,4%)	
	DM2	1	2,3% (0,2%-10,1%)	20	17,0% (11,0%-24,5%)	
	Pré-diabetes	2	4,5% (1,0%-13,8%)	26	22,0% (15,3%-30,1%)	
Uso de metformina						
	Não	39	86,7% (74,6%-94,2%)	69	58,5% (49,5%-67,1%)	0,001*
	Sim	6	13,3% (5,8%-25,4%)	49	41,5% (32,9%-50,5%)	
Síndrome metabólica						
	Não	39	86,7% (74,6%-94,2%)	54	46,2% (37,3%-55,2%)	<0,001*
	Sim	6	13,3% (5,8%-25,4%)	63	53,8% (44,8%-62,7%)	
HAS						
	Não	44	97,8% (90,1%-99,8%)	89	75,4% (67,1%-82,5%)	<0,001*
	Sim	1	2,2% (0,2%-9,9%)	29	24,6% (17,5%-32,9%)	
Tabagismo						
	Ausente	42	93,3% (83,3%-98,1%)	104	88,1% (81,4%-93,0%)	0,567
	Atual	1	2,2% (0,2%-9,9%)	8	6,8% (3,3%-12,4%)	
	Pregresso	2	4,4% (0,9%-13,5%)	6	5,1% (2,1%-10,2%)	
HOMA-IR ≥ 2,5						
	Não	25	58,1% (43,4%-72,0%)	15	12,8% (7,7%-19,8%)	<0,001*
	Sim	18	41,9% (28,0%-56,7%)	102	87,2% (80,2%-92,3%)	
Classificação por IMC						
	Normal	16	35,6% (22,8%-50,1%)	4	3,4% (1,2%-7,9%)	<0,001*
	Sobrepeso	12	26,7% (15,5%-40,7%)	25	21,2% (14,6%-29,2%)	
	Obesidade grau 1	7	15,6% (7,2%-28,1%)	36	30,5% (22,7%-39,2%)	
	Obesidade grau 2	7	15,6% (7,2%-28,1%)	34	28,8% (21,2%-37,4%)	
	Obesidade grau 3	3	6,7% (1,9%-16,7%)	19	16,1% (10,3%-23,5%)	

Valores de p baseado no teste exato de Fischer. *p<0,05

ABREVIATURAS: US TV, ultrassom transvaginal; SOP, síndrome dos ovários policísticos; RI, resistência insulínica; DM2, *diabetes mellitus* tipo 2; HAS, hipertensão arterial sistêmica; HOMA-IR, Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance; IMC, índice de massa corpórea.

Em relação às variáveis quantitativas ligadas ao perfil hepático com maiores valores nas mulheres com esteatose hepática, destacaram-se as seguintes: AST (p =

0,026), ALT ($p < 0,001$), Gama GT ($p < 0,001$) e ferritina ($p = 0,009$) (Tabela 13). É importante salientar que apenas 21,6% ($n = 26$) das pacientes com DHGNA apresentaram transaminases elevadas, considerando-se os valores de referência de 10 a 36 U/ L para mulheres, enquanto 35,8% ($n = 43$) apresentaram GGT alterada (valor de referência 7-32 U/ L).

Tabela 13 - Fatores quantitativos ligados ao perfil hepático estratificados segundo presença e ausência de esteatose hepática incluindo média, desvio padrão (\pm DP), mediana, intervalo interquartil (IQR) e nível descritivo (p-valor)

	ESTEATOSE HEPÁTICA				p-Valor
	Não (n = 45)		Sim (n = 118)		
	Média (± DP)	Mediana (IQR)	Média (±DP)	Mediana (IQR)	
Bilirrubina total (mg/ dL)	0,4(± 0,1)	0,3(0,3-0,5)	0,4(± 0,2)	0,4(0,3-0,5)	0,094
AST (U/ L)	17,0(± 4,0)	16,0(15,0-21,0)	21,0(± 10,0)	18,0(15,0-22,0)	0,026*
ALT (U/ L)	17,0(± 7,0)	15,0(12,0-21,0)	27,0(± 18,0)	22,0(16,0-33,0)	<0,001*
GGT (U/ L)	21,0(± 17,0)	16,0(12,0-24,0)	33,0(± 22,0)	25,0(19,0-40,0)	<0,001*
Fosfatase alcalina (U /L)	70,0(± 19,0)	66,0(58,0-77,0)	73,0(± 22,0)	72,0(59,0-84,0)	0,501
Plaquetas (mil/ mm³)	294,0(± 61,0)	291,0(255,0-322,0)	291,0(± 59,0)	286,0(247,0-336,0)	0,832
INR	1,0(± 0,0)	1,0(1,0-1,0)	1,0(± 0,0)	1,0(1,0-1,0)	0,703
Albumina (g/ dL)	4,4(± 0,4)	4,5(4,2-4,7)	4,5(± 0,3)	4,5(4,3-4,7)	0,599
Ferritina (ng/ mL)	82,0(± 90,6)	57,0(34,5-94,0)	123,6(± 105,9)	101,0(45,0-166,0)	0,009*

Valores de p baseado no Teste U de Mann-Whitney. * $p < 0,05$

ABREVIATURAS: AST, aspartato aminotransferase; ALT, alanina aminotransferase; GGT, gama glutamil transferase; INR, Razão normalizada internacional.

O grupo das mulheres com esteatose apresentou idade média 5 anos superior ($p = 0,002$) àquele sem esteatose. Entre as mulheres com esteatose hepática os valores médios e medianos do peso ($p < 0,001$), IMC ($p < 0,001$), circunferência de cintura ($p < 0,001$), relação cintura-quadril ($p < 0,001$), colesterol total ($p = 0,049$), triglicerídeos ($p < 0,001$), LDL ($p < 0,017$), insulina ($p < 0,001$), glicemia de jejum ($p < 0,001$), HOMA-IR ($p < 0,001$) e HbA1c ($p < 0,001$) foram significativamente maiores. Apenas os níveis de HDL ($p < 0,001$) foram menores entre os indivíduos com esteatose. As medidas de testosterona total e livre, androstenediona e SDHEA não foram estatisticamente distintas entre os grupos (Tabela 14).

Tabela 14 - Fatores quantitativos etário, metabólicos e hormonais estratificados segundo presença e ausência de esteatose hepática incluindo média, desvio padrão (\pm DP), mediana, intervalo interquartil (IQR) e nível descritivo (p-valor)

	ESTEATOSE HEPÁTICA				p-Valor
	Não (n = 45)		Sim (n = 118)		
	Média (± DP)	Mediana (IQR)	Média (± DP)	Mediana (IQR)	
Idade (anos)	29,0(± 8,0)	28,0(23,0-34,0)	34,0(± 8,0)	34,0(28,0-39,0)	0,002*
Peso (kg)	74,9(± 19,2)	67,5(61,8-90,5)	91,4(± 19,2)	87,5(77,4-102,8)	<0,001*
IMC (kg/ m²)	29,1(± 7,0)	26,8(24,2-34,8)	34,4(± 6,4)	33,5(30,0-38,0)	<0,001*
Circunferência cintura (cm)	87,8(± 16,9)	80,0(75,0-101,0)	104,3(± 14,8)	101,5(94,0-115,0)	<0,001*
Relação cintura-quadril	0,8(± 0,1)	0,8(0,8-0,9)	0,9(± 0,1)	0,9(0,9-1,0)	<0,001*
Colesterol total (mg/ dL)	173,0(± 28,0)	170,0(155,0-186,0)	185,0(± 38,0)	185,0(158,0-208,0)	0,049*
Triglicerídeos (mg/ dL)	98,0(± 52,0)	81,0(57,0-134,0)	171,0(± 104,0)	137,0(102,0-204,0)	<0,001*
HDL (mg/ dL)	56,0(± 12,0)	56,0(49,0-66,0)	46,0(± 11,0)	45,0(37,0-51,0)	<0,001*
LDL (mg/ dL)	98,0(± 26,0)	97,0(78,0-115,0)	111,0(± 31,0)	110,0(91,0-134,0)	0,017*
Insulina (µU/ mL)	16,6(± 13,9)	11,2(7,9-18,6)	31,0(± 26,4)	22,8(15,8-39,1)	<0,001*
Glicemia de jejum (mg/ dL)	85,0(± 11,0)	87,0(78,0-92,0)	97,0(± 40,0)	90,0(82,0-98,0)	0,009*
HOMA-IR	3,6(± 3,3)	2,3(1,5-3,9)	7,7(± 7,6)	5,0(3,4-8,7)	<0,001*
HbA1c (%)	5,3(± 0,3)	5,3(5,0-5,5)	5,8(± 1,3)	5,6(5,2-5,9)	0,001*
Testosterona total (ng/ dL)	56,0(± 28,3)	51,0(35,0-72,0)	60,2(± 40,1)	57,0(32,0-73,0)	0,755
Testosterona livre (ng/ dL)	31,0(± 24,0)	28,0(13,0-41,0)	37,0(± 23,0)	34,0(21,0-48,0)	0,086
Androstenediona (ng/ dL)	3,2(± 8,6)	1,7(1,0-2,4)	2,1(± 1,5)	1,7(1,2-2,7)	0,507
SDHEA (ng/ mL)	2369,0 (±1275,0)	2349,0 (1460,0-3240,0)	2039,0 (±1407,0)	1720,0 (1061,0-2550,0)	0,052

Valores de p baseado no Teste U de Mann-Whitney. *p<0,05

ABREVIATURAS: IMC, índice de massa corpórea; HDL, Lipoproteína de alta densidade; LDL, Lipoproteína de baixa densidade; HOMA-IR, *Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance*; HbA1c, hemoglobina glicada; SDHEA, Sulfato de dehidroepiandrosterona.

4.4. Modelo para predição de esteatose hepática na população estudada

Um modelo de regressão logística foi ajustado para avaliar o efeito conjunto dos diferentes fatores na predição da esteatose hepática (Tabela 15). Enquanto fator único, o polimorfismo no gene da PNPLA3 não apresentou associação estatisticamente significativa ($p = 0,471$) com a ocorrência de esteatose hepática. Idade superior a 32 anos ($OR = 3,833$, $p = 0,007$) e valores de $HOMA \geq 2,5$ ($OR = 4,313$, $p = 0,022$) foram associados à maior frequência do desfecho. A interação do polimorfismo da PNPLA3 C>G com valores de $HOMA-IR \geq 2,5$ resultou em $OR = 12,198$ ($p = 0,017$). Valores de $HDL \geq 50$ mg/ dL ($OR = 0,237$, $p = 0,004$), associaram-se com a ausência de esteatose hepática. O modelo proposto apresentou boa acurácia com AUC de 0,870 (IC95%: 0,807-0,932), com significância estatística $p <$

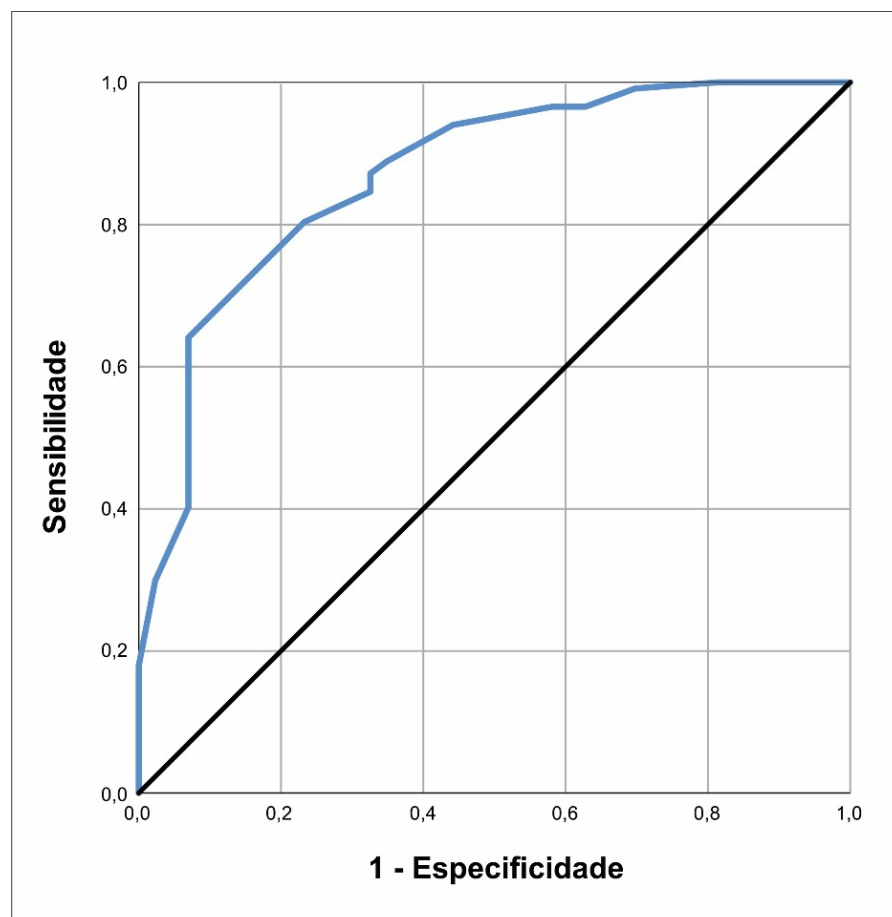
0,001 (Figura 5). Um resumo das relações existentes entre as variáveis estudadas no modelo está apresentado no Anexo 4.

Tabela 15 - Estimativas de odds ratio incluindo beta, erro padrão, nível descritivo (p-valor) e intervalo de confiança (IC95%) para predição de esteatose hepática

	B	Erro padrão	p-valor	Odds Ratio	OR - IC95%	
					Inferior	Superior
Idade > 32 anos	1.344	0,495	0,007*	3,833	1,454	10,106
Polimorfismo CG/GG	-0,564	0,782	0,471	0,569	0,123	2,632
HDL \geq 50 mg/dL	-1.440	0,476	0,003*	0,237	0,093	0,603
HOMA-IR \geq 2,5	1.462	0,639	0,022*	4,313	1,234	15,075
Polimorfismo CG/GG * HOMA-IR	2.501	1.049	0,017*	12,198	1,562	95,243

*p < 0,05

ABREVIATURAS: HDL, Lipoproteína de alta densidade; HOMA-IR, *Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance*.



AUC = 0,870 (IC95% 0,807-0,932), p < 0,001

Figura 5 - Curva ROC do modelo para predição de esteatose hepática incluindo área sob a curva (AUC), intervalo de confiança de 95% (IC95%) e nível descritivo (p-valor).

4.5. Características da população estudada conforme a presença de fibrose clinicamente significativa

Foram analisadas as variáveis associadas à presença de fibrose clinicamente significativa. No Anexo 5 pode ser visualizada a estratificação das variáveis qualitativas ligadas às características da SOP de acordo com a presença de fibrose clinicamente significativa (\geq F2), não sendo observada associação de nenhuma destas variáveis com o desfecho.

Em relação às demais variáveis qualitativas estratificadas na Tabela 16, observou-se nas mulheres com fibrose clinicamente significativa (\geq F2) uma maior frequência da SM ($p = 0,027$). O mesmo foi demonstrado em relação à classificação do IMC ($p = 0,044$), com predomínio de pacientes com obesidade grau 2 e 3 no grupo com fibrose clinicamente significativa.

Tabela 16 - Fatores qualitativos estratificados de acordo com a presença de fibrose clinicamente significativa incluindo frequência absoluta (n), relativa (%) intervalo de confiança de 95% (IC95%) e nível descritivo (p-valor)

		FIBROSE (EHT))				p-valor
		F0/F1 (n = 90)		≥ F2 (n = 28)		
		n	% (IC95%)	n	% (IC95%)	
Polimorfismo CG/GG						
	CC	44	48,9% (38,7%-59,1%)	11	39,3% (23,0%-57,7%)	0,567
	CG	37	41,1% (31,4%-51,4%)	15	53,6% (35,5%-70,9%)	
	GG	9	10,0% (5,1%-17,5%)	2	7,1% (1,5%-21,0%)	
CAP (dB/m)						
	< 231	7	7,8% (3,5%-14,7%)	1	3,6% (0,4%-15,5%)	0,066
	231-267	24	26,7% (18,4%-36,4%)	2	7,1% (1,5%-21,0%)	
	268-300	18	20,0% (12,8%-29,1%)	5	17,9% (7,2%-34,8%)	
	> 300	41	45,6% (35,5%-55,8%)	20	71,4% (53,2%-85,5%)	
Perfil glicêmico						
	Normal	9	10,0% (5,1%-17,5%)	1	3,6% (0,4%-15,5%)	0,415
RI sem DM2 ou pré-diabetes		49	54,4% (44,2%-64,5%)	13	46,4% (29,1%-64,5%)	
	DM2	15	16,7% (10,1%-25,4%)	5	17,9% (7,2%-34,8%)	
	Pré-diabetes	17	18,9% (11,9%-27,9%)	9	32,1% (17,2%-50,5%)	
HOMA-IR ≥ 2,5						
	Não	13	14,6% (8,4%-23,0%)	2	7,1% (1,5%-21,0%)	0,517
	Sim	76	85,4% (77,0%-91,6%)	26	92,9% (79,0%-98,5%)	
Uso de metformina						
	Não	57	63,3% (53,1%-72,7%)	12	42,9% (26,0%-61,1%)	0,078
	Sim	33	36,7% (27,3%-46,9%)	16	57,1% (38,9%-74,0%)	
Síndrome metabólica						
	Não	47	52,2% (42,0%-62,3%)	7	25,9% (12,4%-44,3%)	0,027*
	Sim	43	47,8% (37,7%-58,0%)	20	74,1% (55,7%-87,6%)	
Classificação por IMC						
	Normal	4	4,4% (1,5%-10,2%)	0	0,0%	0,044*
	Sobrepeso	22	24,4% (16,5%-34,0%)	3	10,7% (3,1%-25,9%)	
	Obesidade grau 1	30	33,3% (24,2%-43,5%)	6	21,4% (9,5%-38,9%)	
	Obesidade grau 2	24	26,7% (18,4%-36,4%)	10	35,7% (20,1%-54,2%)	
	Obesidade grau 3	10	11,1% (5,9%-18,8%)	9	32,1% (17,2%-50,5%)	
HAS						
	Não	70	77,8% (68,4%-85,4%)	19	67,9% (49,5%-82,8%)	0,319
	Sim	20	22,2% (14,6%-31,6%)	9	32,1% (17,2%-50,5%)	
Hipotireoidismo						
	Não	80	88,9% (81,2%-94,1%)	24	88,9% (73,2%-96,8%)	1,000
	Sim	10	11,1% (5,9%-18,8%)	3	11,1% (3,2%-26,8%)	
Tabagismo						
	Ausente	80	88,9% (81,2%-94,1%)	24	85,7% (69,5%-95,0%)	0,237
	Atual	7	7,8% (3,5%-14,7%)	1	3,6% (0,4%-15,5%)	
	Pregresso	3	3,3% (0,9%-8,6%)	3	10,7% (3,1%-25,9%)	

Valor de p baseado no teste exato de Fischer. *p < 0,05

Abreviaturas: EHT, elastografia hepática transitória; CAP, parâmetro do coeficiente de atenuação; RI, resistência insulínica; HOMA-IR, Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance; DM2, *diabetes mellitus* tipo 2; IMC, índice de massa corpórea; HAS, hipertensão arterial sistêmica.

Dentre as variáveis quantitativas ligadas ao perfil hepático, ALT e CAP foram superiores no grupo com fibrose ≥ F2, com valores de p = 0,018 e p = 0,049, respectivamente (Tabela 17).

Tabela 17 - Fatores quantitativos ligados ao perfil hepático estratificados de acordo com a presença de fibrose clinicamente significativa incluindo média, desvio padrão (\pm DP), mediana, intervalo interquartil (IQR) e nível descritivo (p-valor)

	FIBROSE (EHT)				p-valor
	F0/F1 (n = 90)		≥ F2 (n = 28)		
	Média (±DP)	Mediana (IQR)	Média (±DP)	Mediana (IQR)	
NAFLD-FS	-2,8(±1,3)	-3,1(-3,7--2,2)	-2,4(±1,6)	-2,7(-3,4--1,3)	0,163
FIB-4	0,5(±0,2)	0,5(0,4-0,6)	0,5(±0,3)	0,5(0,3-0,6)	0,928
Bilirrubina total (mg/ dL)	0,4(±0,2)	0,4(0,3-0,5)	0,4(±0,2)	0,4(0,3-0,5)	0,997
AST (U/ L)	20,0(±9,0)	18,0(15,0-21,0)	24,0(±11,0)	21,0(16,0-27,0)	0,060
ALT (U/ L)	26,0(±17,0)	20,0(16,0-28,0)	33,0(±18,0)	31,0(19,0-39,0)	0,018*
GGT (U/ L)	34,0(±24,0)	25,0(19,0-40,0)	31,0(±14,0)	28,0(20,0-40,0)	0,787
Fosfatase alcalina (U/ L)	73,0(±23,0)	71,0(59,0-82,0)	74,0(±21,0)	80,0(63,0-87,0)	0,352
Plaquetas (mil /mm³)	290,0(±56,0)	286,0(253,0-334,0)	292,0(±69,0)	286,0(230,0-343,0)	0,863
INR	1,0(±0,0)	1,0(1,0-1,0)	1,0(±0,1)	1,0(1,0-1,1)	0,088
Albumina (g/ dL)	4,5(±0,3)	4,5(4,3-4,7)	4,5(±0,3)	4,5(4,2-4,7)	0,744
Ferritina (ng/ mL)	115,1(±99,8)	96,0(45,0-150,0)	154,4(±122,7)	132,5(49,0-206,0)	0,150
CAP (dB/ m)	298,0(±53,0)	292,0(259,0-342,0)	319,0(±44,0)	321,0(291,0-352,0)	0,049*

Valores de p baseado no Teste U de Mann-Whitney. *p < 0,05

ABREVIATURAS: EHT, elastografia hepática transitória; NAFLD-FS, *NAFLD fibrosis score*; FIB-4, *fibrosis-4 score*; AST, aspartato aminotransferase; ALT, alanina aminotransferase; GGT, gama glutamil transferase; INR, Razão normalizada internacional; CAP, parâmetro do coeficiente de atenuação.

Considerando os fatores quantitativos metabólicos e hormonais, apresentaram valores mais acentuados no grupo \geq F2 com diferença estatisticamente significativa o peso (p < 0,001), IMC (p = 0,002), CC (p < 0,001) e RCQ (p = 0,005) (Tabela 18). As variáveis relacionadas ao metabolismo glicêmico como a insulina (p = 0,016) e o HOMA-IR (p = 0,023) apresentaram também medidas mais acentuadas no grupo \geq F2 em relação a F0/ F1, com significância estatística.

Tabela 18 - Fatores quantitativos metabólicos e hormonais estratificados de acordo com a presença de fibrose clinicamente significativa incluindo média, desvio padrão (\pm DP), mediana, intervalo interquartil (IQR) e nível descritivo (p-valor)

	FIBROSE (EHT)				p-valor
	F0/F1 (n = 90)		≥F2 (n = 28)		
	Média (±DP)	Mediana (IQR)	Média (±DP)	Mediana (IQR)	
Idade (anos)	34,0(±8,0)	34,0(28,0-39,0)	34,0(±9,0)	34,0(28,0-40,0)	0,832
Peso (kg)	87,5(±17,0)	84,1(74,3-101,0)	103,9(±21,1)	101,5(87,5-119,3)	<0,001*
IMC (kg/ m²)	33,3(±5,6)	32,6(29,0-36,8)	38,0(±7,2)	37,8(32,0-41,8)	0,002*
Circunferência cintura (cm)	101,5(±14,0)	99,0(92,0-110,0)	113,2(±13,9)	112,0(101,0-122,5)	<0,001*
Relação cintura-quadril	0,9(±0,1)	0,9(0,9-1,0)	0,9(±0,1)	0,9(0,9-1,0)	0,005*
Colesterol total (mg/ dL)	185,0(±37,0)	186,0(161,0-208,0)	187,0(±43,0)	171,0(154,0-205,0)	0,747
Triglicerídeos (mg/ dL)	167,0(±100,0)	132,0(99,0-204,0)	184,0(±114,0)	145,0(119,0-209,0)	0,366
HDL (mg/ dL)	47,0(±11,0)	47,0(39,0-53,0)	42,0(±11,0)	41,0(34,0-50,0)	0,052
LDL (mg/ dL)	110,0(±31,0)	111,0(91,0-135,0)	113,0(±30,0)	106,0(90,0-131,0)	0,967
Insulina (µU/ mL)	29,2(±26,7)	19,8(14,6-38,0)	36,7(±25,0)	30,1(20,7-43,7)	0,016*
Glicemia de jejum (mg/ dL)	96,0(±38,0)	89,0(82,0-98,0)	102,0(±45,0)	96,0(81,0-104,0)	0,409
HOMA-IR	7,0(±7,3)	4,5(3,2-7,8)	9,7(±8,3)	6,8(4,6-11,2)	0,023*
HbA1c (%)	5,7(±1,2)	5,5(5,2-5,8)	6,1(±1,5)	5,7(5,3-6,3)	0,070
Testosterona total (ng/ dL)	61,9(±42,4)	57,0(34,0-73,0)	55,0(±31,7)	50,5(30,5-70,5)	0,510
Testosterona livre (ng/ dL)	39,0(±25,0)	38,0(24,0-49,0)	33,0(±19,0)	33,0(18,0-43,0)	0,315
Androstenediona (ng/ dL)	2,0(±1,3)	1,7(1,2-2,5)	2,2(±1,8)	1,7(1,1-2,9)	0,765
SDHEA (ng/ mL)	2098,0 (± 1252,0)	1875,0 (1189,0-2655,0)	1856,0 (±1822,0)	1162,0 (757,0-2460,0)	0,053

Valores de p baseado no Teste U de Mann-Whitney. *p < 0,05

ABREVIATURAS: EHT, elastografia hepática transitória; IMC, índice de massa corpórea; HDL, Lipoproteína de alta densidade; LDL, Lipoproteína de baixa densidade; HOMA-IR, *Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance*; HbA1c, hemoglobina glicada; SDHEA, Sulfato de dehidroepiandrosterona.

4.6. Modelo para predição de fibrose clinicamente significativa nas mulheres com DHGNA

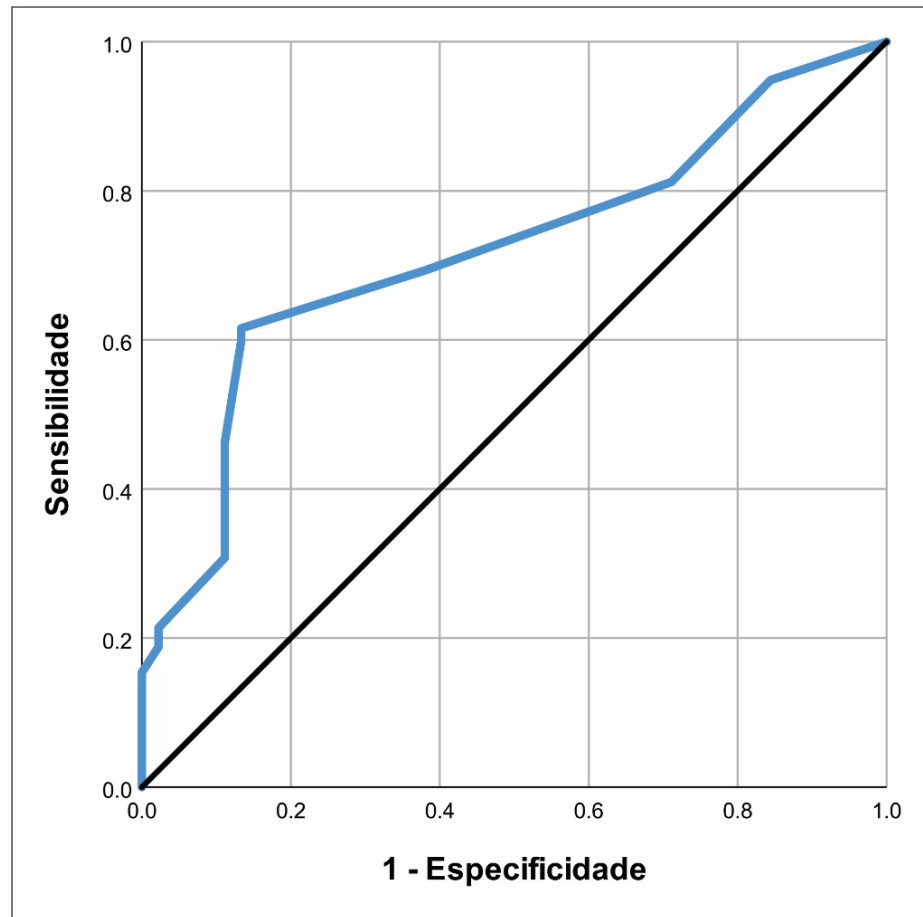
A fim de estudar os efeitos de diferentes fatores na ocorrência de fibrose clinicamente significativa foi proposto modelo múltiplo conforme representado na Tabela 19. Somente a variável SM [OR = 3,071, p = 0,027] apresentou associação significativa com a ocorrência de fibrose \geq F2. O modelo resultante apresentou acurácia de 0,718 (IC95%: 0,636-0,800), com significância estatística p < 0,001 (Figura 6).

Tabela 19 - Estimativas de odds ratio ajustadas para idade e ALT incluindo beta, erro padrão, nível descritivo e IC95% para predição de fibrose clinicamente significativa

	B	Erro padrão	p-valor	Odds Ratio	OR - IC95%	
					Inferior	Superior
Polimorfismo CG/GG	0,347	0,491	0,481	1,414	0,540	3,703
Síndrome metabólica	1,122	0,508	0,027*	3,071	1,135	8,307

*p<0,05

ABREVIATURAS: ALT, alanina aminotransferase.



AUC = 0,718 (IC95% 0,636-0,800), p < 0,001

Figura 6 - Curva ROC do modelo proposto para predição de fibrose clinicamente significativa incluindo área sob a curva (AUC), intervalo de confiança de 95% (IC95%) e nível descritivo (p-valor)

4.7. Características da população estudada conforme a presença de fibrose avançada

Por fim, análise adicional foi realizada a fim de avaliar os fatores associados à presença de fibrose hepática avançada ($\geq F3$). As variáveis qualitativas ligadas às características da SOP não apresentaram associação estatisticamente significativa

com o desfecho (Anexo 6). A fibrose avançada foi estatisticamente mais comum entre as mulheres que faziam uso de metformina ($p = 0,021$) e que tinham SM ($p = 0,003$) (Tabela 20).

Tabela 20 - Fatores qualitativos estratificados conforme a presença de fibrose avançada incluindo frequência absoluta (n), relativa (%) intervalo de confiança de 95% (IC95%) e nível descritivo (p-valor)

		FIBROSE (EHT)				p-valor
		≤ F2 (n = 104)		F3/F4 (n = 14)		
		n	%(IC95%)	n	%(IC95%)	
Polimorfismo CG/GG						
	CC	51	49,0% (39,6%-58,6%)	4	28,6% (10,5%-54,5%)	0,099
	CG	42	40,4% (31,3%-50,0%)	10	71,4% (45,5%-89,5%)	
	GG	11	10,6% (5,8%-17,6%)	0	0,0%	
CAP (dB/m)						
	<231	7	6,7% (3,1%-12,8%)	1	7,1% (0,8%-28,8%)	0,939
	231-267	24	23,1% (15,8%-31,8%)	2	14,3% (3,1%-38,5%)	
	268-300	20	19,2% (12,6%-27,6%)	3	21,4% (6,4%-46,9%)	
	>300	53	51,0% (41,4%-60,4%)	8	57,1% (31,9%-79,7%)	
Perfil glicêmico						
	Normal	9	8,7% (4,4%-15,2%)	1	7,1% (0,8%-28,8%)	0,414
RI sem DM2 ou pré-diabetes		57	54,8% (45,2%-64,1%)	5	35,7% (15,1%-61,5%)	
	DM2	16	15,4% (9,4%-23,2%)	4	28,6% (10,5%-54,5%)	
	Pré-diabetes	22	21,2% (14,2%-29,7%)	4	28,6% (10,5%-54,5%)	
Uso de metformina						
	Não	65	62,5% (53,0%-71,4%)	4	28,6% (10,5%-54,5%)	0,021*
	Sim	39	37,5% (28,6%-47,0%)	10	71,4% (45,5%-89,5%)	
Síndrome metabólica						
	Não	53	51,0% (41,4%-60,4%)	1	7,7% (0,8%-30,7%)	0,003*
	Sim	51	49,0% (39,6%-58,6%)	12	92,3% (69,3%-99,2%)	
HAS						
	Não	81	77,9% (69,2%-85,0%)	8	57,1% (31,9%-79,7%)	0,105
	Sim	23	22,1% (15,0%-30,8%)	6	42,9% (20,3%-68,1%)	
Hipotireoidismo						
	Não	91	87,5% (80,1%-92,8%)	13	100,0%	0,356
	Sim	13	12,5% (7,2%-19,9%)	0	0,0%	
Tabagismo						
	Ausente	91	87,5% (80,1%-92,8%)	13	92,9% (71,2%-99,2%)	0,501
	Atual	8	7,7% (3,7%-14,0%)	0	0,0%	
	Pregresso	5	4,8% (1,9%-10,2%)	1	7,1% (0,8%-28,8%)	
HOMA-IR ≥ 2,5						
	Não	13	12,6% (7,3%-20,0%)	2	14,3% (3,1%-38,5%)	1,000
	Sim	90	87,4% (80,0%-92,7%)	12	85,7% (61,5%-96,9%)	
Classificação por IMC						
	Normal	4	3,8% (1,3%-8,9%)	0	0,0%	0,912
	Sobrepeso	23	22,1% (15,0%-30,8%)	2	14,3% (3,1%-38,5%)	
	Obesidade Grau 1	32	30,8% (22,5%-40,1%)	4	28,6% (10,5%-54,5%)	
	Obesidade Grau 2	29	27,9% (20,0%-37,0%)	5	35,7% (15,1%-61,5%)	
	Obesidade Grau 3	16	15,4% (9,4%-23,2%)	3	21,4% (6,4%-46,9%)	

Valor de p baseado no teste exato de Fischer. * $p < 0,05$

Abreviaturas: EHT, elastografia hepática transitória; CAP, parâmetro do coeficiente de atenuação; RI, resistência insulínica; DM2: *diabetes mellitus* tipo 2; HAS, hipertensão arterial sistêmica; HOMA-IR, Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance; IMC, índice de massa corpórea.

Dentre as variáveis quantitativas ligadas ao perfil hepático, o grupo de pacientes com fibrose avançada ($\geq F3$) apresentou valores mais elevados de FIB-4 ($p = 0,031$), AST ($p = 0,005$) e ALT ($p = 0,028$), com significância estatística (Tabela 21).

Tabela 21 - Fatores quantitativos ligados ao perfil hepático estratificados de acordo com a presença de fibrose avançada incluindo média, desvio padrão ($\pm DP$), mediana, intervalo interquartil (IQR) e nível descritivo (p-valor)

	FIBROSE (EHT)				p-valor
	≤ F2 (n = 104)		F3/F4 (n = 14)		
	Média (±DP)	Mediana (IQR)	Média (±DP)	Mediana (IQR)	
NAFLD-FS	-2,8(±1,3)	-3,1(-3,6--2,2)	-2,0(±1,9)	-2,4(-3,4--0,5)	0,185
FIB-4	0,5(±0,2)	0,5(0,4-0,6)	0,7(±0,3)	0,6(0,5-0,8)	0,031*
Bilirrubina total (mg/ dL)	0,4(±0,2)	0,4(0,3-0,5)	0,5(±0,1)	0,5(0,4-0,6)	0,154
AST (U/ L)	20,0(±9,0)	18,0(15,0-21,0)	30,0(±14,0)	26,0(19,0-36,0)	0,005*
ALT (U/ L)	26,0(±16,0)	22,0(16,0-31,0)	39,0(±23,0)	37,0(19,0-50,0)	0,028*
GGT (U/ L)	34,0(±23,0)	26,0(19,0-41,0)	27,0(±13,0)	23,0(17,0-35,0)	0,386
Fosfatase alcalina (U/ L)	72,0(±22,0)	71,0(58,0-83,0)	80,0(±23,0)	84,0(69,0-93,0)	0,109
Plaquetas (mil/ mm ³)	290,0(±56,0)	287,0(251,0-333,0)	298,0(±82,0)	280,0(230,0-357,0)	0,947
INR	1,0(±0,0)	1,0(1,0-1,0)	1,0(±0,0)	1,0(1,0-1,1)	0,350
Albumina (g/ dL)	4,5(±0,3)	4,5(4,3-4,7)	4,4(±0,3)	4,5(4,1-4,7)	0,633
Ferritina (ng /mL)	124,0(±107,3)	101,0(46,0-161,0)	120,4(±97,5)	104,5(34,0-180,5)	0,951
CAP (dB/ m)	302,0(±52,0)	302,0(263,0-343,0)	313,0(±54,0)	329,0(283,0-345,0)	0,459

Valores de p baseado no Teste U de Mann-Whitney. * $p < 0,05$

ABREVIATURAS: EHT, elastografia hepática transitória; NAFLD-FS, *NAFLD fibrosis score*; FIB-4, *fibrosis-4 score*; AST, aspartato aminotransferase; ALT, alanina aminotransferase; GGT, gama glutamil transferase; INR, Razão normalizada internacional; CAP, parâmetro do coeficiente de atenuação.

Na Tabela 22 é possível verificar também que as mulheres que foram caracterizadas com fibrose $\geq F3$ apresentaram idade em média 6 anos maior do que a categoria de referência ($p = 0,017$). Entre as características ligadas ao perfil metabólico e hormonal, destacaram-se no grupo com fibrose avançada maiores valores de peso ($p = 0,043$), CC ($p = 0,032$) e RCQ ($p = 0,012$).

Tabela 22 - Fatores quantitativos metabólicos e hormonais estratificados de acordo com a presença de fibrose avançada incluindo média, desvio padrão (\pm DP), mediana, intervalo interquartil (IQR) e nível descritivo (p-valor)

	FIBROSE (EHT)				p-valor
	≤ F2 (n = 104)		F3/F4 (n = 14)		
	Média (± DP)	Mediana (QR)	Média (± DP)	Mediana (IQR)	
Idade (anos)	33,0(± 8,0)	33,0(27,0-38,0)	39,0(± 8,0)	39,0(34,0-44,0)	0,017*
Peso (kg)	90,0(± 18,7)	85,0(75,7-102,0)	101,6(± 21,2)	96,0(87,0-119,5)	0,043*
IMC (kg/ m²)	34,1(± 6,1)	33,4(29,7-37,6)	37,1(± 7,6)	36,3(32,0-39,5)	0,152
Circunferência cintura (cm)	103,2(± 14,5)	101,0(93,0-113,0)	112,4(± 14,8)	112,0(101,0-122,0)	0,032*
Relação cintura-quadril	0,9(± 0,1)	0,9(0,9-1,0)	1,0(± 0,0)	1,0(0,9-1,0)	0,012*
Colesterol total (mg/ dL)	186,0(± 38,0)	185,0(159,0-208,0)	184,0(± 37,0)	170,0(157,0-201,0)	0,739
Triglicerídeos (mg/ dL)	171,0(± 107,0)	135,0(101,0-202,0)	173,0(± 78,0)	169,0(115,0-216,0)	0,487
HDL (mg/ dL)	46,0(± 12,0)	46,0(37,0-52,0)	43,0(± 9,0)	42,0(40,0-50,0)	0,524
LDL (mg/dL)	110,0(± 31,0)	111,0(92,0-134,0)	113,0(± 32,0)	106,0(86,0-134,0)	0,874
Insulina (µU/ mL)	31,2(± 27,6)	22,7(15,1-39,9)	30,1(± 14,9)	30,8(19,5-39,1)	0,460
Glicemia de jejum (mg/ dL)	95,0(± 36,0)	89,0(82,0-98,0)	115,0(± 61,0)	97,0(84,0-105,0)	0,146
HOMA-IR	7,4(± 7,5)	4,9(3,3-8,3)	9,5(± 8,3)	7,4(3,7-11,3)	0,279
HB1AC (%)	5,7(± 1,1)	5,6(5,2-5,9)	6,4(± 2,1)	5,7(5,3-6,5)	0,299
Testosterona total (ng /dL)	61,2(± 40,8)	57,0(32,0-74,0)	53,4(± 34,8)	48,0(32,0-68,0)	0,376
Testosterona livre	38,0(± 24,0)	37,0(22,0-49,0)	31,0(± 18,0)	31,0(18,0-40,0)	0,289
Androstenediona (ng/ dL)	2,0(± 1,3)	1,6(1,2-2,5)	2,5(± 2,2)	2,5(1,1-3,2)	0,539
SDHEA (ng/ mL)	2124,0 (± 1438,0)	1828,0 (1119,0-2650,0)	1455,0 (± 1024,0)	1147,0 (670,0-2100,0)	0,050

Valores de p baseado no Teste U de Mann-Whitney. *p < 0,05

ABREVIATURAS: EHT, elastografia hepática transitória; IMC, índice de massa corpórea; HDL, Lipoproteína de alta densidade; LDL, Lipoproteína de baixa densidade; HOMA-IR, *Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance*; HbA1c, hemoglobina glicada; SDHEA, Sulfato de dehidroepiandrosterona.

4.8. Modelo para predição de fibrose avançada nas mulheres com DHGNA

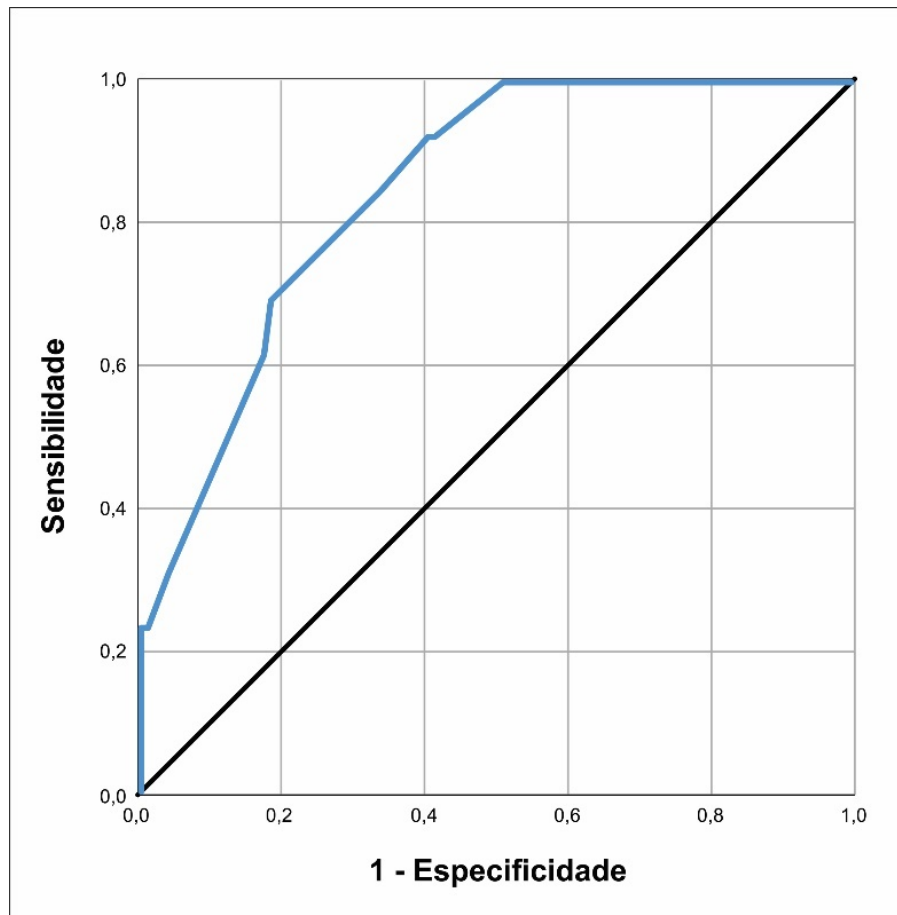
Modelo múltiplo foi proposto para avaliar os efeitos de diferentes fatores na ocorrência de fibrose avançada (\geq F3), conforme representado na Tabela 23. A presença de SM (p = 0,020) e AST > 32 U/l (p=0,009) mostraram ser fatores significativamente associados a fibrose avançada, independentemente da idade ou da presença do polimorfismo da PNPLA3. O modelo em questão resultou numa área sob a curva de AUC = 0,848 (IC95%: 0,758-0,938), p < 0,001 (Figura 7).

Tabela 23 - Estimativas de odds ratio ajustadas para idade incluindo beta, erro padrão, nível descritivo e IC95% para predição de fibrose avançada

	B	Erro padrão	p-valor	Odds Ratio	OR - IC95%	
					Inferior	Superior
Polimorfismo CG/GG	0,947	0,768	0,205	2,640	0,588	11,947
Síndrome metabólica	2,603	1,117	0,020*	13,050	1,511	120,625
AST > 32 U/l	2,202	0,848	0,009*	9,039	1,715	47,640

*p < 0,05

ABREVIATURAS: AST, aspartato aminotransferase.



AUC= 0,848 (IC95% 0,758-0,938), p < 0,001

Figura 7 - Curva ROC do modelo proposto para predição de fibrose avançada incluindo área sob a curva (AUC), intervalo de confiança de 95% (IC95%) e nível descritivo (p-valor)

5. Discussão

5. Discussão

Este é o primeiro estudo a avaliar, em mulheres com SOP, a prevalência do polimorfismo do gene da PNPLA3, fator genético de maior relevância na predisposição para DHGNA e sua progressão. Nosso estudo demonstrou que, nesta população, o polimorfismo rs738409 do gene da PNPLA3 não apresenta associação independente com a DHGNA ou suas formas avançadas, tampouco com alterações endócrinas e metabólicas. Por outro lado, a RI constituiu o principal fator de risco para DHGNA nestas mulheres e, quando em interação com o polimorfismo, atua de maneira sinérgica contribuindo para um risco ainda maior de desenvolvimento da doença. Além disso, idade superior a 32 anos associou-se a maior risco de DHGNA, enquanto maiores níveis de HDL conferiram proteção ao desfecho. Adicionalmente, no modelo de regressão logística multivariada, SM constituiu o principal fator de risco associado a fibrose clinicamente significativa ou avançada nesta população.

Observamos elevada prevalência de DHGNA nas pacientes com SOP, acometendo 72,4% destas. Tal prevalência é superior à observada em mulheres em idade fértil sem SOP, em concordância com estudos anteriores (131-133). Em população de mulheres brasileiras com IMC ≥ 30 e < 40 kg/m², Zueff e colaboradores demonstraram prevalência de DHGNA de 73,3% e 46,7% em mulheres com SOP e controles, respectivamente (132). Apesar de avaliar pacientes em ampla faixa de IMC, nosso estudo demonstrou elevada prevalência de obesidade (65,0%) com média de IMC muito similar ao estudo de Zueff e colaboradores (33,0 vs. 34,78, respectivamente), justificando a proximidade dos achados (132).

A maior proporção de pacientes com SOP e DHGNA observada em nosso estudo pode ser ainda justificada em parte pela maior prevalência de fenótipos “clássicos” (A e B), sabidamente associados à maior disfunção metabólica e, portanto,

ao risco adicional de DHGNA (134). O fenótipo A foi o mais comum, presente em 73,8% das mulheres, seguido pelo fenótipo B, em 16,9%. A distribuição dos fenótipos foi compatível com estudo multicêntrico anteriormente publicado, envolvendo 233 mulheres com SOP, onde também se observou predominância dos fenótipos A e B, com prevalências de 56,2% e 24,5%, respectivamente (135). De fato, por se tratar de uma população recrutada em centro terciário, há uma maior prevalência dos fenótipos A e B conforme descrito em outro estudo brasileiro também realizado em centro terciário (136). Quando se considera a população em geral, nota-se uma distribuição fenotípica distinta, com predominância dos fenótipos B e C (134). Sabe-se que os fenótipos “clássicos” (A e B) da SOP, associam-se com maior disfunção ovulatória, maiores níveis de insulina e RI, maior prevalência de obesidade, maior risco de SM e formas graves de dislipidemia aterogênica (134). Desta forma, a população estudada pode apresentar maior gravidade tanto do quadro de SOP quanto do quadro metabólico associado.

Na população estudada a frequência dos genótipos do gene da PNPLA3 CC, CG e GG foi de 50,3%, 41,7% e 8,0%, respectivamente. A distribuição genotípica foi muito semelhante à evidenciada em população brasileira saudável em estudo recentemente publicado (49,3% CC, 41% CG e 9,7% GG) (137). No grupo de mulheres com DHGNA a prevalência do polimorfismo CG/GG foi de 53,4%, enquanto no grupo sem DHGNA foi de 40,0%, sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,315$). Tais valores são inferiores aos evidenciados por Mazo e colaboradores no primeiro estudo a avaliar a prevalência do polimorfismo da PNPLA3 na população brasileira com DHGNA, com presença das formas CG/GG em 50,74% dos controles saudáveis e em 68,88% dos pacientes com DHGNA (138). Atualmente há limitado número de estudos que avaliaram a influência de fatores étnico-raciais na

prevalência da SOP. Além disso, a maior parte desses estudos utilizam critérios diagnósticos de SOP distintos, não permitindo assim concluir se há alguma associação de risco entre determinado grupo étnico e SOP (139). Apesar da ausência de dados sobre a composição étnica da nossa amostra, é possível que a menor prevalência do polimorfismo observada se deva a uma distribuição étnico-racial distinta do grupo estudado por Mazo e colaboradores (138).

Contrariando achados de estudos anteriores em populações distintas (36, 138), nossos resultados não demonstraram associação entre a presença do alelo G e a DHGNA nas mulheres com SOP. Tampouco foi observada associação com fibrose clinicamente significativa ($\geq F2$) e fibrose avançada ($\geq F3$). Apesar das pacientes portadoras do polimorfismo no gene da PNPLA3 apresentarem níveis de mediana de FIB-4 discretamente mais elevados que aquelas portadoras da forma selvagem [0,5 vs. 0,4 ($p = 0,039$)], em ambos os grupos o valor deste escore clínico-laboratorial encontra-se abaixo do valor de corte de 1,3 para exclusão de fibrose avançada (24), não configurando um achado de relevância na prática clínica. É importante salientar que o FIB-4 pode não ser tão acurado em populações com menos de 35 anos (140) e que a média de idade observada em nossa população foi de 32,5 anos, destacando a necessidade do desenvolvimento de ferramentas não-invasivas adicionais na predição de fibrose hepática em mulheres com SOP e DHGNA.

Não foi observado também associação entre a variante da ADPN e as diversas alterações metabólicas apresentadas pelas pacientes. De maneira similar, no mesmo GWAS responsável pela primeira descrição da associação do polimorfismo rs738409 da PNPLA3 com a DHGNA, Romeo e colaboradores não encontraram correlação entre o mesmo e variações do IMC, insulina e glicemia de jejum, HOMA-IR e alterações do perfil lipídico (36).

A análise dos resultados demonstrou ainda menores valores de testosterona total e testosterona livre em pacientes com o polimorfismo do gene da PNPLA3 em comparação com as demais. Visto que a avaliação do polimorfismo rs738409 da PNPLA3 em pacientes com SOP é dado inédito, registros anteriores sobre seu impacto no perfil hormonal destas pacientes não foram localizados na literatura. Além disso, apesar de tal achado, não houve diferença significativa na distribuição dos fenótipos da SOP ou na prevalência de hiperandrogenismo/nemia entre os grupos. Estudos adicionais precisam ser realizados a respeito desta associação para melhor elucidação.

Na análise univariada a presença de SM e de cada um de seus componentes isoladamente apresentou associação com a DHGNA, com uma prevalência de SM de 53,8% nas mulheres com SOP e DHGNA e 13,3% nas mulheres com SOP isolada. Em coorte retrospectiva que incluiu 586 mulheres com SOP, Won e colaboradores (141) demonstraram a mesma associação, com prevalências similares de SM de 62,7% e 10,5% em mulheres com SOP e DHGNA e mulheres com SOP sem DHGNA, respectivamente. Este mesmo estudo demonstrou ainda um aumento da proporção de mulheres com DHGNA conforme o número de componentes de SM. Revisão realizada por Targher e colaboradores (89) demonstrou que a maior parte dos estudos publicados até então evidenciava prevalência significativamente maior de SM e seus componentes em mulheres com SOP e DHGNA.

Em nossos resultados pôde ser observada uma associação estatística negativa entre a presença de alterações morfológicas ovarianas ao US e a DHGNA ($p = 0,035$), com maior prevalência destas alterações em mulheres sem esteatose hepática. Nenhum estudo prévio demonstrou esta associação. Porém, estudos anteriores avaliaram a correlação destes aspectos com a RI. Reid e colaboradores avaliaram

330 mulheres com SOP e evidenciaram a associação entre o volume ovariano > 10 cc e presença de RI (142). A hiperinsulinemia decorrente da RI periférica promove estímulo mitogênico das células da teca ovariana, levando a um aumento do compartimento celular da teca e maior produção de andrógenos. Tal expansão possivelmente é responsável pela expansão estromal ovariana, conferindo um maior volume (142). Uma vez que a RI está associada com a DHGNA espera-se que, de maneira oposta ao evidenciado em nossa pesquisa, essa esteja associada à presença das alterações morfológicas. A obtenção de dados de US de maneira retrospectiva e a ausência de padronização em sua execução pode ter impactado os resultados obtidos.

Apesar da alta prevalência de hiperandrogenismo/ hiperandrogenemia, não foi observada associação entre o mesmo e a ocorrência de DHGNA. Importante metanálise que avaliou fatores associados ao risco de desenvolvimento de DHGNA neste grupo, no entanto, evidenciou de maneira consistente esta associação, independente de fatores confundidores como RI, composição corporal e IMC (85). Possivelmente a elevada prevalência de fenótipos da SOP com hiperandrogenismo/ nemia impediu a avaliação acurada da influência deste fator na DHGNA. Pesquisas adicionais são necessárias para elucidar possível associação causal entre manifestações de hiperandrogenismo e/ ou níveis elevados de androgênios e a DHGNA neste grupo de mulheres.

Semelhante a estudos realizados anteriormente (94), a análise univariada demonstrou ainda maiores valores de transaminases e GGT associados à DHGNA em mulheres com SOP. Estudo brasileiro demonstrou resultados semelhantes aos nossos, com valores mais elevados de enzimas hepáticas no grupo com DHGNA (136). Porém, é pertinente observar que em nossa amostra, apesar dessa diferença

ser estatisticamente significativa, a média de valores destas enzimas ainda se encontrava dentro da faixa de normalidade. Logo, tais parâmetros podem perder sensibilidade na prática clínica ao se utilizar os valores de referência laboratoriais. Considerando-se estes valores, apenas 21,6% das pacientes com DHGNA apresentava transaminases alteradas, enquanto 35,8% apresentavam GGT alterada. As enzimas hepáticas têm pobre desempenho e acurácia na detecção de DHGNA e, apesar de valores anormais serem frequentemente relatados neste grupo, até 80% dos pacientes podem apresentar transaminases dentro dos valores da normalidade (143). Dessa maneira, o emprego da dosagem de transaminases de maneira isolada no rastreio de DHGNA tem baixa sensibilidade, sendo recomendável a associação a outros métodos, como US de abdome. Apesar da baixa prevalência de alteração dos níveis de GGT, a associação de níveis mais elevados com a DHGNA já foi previamente relatada e pode ser explicada por sua associação com RI e alta prevalência da mesma neste grupo (143).

Mulheres com DHGNA apresentaram ainda valores de ferritina superiores às aquelas sem a doença (82,0 vs. 123,6, $p = 0,009$). Associação similar entre maiores níveis de ferritina e DHGNA já foi previamente demonstrada (144, 145). A ferritina, proteína intracelular responsável pelo armazenamento do ferro, é também proteína de fase aguda e seus níveis podem estar elevados em diversos contextos, como inflamação sistêmica ou doença hepática crônica. Apesar da elevada associação da DHGNA com a síndrome da sobrecarga de ferro dismetabólica (146), Bugianesi e colaboradores demonstraram que os níveis de ferritina sérica não estão associados com as concentrações hepáticas de ferro, mas sim com o grau de dano hepático (147). Complementarmente, estudo sul coreano que acompanhou mais de 2400 homens saudáveis mostrou que os níveis basais de ferritina foram fortes preditores do

surgimento de esteatose hepática em 24,3% da população, sugerindo um papel da hiperferritinemia em estágios iniciais da doença (148). A associação de hiperferritinemia com RI e alterações metabólicas (146) pode justificar os níveis elevados desse marcador em uma fase precoce da DHGNA.

Também foram associadas à DHGNA alterações do perfil glicêmico, como DM2, intolerância à glicose e especialmente a RI, além de maiores níveis séricos de insulina, HOMA-IR, glicemia de jejum e HbA1c. A associação das alterações glicêmicas com a DHGNA já é bem documentada na literatura, podendo sua prevalência chegar a 70% em pacientes com DM2 (149). O papel central da RI na associação da SOP e DHGNA vem sendo amplamente explorado, por estar intrinsecamente relacionada à fisiopatogênese de ambas as patologias. Assim como em nosso estudo, outras pesquisas demonstraram a associação entre a RI e níveis de insulina em jejum com DHGNA em mulheres com SOP (94, 110, 131, 150).

Na nossa população, a prevalência de níveis alterados de HOMA-IR foi de 75% e sua presença foi o principal fator associado ao desenvolvimento de DHGNA, após avaliação dos fatores associados por modelo de regressão logística múltipla [OR = 4,313 ($p = 0,026$)]. A RI é tida como mecanismo patogênico central no desenvolvimento e progressão da DHGNA (151), aumentando o aporte de AGL hepáticos devido aumento da lipólise nos adipócitos, estimulando processos anabólicos através da hiperinsulinemia e favorecendo o acúmulo intra-hepático de lipídeos (152). Além disso, a RI afeta ainda a capacidade hepática em suprimir a produção de glicose em resposta à insulina, mantendo ativa a glicogenólise, promovendo a gliconeogênese e estimulando a lipogênese *de novo* (151).

Sabe-se ainda que a DHGNA predispõe ao desenvolvimento de RI e alterações do perfil glicêmico. Estudos epidemiológicos correlacionaram o conteúdo lipídico

hepático com o risco de desenvolvimento de RI, pré-diabetes e DM2 (17). Adicionalmente, em indivíduos com fatores de risco para DM2, o conteúdo hepático lipídico demonstrou-se mais relevante do que a gordura visceral na progressão para intolerância à glicose (153). Metanálise envolvendo 20 estudos prospectivos demonstrou que a presença de esteatose hepática ao US aumenta o risco de desenvolver DM2 em quase duas vezes (15). O quanto a DHGNA pode estar associada como fator causal ou agravante e não somente consequência das alterações metabólicas em mulheres com SOP só poderia ser elucidado por meio de estudos longitudinais prospectivos.

Apesar de não apresentar correlação com a DHGNA enquanto fator isolado, o alelo G em associação com um cenário de níveis elevados de HOMA-IR apresenta efeito sinérgico deletério [OR = 12,198 ($p = 0,022$)], oferecendo risco ainda maior de DHGNA em comparação ao efeito isolado dos níveis de HOMA-IR. Uma das possíveis explicações para tal interação é que a expressão do gene da PNPLA3 é estimulada pelo fator de transcrição regulada pela insulina SREBP-1 e, portanto, os maiores níveis de insulina podem aumentar a expressão desse gene. Na forma variante, a maior quantidade de ADPN estimulada de maneira direta pelo SREBP-1 e indireta pelos elevados níveis de insulina, acumula-se na superfície da gotícula lipídica por evasão da ubiquitinação favorecendo, assim, o acúmulo de lipídeos intra-hepáticos (60). Evidências de sinergia similar foram observadas por Stender e colaboradores ao demonstrar interação entre a adiposidade e o polimorfismo da PNPLA3, ampliando a predisposição à DHGNA e sua progressão para cirrose (60).

A presença de HDL ≥ 50 como fator protetor para o desenvolvimento de DHGNA foi evidenciada em nosso estudo após avaliação por modelo de regressão logística múltipla [OR = 0,237 ($p = 0,003$)]. Baixos níveis de HDL são reconhecidamente um

fator de risco metabólico e cardiovascular. A associação de baixos níveis de HDL com a DHGNA já foi demonstrada em outros estudos (154, 155). Um padrão dislipidêmico aterogênico é comumente observado em pacientes com DHGNA, sendo caracterizado por altos níveis de TG, baixos níveis de HDL e LDL do subtipo pequena e densa (sdLDL), e está relacionado a maior lipogênese *de novo* hepática induzida por insulina. O estresse no retículo endoplasmático pode levar à disfunção da *ATP Binding Cassette Subfamily A Member 1 (ABCA1)*, proteína transmembrana responsável pelo efluxo celular de colesterol e fosfolípidos, e que tem papel central na biogênese de HDL (156). Tais alterações podem justificar níveis mais baixos de HDL observados em indivíduos com DHGNA.

Ainda no que concerne ao modelo de predição de DHGNA em mulheres com SOP, a idade superior a 32 anos apresentou associação independente com o desfecho [OR = 3,833 ($p = 0,007$)]. Assim, mulheres com SOP e idade superior a 32 anos apresentaram chances quase 4 vezes maiores de desenvolverem DHGNA. Na população em geral, mulheres na pré-menopausa apresentam um risco menor de DHGNA em relação aos homens. No entanto, estudo longitudinal prospectivo demonstrou que a idade representa fator de risco independente para o desenvolvimento de DHGNA em mulheres na pré-menopausa (157), possivelmente refletindo mudanças nos níveis de estrogênios. Já é bem documentado o desenvolvimento de DHGNA em idades mais precoces nas mulheres com SOP quando comparadas a outros grupos, além da maior frequência de formas avançadas (86, 94), com estágios avançados de fibrose em mulheres com SOP com menos de 40 anos de idade (88, 111). Estudo italiano retrospectivo analisou dados de 602 pacientes com diagnóstico de SOP, categorizando-as conforme faixa etária em ≤ 20 anos, 21-30 anos e > 30 anos (158). Demonstrou-se que mulheres mais jovens

apresentavam maiores índices de disfunção ovariana e hiperandrogenismo, enquanto distúrbios metabólicos predominavam em mulheres com idade superior a 30 anos. Além disso, no respectivo estudo, idade foi também preditor de níveis de insulina, com maior RI no grupo de maior idade (158). Corroborando este dado, estudo brasileiro transversal envolvendo 796 mulheres com SOP demonstrou que os níveis de insulina aumentam gradualmente com o avançar da idade e que, após ajuste pelo IMC, há um aumento da RI entre 20 e 39 anos (159). É provável que a associação da idade a um maior risco de DHGNA seja um reflexo da forte associação com RI e com um aumento progressivo desta conforme o avançar da idade, mesmo em pacientes jovens, tornando imprescindível estudos longitudinais envolvendo diversas faixas etárias.

Em suma, o modelo de regressão logística múltipla demonstrou que a RI, de maneira isolada ou em associação ao polimorfismo da PNPLA3, foi o principal fator de risco para o desenvolvimento de DHGNA neste grupo de mulheres com SOP, enquanto o HDL \geq 50 mg/ dL foi o principal fator associado negativamente com essa patologia. Idade superior a 32 anos representou ainda fator de risco independente para o desfecho. Este modelo apresentou uma boa acurácia na detecção de mulheres com DHGNA [AUC = 0,870 ($p < 0,001$)]. Pode-se supor, então, que nas mulheres com SOP o perfil metabólico tem papel central no risco para o desenvolvimento de DHGNA, enquanto o polimorfismo da PNPLA3, apesar de não atuar de maneira isolada, é capaz de amplificar os efeitos das alterações metabólicas.

Nosso estudo empregou a EHT, com mensurações do CAP e da LSM para avaliação do grau de esteatose e fibrose, respectivamente, como alternativa à biópsia hepática. O CAP permite mensurar o grau de esteatose através da avaliação da atenuação das ondas de ultrassom pela gordura hepática. Em nosso estudo, 6,8% das pacientes ($n = 8$) com evidência de esteatose ao US não apresentaram valores

de CAP compatíveis com esteatose, corroborando achados de outro estudo que demonstrou discordância em 7,94% dos casos (160). Apesar do US ainda ser considerado método de primeira linha no rastreio de esteatose hepática devido sua fácil execução e alta disponibilidade, é necessário o envolvimento de mais de 30% dos hepatócitos para permitir a detecção de esteatose de maneira confiável (161). Metanálise envolvendo dados de 2735 pacientes com diversas etiologias de hepatopatias demonstrou sensibilidade do CAP de 69% para o diagnóstico de esteatose grau 1 (5-33% dos hepatócitos afetados) e 88% para o diagnóstico de esteatose grau 3 (> 66% dos hepatócitos afetados) (162). Ambos os métodos possuem suas limitações, especialmente na presença de níveis elevados de IMC (160), não sendo possível concluir se o US superestimou ou o CAP subestimou o número de pacientes com esteatose visto não dispormos da biópsia hepática, método padrão ouro para avaliação dessas pacientes.

Uma vez que a presença e a gravidade da fibrose hepática são os principais determinantes dos desfechos da DHGNA, é fundamental a avaliação destes parâmetros para elucidação dos fatores associados ao pior prognóstico da doença nestas pacientes. Pouco menos da metade das pacientes com evidência de DHGNA apresentava algum grau de fibrose à EHT (fibrose \geq F1). Adicionalmente, 11,9% (n = 14) apresentavam fibrose avançada (fibrose \geq F3), sendo 1,7% (n = 2) com cirrose (F4). Alguns fatores podem ter contribuído para a maior prevalência de estágios associados a fibrose na nossa população. A elevada prevalência de níveis alterados de HOMA-IR nas pacientes com DHGNA (87,2%, n = 102) avaliadas pela EHT provavelmente foi um dos principais fatores contribuintes. A correlação da RI com fibrose e hipertensão portal é bem documentada e biologicamente fundamentada (163). A insulina estimula as células estreladas hepáticas e induz a produção de fator

de crescimento do tecido conjuntivo. Além disso, sua modulação do óxido nítrico e endotelinas pode induzir à hipertensão portal. Desta forma, ao interferir na deposição de colágeno, vasoconstrição e regulação da estrutura sinusoidal, os níveis de insulina podem influenciar os níveis de LSM (163). Os efeitos do IMC sobre a adequada mensuração da LSM também estão documentados na literatura, especialmente no que concerne à obtenção de valores confiáveis de LSM com a utilização de probe M em pacientes com $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ (164). No entanto, uma vez empregado o correto probe de acordo com IMC e distância pele-cápsula hepática, a acurácia diagnóstica é ampliada, com estudo recente confirmando inclusive a possibilidade do emprego dos mesmos valores de corte para os graus de fibrose nesse contexto (165). Assim, apesar da alta prevalência de obesidade em nosso estudo, o adequado emprego dos probes M e XL de acordo com IMC e distância pele-cápsula hepática permitiu manutenção da acurácia do exame. Sabe-se ainda que os valores de elastografia hepática fornecidos pelo probe XL são 1,5 a 2 kPa mais baixos em relação àqueles obtidos com o probe M (166). Entretanto, não existem recomendações formais em relação aos pontos de corte utilizados em caso de utilização do probe XL (167).

A EHT tem um bom poder discriminatório do grau de fibrose, com área abaixo da curva ROC (AUROC) de 0,83, com valor preditivo negativo (VPN) de 90% na categorização em fibrose avançada e não avançada (168). É possível afirmar, portanto, que a maior parte das pacientes avaliadas pela EHT em nosso estudo não apresentava fibrose clinicamente significativa ($\geq \text{F2}$), devido o alto VPN do método. No entanto, devido aos possíveis fatores confundidores, são necessários métodos adicionais para adequada avaliação do grau de fibrose das demais pacientes ($\geq \text{F2}$).

Poucos estudos avaliaram as pacientes com SOP e DHGNA em relação ao grau de fibrose hepática e, dentre estes, a maioria utilizou ferramentas não invasivas,

especialmente a EHT. Won e colaboradores avaliaram 586 mulheres com SOP, dentre as quais 28 realizaram EHT (141). Neste estudo, realizado em população asiática, foi demonstrado uma média de LSM de 7,7 kPa, havendo associação entre o número de componentes da SM e o grau de fibrose. Em outro estudo envolvendo também população de mulheres sul asiáticas recrutadas em centro canadense, Shengir et al avaliou 101 pacientes com diagnóstico de SOP através de EHT, definindo fibrose clinicamente significativa através de ponto de corte de LSM de 8,0 kPa (169). Demonstrou-se prevalência de 15% de fibrose clinicamente significativa nas mulheres com DHGNA, sendo esta ainda maior nas pacientes com obesidade em relação às demais. Ainda referente à população asiática, estudo que avaliou 42 mulheres tailandesas com SOP descreveu presença de fibrose avançada em apenas duas delas, não abordando em maiores detalhes os dados de LSM tampouco fatores associados à presença de fibrose (160). Já estudo envolvendo população mexicana de mulheres com SOP e controles sem SOP, avaliou 49 mulheres com SOP através de EHT, não demonstrando fibrose \geq F2 em nenhuma delas, possivelmente devido tratarem-se de mulheres muito jovens, com faixa etária média de 26 anos (170). No Brasil, estudo conduzido em Minas Gerais, avaliou 87 mulheres com SOP, com EHT realizada em 25 delas. Destas, 28% apresentaram fibrose clinicamente significativa (F2) e 12% apresentaram fibrose avançada (F3) (136). O respectivo estudo não apresentou dados referentes aos fatores de risco associado à presença de fibrose clinicamente significativa e/ ou avançada. Por fim, em estudo que avaliou 314 mulheres com SOP através de escores clínico-laboratoriais para predição de fibrose avançada [FIB-4, APRI, BAAT (do inglês *BMI Age ALT Triglycerides*) e BARD (do inglês *BMI Age ALT Triglycerides*)], evidenciou-se que mulheres que apresentavam SM apresentavam maior score BAAT, sem diferença significativa nos outros escores (171).

Ainda mais escassos são os dados da literatura a respeito de biópsia hepática em mulheres com SOP. Brzozowska e colaboradores apresentou dados de 5 pacientes com SOP com enzimas hepáticas alteradas avaliadas por biópsia hepática, dentre as quais todas apresentavam evidência de EHNA, sendo 4 com algum grau de fibrose, uma delas já com cirrose hepática estabelecida (88). Vale ressaltar que a paciente com evidência de cirrose hepática apresentava apenas 36 anos de idade. Setji e colaboradores avaliaram dados histológicos de 6 mulheres com SOP, indicadas ao procedimento devido elevação de transaminases, todas elas com evidência de EHNA e algum grau de fibrose (111). Duas destas mulheres já apresentavam fibrose em ponte, ambas com menos de 25 anos de idade. Vale destacar ainda que todas estas pacientes apresentavam sobrepeso ou obesidade e HDL < 50 mg/ dL. Em subgrupo de estudo americano, 4 mulheres com SOP foram submetidas à biópsia hepática, todas com achados compatíveis com EHNA e algum grau de fibrose (3 pacientes com fibrose F2 e 1 paciente com F1) (172). No estudo com maior casuística de biópsia hepática em mulheres com SOP até o momento, foram avaliadas 25 mulheres, 44% delas apresentando EHNA (87). Foram fatores independentes associados à EHNA níveis de AST e TG elevados, bem como o consumo de qualquer quantidade de álcool, mesmo que em pequenas quantidades. Somente níveis de HDL reduzidos apresentaram associação com fibrose avançada no respectivo estudo.

Nosso estudo avaliou 118 mulheres com DHGNA e SOP por meio da EHT. Destas, 26 apresentavam LSM compatível com fibrose leve (F1), 14 com fibrose clinicamente significativa (F2), 12 com fibrose avançada (F3) e 2 com cirrose hepática (F4). Em relação aos fatores associados à presença de fibrose clinicamente significativa (\geq F2), a análise univariada demonstrou associação com SM ($p = 0,027$), classificação por IMC ($p = 0,044$) e peso ($p < 0,001$), valores de circunferência da

cintura ($p < 0,001$) e RCQ ($p = 0,005$), níveis de insulina em jejum ($p = 0,016$) e HOMA-IR ($p = 0,023$). A associação de dados antropométricos, especialmente circunferência de cintura e RCQ, com doença hepática avançada é bem reconhecida (173) e reflete, de certo modo, a adiposidade visceral. Da mesma maneira, SM e parâmetros associados à RI são sistematicamente associados na literatura a um maior risco de progressão da DHGNA (138), com descrição da progressão da fibrose independente da presença de EHNA (174). Ainda em relação à presença de fibrose $\geq F2$, os níveis de ALT encontraram-se discretamente elevados na presença de fibrose significativa em relação a F0/ F1 (33 U/ L vs. 26 U/ L, respectivamente), porém ainda dentro da faixa da normalidade, reforçando a baixa acurácia do método no rastreio de formas avançadas de DHGNA nesse grupo. Notou-se ainda maiores valores de CAP nas mulheres com fibrose clinicamente significativa em relação às aquelas com F0/ F1, com média de 319 dB/ m vs. 298 dB/ m respectivamente. Os valores aumentados do CAP, especialmente > 300 dB/m, podem superestimar os valores de LSM quando estes correspondem a graus de fibrose menores ($< F3$) (175). Este pode ter sido fator de confusão na discriminação das pacientes quanto ao grau de fibrose, principalmente aquelas que não apresentavam fibrose avançada ($\geq F3$), uma vez que foi observada esteatose intensa (CAP > 300 dB/ m) em 51% ($n = 61$) das pacientes submetidas à EHT em nosso estudo.

O modelo de regressão logística demonstrou associação independente da SM com a presença de fibrose $\geq F2$ [OR = 3,071 ($p = 0,027$)], com AUROC deste modelo de 0,718 (IC95% 0,636-0,800, $p < 0,001$). Assim, mulheres com SOP e SM apresentam 3 vezes mais chances de evidenciar fibrose clinicamente significativa. Vale destacar ainda, que a média de idade neste grupo foi de 34 anos, demonstrando caracteres de DHGNA avançada em mulheres em idade muito precoce.

Quando consideramos os fatores associados à presença de fibrose avançada, a análise univariada demonstrou associação desta com SM ($p = 0,003$), uso de metformina ($p = 0,021$), maiores níveis de FIB-4 ($p = 0,031$), AST ($p = 0,005$), ALT ($p = 0,028$), peso ($p = 0,043$), circunferência da cintura ($p = 0,032$) e RCQ ($p = 0,012$). As mulheres com evidência de fibrose $\geq F3$ eram em média 6 anos mais velhas que aquelas com fibrose $\leq F2$ (39 vs. 33 anos, respectivamente, $p = 0,017$), ainda que em faixa etária média inferior a 40 anos, habitualmente associada a maior risco de quadros avançados de DHGNA na população em geral (87). A associação do uso de metformina a níveis de fibrose $\geq F3$ muito provavelmente está relacionada aos critérios envolvidos na indicação desta medicação neste grupo de mulheres, sendo considerada especialmente no tratamento de mulheres com SOP com IMC ≥ 25 e/ ou fatores de risco metabólicos (120), grupo com maior risco também para formas avançadas da DHGNA.

Por fim, após avaliação dos fatores associados à presença de fibrose avançada ($\geq F3$) por modelo de regressão logística múltipla ajustado para idade, somente a presença de SM e níveis de AST > 32 U/l mantiveram associação significativa. Mulheres com SM apresentavam chance 13 vezes maior de apresentar fibrose $\geq F3$ [OR = 13,050 ($p = 0,020$)] enquanto aquelas com AST > 32 U/l aumentavam em 9 vezes estas chances [OR = 9,039 ($p = 0,009$)]. A relação entre SM e formas avançadas da DHGNA tem como principal hipótese a relação com a RI e seus efeitos na lipogênese hepática além de níveis elevados de mediadores inflamatórios como interleucina 6, $TNF\alpha$ e JNK levando à necroinflamação hepática. Kanwar et al demonstrou que, em pacientes com SM e DHGNA sem diabetes, há uma maior prevalência de RI, maior gravidade da esteatose hepática e inflamação portal em relação aos pacientes sem SM (176). Tal relação é bem reconhecida, de forma que a

Associação Europeia para o Estudo do Fígado (EASL) em conjunto com a Associação Europeia para o Estudo da Diabetes (EASD) e Associação Europeia para o Estudo da Obesidade (EASO) recomenda que indivíduos com idade superior a 50 anos, DM2 e/ou SM realizem rastreio de EHNA e suas formas avançadas, inicialmente com estratificação de risco através de escores clínico-laboratoriais associados à elastografia hepática, seguido por biópsia hepática se necessário (1). Apesar de inúmeros estudos avaliarem a associação dos componentes da SM individualmente com EHNA e fibrose avançada, poucos avaliaram seu impacto em conjunto nos desfechos relacionados ao fígado como cirrose e mortalidade (177). Em coorte americana envolvendo mais de 270 mil pacientes com DHGNA, todos os caracteres da SM se associaram individualmente ou em conjunto a um maior risco de cirrose e hepatocarcinoma (178).

Já utilizada em escores clínico-laboratoriais para predição de fibrose avançada, AST pode elevar-se de maneira mais proeminente em relação a ALT em função da redução de sua depuração e maior liberação especialmente por dano mitocondrial (179). Similarmente aos nossos achados, estudo que avaliou 161 pacientes com DHGNA por meio de EHT demonstrou associação de maiores níveis de AST com fibrose avançada (180). Os achados do nosso estudo, em conformidade com a literatura atual, reforçam a necessidade de avaliação hepática em pacientes com SOP e SM ou níveis elevados de AST, a fim de rastrear e estratificar o risco de progressão da DHGNA para EHNA com formas avançadas de fibrose, preferencialmente com ferramentas não invasivas como elastografia hepática, visto a pobre correlação dos escores clínico-laboratoriais com o grau de fibrose.

Algumas limitações de nosso estudo são dignas de nota. O fato de as pacientes recrutadas serem originárias de centro terciário pode ter contribuído para um pior perfil

metabólico, elevando a prevalência e gravidade da DHGNA e tornando questionável a extrapolação de nossos resultados para a população geral de mulheres com SOP. Outro ponto a ser observado foi a obtenção de dados de prontuário no que concerne às manifestações fenotípicas da SOP ao diagnóstico, não só clínicas, mas principalmente laboratoriais, uma vez que boa parte da população avaliada apresentava diagnóstico de SOP estabelecido há um longo período. Este fato pode ter sido responsável pela ausência de correlação da DHGNA com níveis androgênicos. Apesar do emprego rotineiro do US para diagnóstico de esteatose hepática, a biópsia continua sendo o padrão-ouro para adequado dimensionamento do grau de esteatose, diagnóstico de EHNA e avaliação do grau de fibrose (168). O US é um método confiável quando há esteatose macrovesicular em mais de 30% dos hepatócitos, chegando a 91% de sensibilidade (168, 181) e não agregando riscos, de maneira distinta da biópsia hepática, cujos riscos associados, apesar de raros, são descritos. Erro amostral das biópsias hepáticas mantém-se como limitação deste método, com estudos demonstrando que cerca de 35% dos pacientes com fibrose em ponte na primeira biópsia apresentavam fibrose leve ou nenhum grau de fibrose na segunda biópsia. A variabilidade intra e inter-observador também é uma limitação importante do método (182). Adicionalmente, é eticamente questionável submeter mulheres sem evidência de doença hepática ou sem indicação clínica à realização de biópsia, agregando riscos de maneira desnecessária. Em nosso estudo, foi utilizado o HOMA-IR para avaliação da IR. O padrão-ouro para a avaliação da sensibilidade à insulina é o *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico, porém o HOMA-IR tem demonstrado sensibilidade e especificidade satisfatórias (183), com boa correlação com o *clamp* (128, 184, 185), sendo amplamente empregado em estudos clínicos com DHGNA.

Nosso estudo foi o primeiro a avaliar a interação entre o fator genético mais relevante no risco para DHGNA e fatores ambientais em mulheres com SOP. De maneira distinta do demonstrado em outros grupos, nossos resultados indicam que o desenvolvimento de DHGNA apresenta maior associação com as alterações metabólicas do que com o risco genético. Apesar da alta prevalência de DHGNA em mulheres com SOP e seu potencial risco de progressão, a indicação de rastreio nestas pacientes ainda é controversa (70) e muitos especialistas responsáveis pelo cuidado dessas pacientes desconhecem sua associação (186). Ampliar o conhecimento sobre fatores de risco relacionados ao desenvolvimento da DHGNA e sua progressão é fundamental para um rastreio adequado destas pacientes, aprimorando o seu seguimento. Apesar da aplicabilidade da genotipagem do polimorfismo rs738409 da PNPLA3 na prática clínica ser limitada por questões técnicas, sua realização pode permitir um cuidado individualizado a estas pacientes, uma vez que, quando em associação à RI, ocasiona um maior risco de DHGNA. Além disso, pesquisas anteriores demonstram que pacientes com presença deste SNP respondem melhor ao tratamento clínico e cirúrgico (69, 187). Certamente, o maior destaque em nosso estudo foi a forte associação da DHGNA com a RI. Assim, o grupo de pacientes com SOP e RI deve receber especial atenção com relação ao rastreio de DHGNA e suas formas avançadas. Adicionalmente, até onde temos conhecimento, nosso estudo foi a maior casuística de mulheres com SOP e DHGNA avaliadas por meio de EHT, fornecendo dados adicionais a respeito dos fatores de risco relacionados à presença de fibrose clinicamente significativa e avançada, até então escassos na literatura. É necessário um olhar cuidadoso sob mulheres com SOP e SM devido maior risco de formas avançadas de DHGNA, com fibrose clinicamente

significativa em idades precoces, fazendo-se primordial a estratificação de risco neste grupo.

6. Conclusões

6. Conclusões

1) A presença do polimorfismo rs738409 do gene da PNPLA3 não apresentou associação independente com a DHGNA, desenvolvimento de fibrose clinicamente significativa ou avançada, ou alterações metabólicas.

2) O polimorfismo rs738409 do gene da PNPLA3 interage com a RI, conferindo maior risco de desenvolvimento de DHGNA nessas pacientes.

3) Maior risco de DHGNA foi observado na presença de RI isolada ou associada ao polimorfismo. Níveis de HDL ≥ 50 mg/ dL estão associados a menor risco. Modelo incluindo tais variáveis, resultante de regressão logística múltipla, possui uma boa acurácia para predizer a DHGNA em mulheres com SOP.

4) A síndrome metabólica demonstrou-se fator determinante na predição de risco tanto para fibrose clinicamente significativa quanto fibrose avançada. Assim, mulheres com SOP e DHGNA, que apresentem SM, devem ser avaliadas quanto ao risco de formas avançadas da doença.

5) Níveis de AST > 32 U/ L estão associados a maior risco de fibrose avançada. Nestes casos, é recomendável avaliação complementar para estratificação de risco de formas avançadas de DHGNA.

6) Em função da elevada prevalência da DHGNA e menor média de idade das pacientes que a desenvolveram, é aconselhável o rastreio das pacientes com SOP, especialmente daquelas com pior perfil metabólico.

7) A genotipagem do gene da PNPLA3 na prática clínica pode auxiliar na individualização do seguimento e tratamento destas pacientes, uma vez que predispõe a maior risco de DHGNA quando na presença de RI.

7. Anexos

7. Anexos

Anexo 1: Parecer cosubstanciado do Comitê de Ética e Pesquisa do HCFMUSP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência do Polimorfismo no Gene da Patatin-Like Phospholipase Domain Containing 3 (PNPLA3) na Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA) em pacientes com Síndrome Dos Ovários Policísticos (SOP)

Pesquisador: CLAUDIA PINTO MARQUES SOUZA DE OLIVEIRA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 84801618.4.0000.0068

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.554.658

Apresentação do Projeto:

O projeto irá avaliar a prevalência do polimorfismo rs738409 no gene da PNPLA3 e sua influência na susceptibilidade e gravidade da doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA). A identificação desse polimorfismo no gene da PNPLA3 nessa população de SOP como potencial fator preditor de evolução de DHGNA poderá contribuir para a confecção e adoção de medidas de screening diagnóstico e terapêuticas adequados para esses pacientes

Objetivo da Pesquisa:

Determinar a frequência do polimorfismo do gene da PNPLA3 (patatin-like phospholipase domain containing 3) e seu impacto na susceptibilidade e progressão da doença hepática gordurosa não-alcoólica em pacientes portadoras de síndrome dos ovários policísticos

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos para os pacientes é mínimo, relacionado a punção venosa e realização de exame de não invasivo cito, e ultrassonografia abdominal e elastografia hepática.

Considera-se como possível benefício decorrente dos resultados do projeto: a adoção de medidas de screening diagnóstico e terapêuticas individualizadas para essa população.

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

Anexo 1 (Continuação): Parecer cosubstanciado do Comitê de Ética e Pesquisa do HCFMUSP



Continuação do Parecer: 2.554.658

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante e tem o potencial para um possível benefício na população estudada

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos apresentados pelo pesquisador estão adequados

Recomendações:

Não há recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

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

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1064934.pdf	08/03/2018 14:29:58		Aceito
Outros	ProjetoAssinado.pdf	08/03/2018 14:28:07	CLAUDIA PINTO MARQUES SOUZA DE OLIVEIRA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_de_compromisso.pdf	08/03/2018 14:27:20	CLAUDIA PINTO MARQUES SOUZA DE OLIVEIRA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Cartas_de_anuencia.pdf	08/03/2018 14:25:12	CLAUDIA PINTO MARQUES SOUZA DE OLIVEIRA	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.doc	08/03/2018 14:21:06	CLAUDIA PINTO MARQUES SOUZA DE OLIVEIRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_DE_PESQUISA.doc	28/02/2018 02:51:15	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: cappelq.adm@hc.fm.usp.br

Anexo 1 (Continuação): Parecer cosubstanciado do Comitê de Ética e Pesquisa do HCFMUSP



Continuação do Parecer: 2.554.658

Orçamento	Declaracao_isencao_custo.pdf	28/02/2018 02:20:18	CLAUDIA PINTO MARQUES SOUZA DE OLIVEIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	28/02/2018 02:12:53	CLAUDIA PINTO MARQUES SOUZA DE OLIVEIRA	Aceito
Folha de Rosto	FR_assinada.pdf	28/02/2018 01:59:57	CLAUDIA PINTO MARQUES SOUZA DE OLIVEIRA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 21 de Março de 2018

Assinado por:

ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

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

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

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

Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

1

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: FEMININO
 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 (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Influência do Polimorfismo no Gene da *Patatin-Like Phospholipase Domain Containing 3* (PNPLA3) na Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA) em pacientes com Síndrome Dos Ovários Policísticos (SOP)

.....
 PESQUISADOR : .PROF. DRA. Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira
 CARGO/FUNÇÃO: .PROF. LIVRE DOCENTE DO DEPARTAMENTO DE GASTROENTEROLOGIA
 INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº .CRM 75499.
 UNIDADE DO HCFMUSP: DEPARTAMENTO DE GASTROENTEROLOGIA.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒ RISCO MÉDIO ☐
 RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 MESES

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

Anexo 2 (Continuação): Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

2

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

Convidamos a senhora a participar voluntariamente de projeto de pesquisa com objetivo de identificar a presença do polimorfismo rs738409 no gene da PNPLA3 em mulheres portadoras de síndrome dos ovários policísticos e sua influência no desenvolvimento e progressão da esteatose hepática neste grupo, bem como sua relação com as alterações endócrinometabólicas (diabetes, resistência insulínica, hipertensão arterial, obesidade, dentre outros). Para tal serão avaliados exames de sangue de pacientes portadoras de síndrome dos ovários policísticos, além da realização de ultrassonografia de abdome superior para detecção de esteatose hepática. Com os resultados deste estudo, espera-se identificar fatores de risco para desenvolvimento e progressão da esteatose hepática, permitindo assim maior vigilância nos grupos de risco e possibilitando, assim, o diagnóstico precoce, tratamento e prevenção de complicações dessa patologia.

PROCEDIMENTOS

A rotina de atendimento no ambulatório continuará a mesma, através de consultas médicas e exames feitos da maneira habitual, para acompanhamento e tratamento de pacientes com síndrome dos ovários policísticos. Estes procedimentos de rotina incluem exames de sangue, através de punção periférica de veia do antebraço, ultrassonografia de abdome e elastografia hepática. Pedimos a permissão para utilização dessas informações no estudo em questão, através do armazenamento dos resultados dos exames, porém mantendo em sigilo a identificação do paciente. Além dos exames habituais, outros exames de caráter experimental serão solicitados. Para tal será necessária coleta de sangue por punção periférica de veia do antebraço, que será congelado para avaliação de alterações genéticas que podem estar associadas com a progressão da esteatose hepática.

DESCONFORTOS E RISCOS

A punção de veia periférica apresenta pequeno desconforto, e alguns riscos, como sangramento, hematoma, equimose, e dor local. A ultrassonografia do abdome e a elastografia hepática são exames não invasivos, que não provocam dor ou desconforto, e não oferecem riscos adicionais ao paciente. A elastografia hepática é semelhante ao exame de ultrassonografia do abdome, sendo realizada em posição semelhante. Este exame é indolor, sendo possível sentir apenas uma vibração na pele no local onde o probe está posicionado. É utilizada para avaliar a fibrose hepática, que reflete os danos causados por doenças crônicas no fígado, sem invasão do corpo humano, ou seja, sem riscos ou complicações, substituindo por vezes a necessidade de biópsia hepática.

BENEFÍCIOS

A avaliação dos fatores associados à má-evolução da esteatose hepática em pacientes portadoras de síndrome dos ovários policísticos poderá trazer informações importantes no que se refere ao prognóstico da sua doença, e auxiliar em uma estratégia de tratamento futuro. O diagnóstico de alterações metabólicas como resistência à insulina, síndrome metabólica ou diabetes, pode antecipar o seu tratamento, e ter impacto no controle da sua

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

Anexo 2 (Continuação): Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

3

doença do fígado. Não haverá nenhum custo extra para a senhora pela sua participação nessa pesquisa. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se houver qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

CONFIDENCIALIDADE

As informações médicas geradas por esta pesquisa farão parte do seu prontuário hospitalar. Aquelas informações que não constarem no seu prontuário serão mantidas no arquivo dos pesquisadores e identificadas apenas por um número. Os resultados desse estudo poderão ser publicados em uma revista ou livro texto da área médica com a finalidade de ensino. Os autores se comprometem a usar os dados apenas com os propósitos desta pesquisa.

SOLICITAÇÃO DE INFORMAÇÕES ADICIONAIS

A senhora poderá solicitar mais informações a respeito do estudo a qualquer momento. Em qualquer etapa do estudo, a senhora terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa. O principal investigador é a Prof. Dra. Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira, que pode ser encontrada no endereço no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, telefone (s) 2661-7830. Se a senhora tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar, (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549; e-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br

A senhora será informada sobre novas descobertas que possam influenciar a continuidade da sua participação na pesquisa.

RECUSA OU ABANDONO DO ESTUDO

A senhora está livre a recusar-se a participar, retirar o seu consentimento informado ou abandonar o referido projeto, a qualquer momento, sem prejuízo à continuidade de seu tratamento na instituição.

Eu, _____, fui informada dos objetivos e da justificativa do estudo "Influência do Polimorfismo no Gene da *Patatin-Like Phospholipase Domain Containing 3* (PNPLA3) na Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA) em pacientes com Síndrome Dos Ovários Policísticos (SOP)", de forma clara e detalhada, conforme especificados no termo de consentimento livre e esclarecido. Recebi informações específicas sobre os procedimentos aos quais serei submetida, seus desconfortos e riscos, bem como da utilização de material biológico para estudo.

Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disso, terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa durante o andamento da mesma.

Eu discuti com o Dr. _____ sobre minha decisão em participar deste estudo. Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou foram lidas para mim.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

Anexo 2 (Continuação): Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Ficou claro que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Fui informada que todos os custos relacionados a exames diagnósticos e tratamento médico serão cobertos por verbas próprias do Projeto de Pesquisa.

Declaro ser de livre vontade minha participação nesta pesquisa, e que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Assinatura da paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha _____ Data ____ / ____ / ____

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

(Somente para o responsável do projeto)

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

Assinatura do responsável pelo estudo Data / /

São Paulo, _____ de _____ de 20__.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

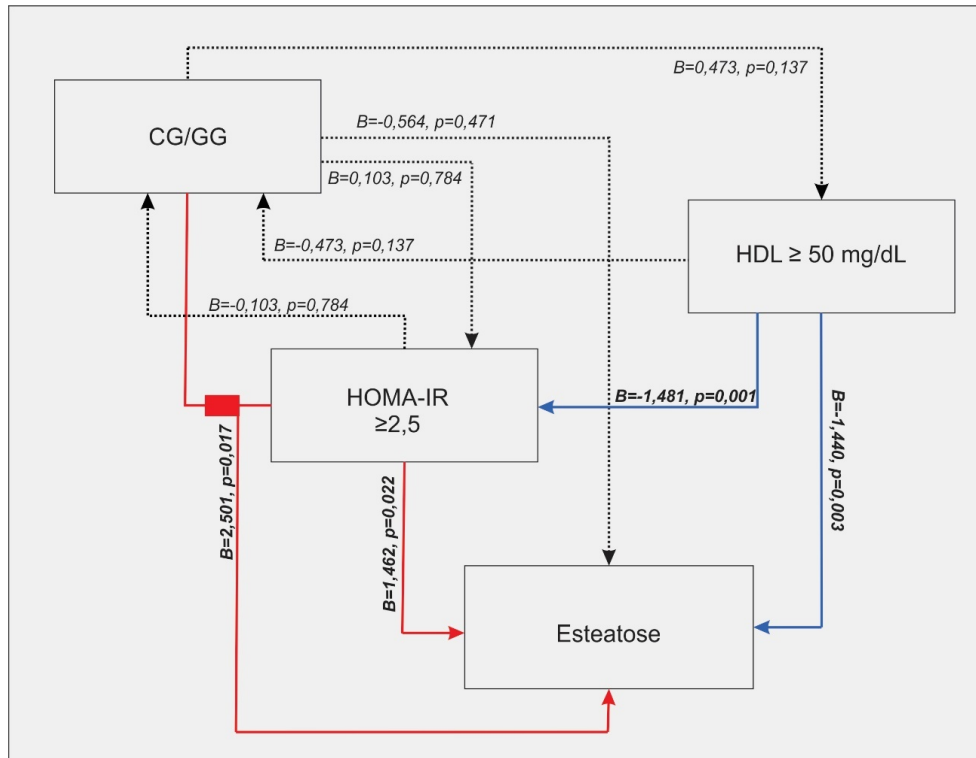
Anexo 3: Fatores qualitativos metabólicos e hormonais estratificados de acordo com o polimorfismo da PNPLA3 incluindo frequência absoluta (n), relativa (%) intervalo de confiança de 95% (IC95%) e nível descritivo (p-valor)

		PNPLA3				p-valor*
		CC (n = 82)		CG/GG (n = 81)		
		n	% (IC95%)	n	% (IC95%)	
US TV - Ovários policísticos						
	Normal	12	15,0% (8,5%-24,0%)	16	20,3% (12,6%-30,1%)	0,412
	Alterações morfológicas ao US	68	85,0% (76,0%-91,5%)	63	79,7% (69,9%-87,4%)	
Hiperandrogenismo/nemia						
	Não	3	3,7% (1,0%-9,4%)	4	4,9% (1,7%-11,3%)	0,720
	Sim	79	96,3% (90,6%-99,0%)	77	95,1% (88,7%-98,3%)	
Irregularidade menstrual						
	Não	4	4,9% (1,7%-11,2%)	3	3,7% (1,1%-9,6%)	1,000
	Sim	78	95,1% (88,8%-98,3%)	78	96,3% (90,4%-98,9%)	
Fenótipo SOP						
	A	62	76,5% (66,5%-84,7%)	56	70,9% (60,3%-80,0%)	0,843
	B	12	14,8% (8,4%-23,7%)	15	19,0% (11,5%-28,7%)	
	C	4	4,9% (1,7%-11,3%)	4	5,1% (1,7%-11,6%)	
	D	3	3,7% (1,1%-9,6%)	4	5,1% (1,7%-11,6%)	
Perfil glicêmico						
	Normal	16	19,5% (12,1%-29,1%)	16	20,0% (12,4%-29,7%)	0,102
	RI sem DM2 ou pré-diabetes	48	58,5% (47,7%-68,8%)	33	41,3% (30,9%-52,2%)	
	DM2	8	9,8% (4,7%-17,6%)	13	16,3% (9,4%-25,5%)	
	Pré-diabetes	10	12,2% (6,4%-20,6%)	18	22,5% (14,4%-32,5%)	
Uso de metformina						
	Não	52	63,4% (52,7%-73,2%)	56	69,1% (58,5%-78,4%)	0,508
	Sim	30	36,6% (26,8%-47,3%)	25	30,9% (21,6%-41,5%)	
Síndrome metabólica						
	Não	46	56,8% (45,9%-67,2%)	47	58,0% (47,2%-68,3%)	1,000
	Sim	35	43,2% (32,8%-54,1%)	34	42,0% (31,7%-52,8%)	
Hipotireoidismo						
	Não	74	91,4% (83,8%-96,1%)	72	88,9% (80,7%-94,4%)	0,793
	Sim	7	8,6% (3,9%-16,2%)	9	11,1% (5,6%-19,3%)	
HAS						
	Não	70	85,4% (76,5%-91,7%)	63	77,8% (67,9%-85,8%)	0,231
	Sim	12	14,6% (8,3%-23,5%)	18	22,2% (14,2%-32,1%)	
Tabagismo						
	Ausente	75	91,5% (84,0%-96,1%)	71	87,7% (79,2%-93,5%)	0,689
	Atual	4	4,9% (1,7%-11,2%)	5	6,2% (2,4%-13,0%)	
	Pregresso	3	3,7% (1,0%-9,4%)	5	6,2% (2,4%-13,0%)	
HOMA-IR ≥ 2,5						
	Não	18	22,2% (14,2%-32,1%)	22	27,8% (18,9%-38,4%)	0,467
	Sim	63	77,8% (67,9%-85,8%)	57	72,2% (61,6%-81,1%)	
Classificação por IMC						
	Normal	10	12,2% (6,4%-20,6%)	10	12,3% (6,5%-20,8%)	0,997
	Sobrepeso	18	22,0% (14,1%-31,8%)	19	23,5% (15,3%-33,5%)	
	Obesidade grau 1	22	26,8% (18,2%-37,1%)	21	25,9% (17,3%-36,2%)	
	Obesidade grau 2	20	24,4% (16,1%-34,5%)	21	25,9% (17,3%-36,2%)	
	Obesidade grau 3	12	14,6% (8,3%-23,5%)	10	12,3% (6,5%-20,8%)	

Valor p baseado no teste exato de Fischer.

ABREVIATURAS: US TV, ultrassom transvaginal; SOP, síndrome dos ovários policísticos; HAS, hipertensão arterial sistêmica; HOMA-IR, Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance; IMC, índice de massa corpórea.

Anexo 4: Resumo das relações existentes entre as variáveis estudadas no modelo proposto para predição de esteatose hepática. As linhas vermelhas representam associação positiva ou fator de risco. As linhas azuis representam associação negativa ou fator de proteção, enquanto as linhas pontilhadas pretas representam ausência de associação significante.



Abreviaturas: HDL, Lipoproteína de alta densidade; HOMA-IR, *Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance*.

Anexo 5: Fatores qualitativos ligados às características da SOP estratificados conforme a presença de fibrose clinicamente significativa incluindo frequência absoluta (n), relativa (%) intervalo de confiança de 95% (IC95%) e nível descritivo (p-valor)

		FIBROSE (EHT)				p-valor
		F0/F1 (n = 90)		≥ F2 (n = 28)		
		n	% (IC95%)	n	% (IC95%)	
US TV - Ovários policísticos						
	Normal	17	19,3% (12,1%-28,5%)	8	29,6% (15,1%-48,2%)	0,290
	Alterações morfológicas ao US	71	80,7% (71,5%-87,9%)	19	70,4% (51,8%-84,9%)	
Hiperandrogenismo/nemia						
	Não	2	2,2% (0,5%-6,9%)	2	7,1% (1,5%-21,0%)	0,238
	Sim	88	97,8% (93,1%-99,5%)	26	92,9% (79,0%-98,5%)	
Irregularidade menstrual						
		6	6,7% (2,8%-13,2%)	0	0,0%	0,333
		84	93,3% (86,8%-97,2%)	28	100%	
Fenótipo SOP						
	A	64	71,9% (62,0%-80,4%)	17	63,0% (44,2%-79,1%)	0,395
	B	17	19,1% (12,0%-28,2%)	7	25,9% (12,4%-44,3%)	
	C	6	6,7% (2,9%-13,4%)	1	3,7% (0,4%-16,0%)	
	D	2	2,2% (0,5%-7,0%)	2	7,4% (1,6%-21,7%)	

Valor de p baseado no teste exato de Fischer.

Abreviaturas: EHT, elastografia hepática transitória; US TV, ultrassom transvaginal; SOP, síndrome dos ovários policísticos.

Anexo 6: Fatores qualitativos ligados às características da SOP estratificados conforme a presença de fibrose avançada incluindo frequência absoluta (n), relativa (%) intervalo de confiança de 95% (IC95%) e nível descritivo (p-valor)

		FIBROSE (EHT)				p-valor
		≤ F2 (n = 104)		F3/F4 (n = 14)		
		n	%(IC95%)	n	%(IC95%)	
US TV - Ovários policísticos						
	Normal	21	20,6% (13,6%-29,2%)	4	30,8% (11,4%-57,7%)	0,475
	Alterações morfológicas ao US	81	79,4% (70,8%-86,4%)	9	69,2% (42,3%-88,6%)	
Hiperandrogenismo/nemia						
	Ausente	3	2,9% (0,8%-7,5%)	1	7,1% (0,8%-28,8%)	0,401
	Presente	10 1	97,1% (92,5%-99,2%)	13	92,9% (71,2%-99,2%)	
Irregularidade menstrual						
	Ausente	6	5,8% (2,4%-11,5%)	0	0,0%	1,000
	Presente	98	94,2% (88,5%-97,6%)	14	100,0%	
Fenótipo SOP						
	A	73	70,9% (61,6%-79,0%)	8	61,5% (35,0%-83,5%)	0,493
	B	21	20,4% (13,5%-28,9%)	3	23,1% (7,0%-49,7%)	
	C	6	5,8% (2,5%-11,6%)	1	7,7% (0,8%-30,7%)	
	D	3	2,9% (0,8%-7,6%)	1	7,7% (0,8%-30,7%)	

Valor de p baseado no teste exato de Fischer.

Abreviaturas: EHT: elastografia hepática transitória; US TV, ultrassom transvaginal; SOP, síndrome dos ovários policísticos.

8. Bibliografia

8. Bibliografia

1. (EASL) EAftSotL, (EASD) EAftSoD, (EASO) EAftSoO. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2016;64(6):1388-402.
2. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. *Gastroenterology.* 2012;142(7):1592-609.
3. Stefan N, Schick F, Häring HU. Causes, Characteristics, and Consequences of Metabolically Unhealthy Normal Weight in Humans. *Cell Metab.* 2017;26(2):292-300.
4. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011;34(3):274-85.
5. Lazo M, Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: a global perspective. *Semin Liver Dis.* 2008;28(4):339-50.
6. Byrne CD, Targher G. NAFLD: a multisystem disease. *J Hepatol.* 2015;62(1 Suppl):S47-64.
7. Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, Anstee QM, Targher G, Romero-Gomez M, et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. *J Hepatol.* 2020.
8. Softic S, Cohen DE, Kahn CR. Role of Dietary Fructose and Hepatic De Novo Lipogenesis in Fatty Liver Disease. *Dig Dis Sci.* 2016;61(5):1282-93.
9. (AISF) IAftSotL. AISF position paper on nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): Updates and future directions. *Dig Liver Dis.* 2017;49(5):471-83.
10. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest.* 2005;115(5):1343-51.
11. Watt MJ, Miotto PM, De Nardo W, Montgomery MK. The Liver as an Endocrine Organ-Linking NAFLD and Insulin Resistance. *Endocr Rev.* 2019;40(5):1367-93.
12. Fujii H, Kawada N, Japan Study Group Of Nafld Jsg-Nafld. The Role of Insulin Resistance and Diabetes in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci.* 2020;21(11).
13. Parthasarathy G, Revelo X, Malhi H. Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis: An Overview. *Hepatol Commun.* 2020;4(4):478-92.
14. Lonardo A, Ballestri S, Marchesini G, Angulo P, Loria P. Nonalcoholic fatty liver disease: a precursor of the metabolic syndrome. *Dig Liver Dis.* 2015;47(3):181-90.
15. Ballestri S, Zona S, Targher G, Romagnoli D, Baldelli E, Nascimbeni F, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with an almost twofold increased risk of incident type 2 diabetes and metabolic syndrome. Evidence from a systematic review and meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2016;31(5):936-44.
16. Hotamisligil GS. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature.* 2017;542(7640):177-85.
17. Gehrke N, Schattenberg JM. Metabolic Inflammation-A Role for Hepatic Inflammatory Pathways as Drivers of Comorbidities in Nonalcoholic Fatty Liver Disease? *Gastroenterology.* 2020;158(7):1929-47.e6.
18. Satapathy SK, Sanyal AJ. Epidemiology and Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Semin Liver Dis.* 2015;35(3):221-35.
19. Wong VW, Wong GL, Choi PC, Chan AW, Li MK, Chan HY, et al. Disease progression of non-alcoholic fatty liver disease: a prospective study with paired liver biopsies at 3 years. *Gut.* 2010;59(7):969-74.

20. Pais R, Charlotte F, Fedchuk L, Bedossa P, Lebray P, Poynard T, et al. A systematic review of follow-up biopsies reveals disease progression in patients with non-alcoholic fatty liver. *J Hepatol.* 2013;59(3):550-6.
21. McPherson S, Hardy T, Henderson E, Burt AD, Day CP, Anstee QM. Evidence of NAFLD progression from steatosis to fibrosing-steatohepatitis using paired biopsies: implications for prognosis and clinical management. *J Hepatol.* 2015;62(5):1148-55.
22. Calzadilla Bertot L, Adams LA. The Natural Course of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci.* 2016;17(5).
23. Singh S, Allen AM, Wang Z, Prokop LJ, Murad MH, Loomba R. Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver vs nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2015;13(4):643-54.e1-9; quiz e39-40.
24. Rinella ME, Sanyal AJ. Management of NAFLD: a stage-based approach. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2016;13(4):196-205.
25. Kim D, Kim WR, Kim HJ, Therneau TM. Association between noninvasive fibrosis markers and mortality among adults with nonalcoholic fatty liver disease in the United States. *Hepatology.* 2013;57(4):1357-65.
26. Dulai PS, Singh S, Patel J, Soni M, Prokop LJ, Younossi Z, et al. Increased risk of mortality by fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease: Systematic review and meta-analysis. *Hepatology.* 2017;65(5):1557-65.
27. Anstee QM, Daly AK, Day CP. Genetics of alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis.* 2011;31(2):128-46.
28. Guerrero R, Vega GL, Grundy SM, Browning JD. Ethnic differences in hepatic steatosis: an insulin resistance paradox? *Hepatology.* 2009;49(3):791-801.
29. Schwimmer JB, Celedon MA, Lavine JE, Salem R, Campbell N, Schork NJ, et al. Heritability of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* 2009;136(5):1585-92.
30. Brouwers MC, Cantor RM, Kono N, Yoon JL, van der Kallen CJ, Bilderbeek-Beckers MA, et al. Heritability and genetic loci of fatty liver in familial combined hyperlipidemia. *J Lipid Res.* 2006;47(12):2799-807.
31. Makkonen J, Pietiläinen KH, Rissanen A, Kaprio J, Yki-Järvinen H. Genetic factors contribute to variation in serum alanine aminotransferase activity independent of obesity and alcohol: a study in monozygotic and dizygotic twins. *J Hepatol.* 2009;50(5):1035-42.
32. Anstee QM, Targher G, Day CP. Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013;10(6):330-44.
33. Trépo E, Valenti L. Update on NAFLD genetics: From new variants to the clinic. *J Hepatol.* 2020;72(6):1196-209.
34. Walker RW, Belbin GM, Sorokin EP, Van Vleck T, Wojcik GL, Moscati A, et al. A common variant in PNPLA3 is associated with age at diagnosis of NAFLD in patients from a multi-ethnic biobank. *J Hepatol.* 2020;72(6):1070-81.
35. Anstee QM, Darlay R, Cockell S, Meroni M, Govaere O, Tiniakos D, et al. Genome-wide association study of non-alcoholic fatty liver and steatohepatitis in a histologically characterised cohort. *J Hepatol.* 2020;73(3):505-15.
36. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet.* 2008;40(12):1461-5.
37. Tai CM, Huang CK, Tu HP, Hwang JC, Yeh ML, Huang CF, et al. Interactions of a PPARGC1A Variant and a PNPLA3 Variant Affect Nonalcoholic Steatohepatitis in Severely Obese Taiwanese Patients. *Medicine (Baltimore).* 2016;95(12):e3120.
38. Park JH, Cho B, Kwon H, Prilutsky D, Yun JM, Choi HC, et al. I148M variant in PNPLA3 reduces central adiposity and metabolic disease risks while increasing nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* 2015;35(12):2537-46.
39. Kollerits B, Coassin S, Kiechl S, Hunt SC, Paulweber B, Willeit J, et al. A common variant in the adiponutrin gene influences liver enzyme values. *J Med Genet.* 2010;47(2):116-9.

40. Sookoian S, Castaño GO, Burgueño AL, Gianotti TF, Rosselli MS, Pirola CJ. A nonsynonymous gene variant in the adiponutrin gene is associated with nonalcoholic fatty liver disease severity. *J Lipid Res.* 2009;50(10):2111-6.
41. Rotman Y, Koh C, Zmuda JM, Kleiner DE, Liang TJ, CRN N. The association of genetic variability in patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3) with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2010;52(3):894-903.
42. Huang Y, He S, Li JZ, Seo YK, Osborne TF, Cohen JC, et al. A feed-forward loop amplifies nutritional regulation of PNPLA3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(17):7892-7.
43. Kumari M, Schoiswohl G, Chitraju C, Paar M, Cornaciu I, Rangrez AY, et al. Adiponutrin functions as a nutritionally regulated lysophosphatidic acid acyltransferase. *Cell Metab.* 2012;15(5):691-702.
44. Smagris E, BasuRay S, Li J, Huang Y, Lai KM, Gromada J, et al. Pnpla3I148M knockin mice accumulate PNPLA3 on lipid droplets and develop hepatic steatosis. *Hepatology.* 2015;61(1):108-18.
45. He S, McPhaul C, Li JZ, Garuti R, Kinch L, Grishin NV, et al. A sequence variation (I148M) in PNPLA3 associated with nonalcoholic fatty liver disease disrupts triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem.* 2010;285(9):6706-15.
46. Huang Y, Cohen JC, Hobbs HH. Expression and characterization of a PNPLA3 protein isoform (I148M) associated with nonalcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem.* 2011;286(43):37085-93.
47. Pingitore P, Pirazzi C, Mancina RM, Motta BM, Indiveri C, Pujia A, et al. Recombinant PNPLA3 protein shows triglyceride hydrolase activity and its I148M mutation results in loss of function. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1841(4):574-80.
48. Basantani MK, Sitnick MT, Cai L, Brenner DS, Gardner NP, Li JZ, et al. Pnpla3/Adiponutrin deficiency in mice does not contribute to fatty liver disease or metabolic syndrome. *J Lipid Res.* 2011;52(2):318-29.
49. Chen W, Chang B, Li L, Chan L. Patatin-like phospholipase domain-containing 3/adiponutrin deficiency in mice is not associated with fatty liver disease. *Hepatology.* 2010;52(3):1134-42.
50. Qiao A, Liang J, Ke Y, Li C, Cui Y, Shen L, et al. Mouse patatin-like phospholipase domain-containing 3 influences systemic lipid and glucose homeostasis. *Hepatology.* 2011;54(2):509-21.
51. Li JZ, Huang Y, Karaman R, Ivanova PT, Brown HA, Roddy T, et al. Chronic overexpression of PNPLA3I148M in mouse liver causes hepatic steatosis. *J Clin Invest.* 2012;122(11):4130-44.
52. BasuRay S, Smagris E, Cohen JC, Hobbs HH. The PNPLA3 variant associated with fatty liver disease (I148M) accumulates on lipid droplets by evading ubiquitylation. *Hepatology.* 2017;66(4):1111-24.
53. Dongiovanni P, Valenti L. Genetics of nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism.* 2016;65(8):1026-37.
54. Valenti L, Dongiovanni P. Mutant PNPLA3 I148M protein as pharmacological target for liver disease. *Hepatology.* 2017;66(4):1026-8.
55. Pirazzi C, Valenti L, Motta BM, Pingitore P, Hedfalk K, Mancina RM, et al. PNPLA3 has retinyl-palmitate lipase activity in human hepatic stellate cells. *Hum Mol Genet.* 2014;23(15):4077-85.
56. Pingitore P, Dongiovanni P, Motta BM, Meroni M, Lepore SM, Mancina RM, et al. PNPLA3 overexpression results in reduction of proteins predisposing to fibrosis. *Hum Mol Genet.* 2016;25(23):5212-22.
57. Mondul A, Mancina RM, Merlo A, Dongiovanni P, Rametta R, Montalcini T, et al. PNPLA3 I148M Variant Influences Circulating Retinol in Adults with Nonalcoholic Fatty Liver Disease or Obesity. *J Nutr.* 2015;145(8):1687-91.
58. Trépo E, Romeo S, Zucman-Rossi J, Nahon P. PNPLA3 gene in liver diseases. *J Hepatol.* 2016;65(2):399-412.
59. Nishioji K, Mochizuki N, Kobayashi M, Kamaguchi M, Sumida Y, Nishimura T, et al. The Impact of PNPLA3 rs738409 Genetic Polymorphism and Weight Gain ≥ 10 kg after Age 20 on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Non-Obese Japanese Individuals. *PLoS One.* 2015;10(10):e0140427.

60. Stender S, Kozlitina J, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A, Hobbs HH, Cohen JC. Adiposity amplifies the genetic risk of fatty liver disease conferred by multiple loci. *Nat Genet.* 2017;49(6):842-7.
61. Mann JP, Anstee QM. NAFLD: PNPLA3 and obesity: a synergistic relationship in NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017;14(9):506-7.
62. Mangge H, Baumgartner BG, Zelzer S, Prüller F, Schnedl WJ, Reininghaus EZ, et al. Patatin-like phospholipase 3 (rs738409) gene polymorphism is associated with increased liver enzymes in obese adolescents and metabolic syndrome in all ages. *Aliment Pharmacol Ther.* 2015;42(1):99-105.
63. Santoro N, Kursawe R, D'Adamo E, Dykas DJ, Zhang CK, Bale AE, et al. A common variant in the patatin-like phospholipase 3 gene (PNPLA3) is associated with fatty liver disease in obese children and adolescents. *Hepatology.* 2010;52(4):1281-90.
64. Shen J, Wong GL, Chan HL, Chan HY, Yeung DK, Chan RS, et al. PNPLA3 gene polymorphism accounts for fatty liver in community subjects without metabolic syndrome. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014;39(5):532-9.
65. Romeo S, Sentinelli F, Dash S, Yeo GS, Savage DB, Leonetti F, et al. Morbid obesity exposes the association between PNPLA3 I148M (rs738409) and indices of hepatic injury in individuals of European descent. *Int J Obes (Lond).* 2010;34(1):190-4.
66. Speliotes EK, Butler JL, Palmer CD, Voight BF, Hirschhorn JN, Consortium G, et al. PNPLA3 variants specifically confer increased risk for histologic nonalcoholic fatty liver disease but not metabolic disease. *Hepatology.* 2010;52(3):904-12.
67. Sookoian S, Pirola CJ. Meta-analysis of the influence of I148M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2011;53(6):1883-94.
68. Del Ben M, Polimeni L, Brancorsini M, Di Costanzo A, D'Erasmo L, Baratta F, et al. Non-alcoholic fatty liver disease, metabolic syndrome and patatin-like phospholipase domain-containing protein3 gene variants. *Eur J Intern Med.* 2014;25(6):566-70.
69. Shen J, Wong GL, Chan HL, Chan RS, Chan HY, Chu WC, et al. PNPLA3 gene polymorphism and response to lifestyle modification in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2015;30(1):139-46.
70. Legro RS, Arslanian SA, Ehrmann DA, Hoeger KM, Murad MH, Pasquali R, et al. Diagnosis and treatment of polycystic ovary syndrome: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(12):4565-92.
71. LEVENTHAL ML, COHEN MR. Bilateral polycystic ovaries, the Stein syndrome. *Am J Obstet Gynecol.* 1951;61(5):1034-46.
72. McCartney CR, Marshall JC. CLINICAL PRACTICE. Polycystic Ovary Syndrome. *N Engl J Med.* 2016;375(1):54-64.
73. Spritzer PM, Lecke SB, Satler F, Morsch DM. Adipose tissue dysfunction, adipokines, and low-grade chronic inflammation in polycystic ovary syndrome. *Reproduction.* 2015;149(5):R219-27.
74. Çakıroğlu Y, Vural F, Vural B. The inflammatory markers in polycystic ovary syndrome: association with obesity and IVF outcomes. *J Endocrinol Invest.* 2016;39(8):899-907.
75. Knochelhauer ES, Key TJ, Kahsar-Miller M, Waggoner W, Boots LR, Azziz R. Prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected black and white women of the southeastern United States: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(9):3078-82.
76. Diamanti-Kandarakis E, Kouli CR, Bergiele AT, Filandra FA, Tsianateli TC, Spina GG, et al. A survey of the polycystic ovary syndrome in the Greek island of Lesbos: hormonal and metabolic profile. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(11):4006-11.
77. Paschou SA, Polyzos SA, Anagnostis P, Goulis DG, Kanaka-Gantenbein C, Lambrinoudaki I, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in women with polycystic ovary syndrome. *Endocrine.* 2020;67(1):1-8.
78. De Leo V, Musacchio MC, Cappelli V, Massaro MG, Morgante G, Petraglia F. Genetic, hormonal and metabolic aspects of PCOS: an update. *Reprod Biol Endocrinol.* 2016;14(1):38.

79. Durmus U, Duran C, Ecirli S. Visceral adiposity index levels in overweight and/or obese, and non-obese patients with polycystic ovary syndrome and its relationship with metabolic and inflammatory parameters. *J Endocrinol Invest.* 2017;40(5):487-97.
80. Baranova A, Tran TP, Biredinc A, Younossi ZM. Systematic review: association of polycystic ovary syndrome with metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011;33(7):801-14.
81. Gambineri A, Patton L, Altieri P, Pagotto U, Pizzi C, Manzoli L, et al. Polycystic ovary syndrome is a risk factor for type 2 diabetes: results from a long-term prospective study. *Diabetes.* 2012;61(9):2369-74.
82. Kakoly NS, Moran LJ, Teede HJ, Joham AE. Cardiometabolic risks in PCOS: a review of the current state of knowledge. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 2019;14(1):23-33.
83. Vryonidou A, Papatheodorou A, Tavridou A, Terzi T, Loi V, Vatalas IA, et al. Association of hyperandrogenemic and metabolic phenotype with carotid intima-media thickness in young women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(5):2740-6.
84. Sprung VS, Jones H, Pugh CJ, Aziz NF, Daousi C, Kemp GJ, et al. Endothelial dysfunction in hyperandrogenic polycystic ovary syndrome is not explained by either obesity or ectopic fat deposition. *Clin Sci (Lond).* 2014;126(1):67-74.
85. Rocha ALL, Faria LC, Guimarães TCM, Moreira GV, Cândido AL, Couto CA, et al. Non-alcoholic fatty liver disease in women with polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. *J Endocrinol Invest.* 2017.
86. Macut D, Božić-Antić I, Bjekić-Macut J, Tziomalos K. MANAGEMENT OF ENDOCRINE DISEASE: Polycystic ovary syndrome and nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Endocrinol.* 2017;177(3):R145-R58.
87. Hossain N, Stepanova M, Afendy A, Nader F, Younossi Y, Rafiq N, et al. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in patients with polycystic ovarian syndrome (PCOS). *Scand J Gastroenterol.* 2011;46(4):479-84.
88. Brzozowska MM, Ostapowicz G, Weltman MD. An association between non-alcoholic fatty liver disease and polycystic ovarian syndrome. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009;24(2):243-7.
89. Targher G, Rossini M, Lonardo A. Evidence that non-alcoholic fatty liver disease and polycystic ovary syndrome are associated by necessity rather than chance: a novel hepato-ovarian axis? *Endocrine.* 2016;51(2):211-21.
90. Salva-Pastor N, Chávez-Tapia NC, Uribe M, Nuño-Lámbarri N. Understanding the association of polycystic ovary syndrome and non-alcoholic fatty liver disease. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2019;194:105445.
91. Jones H, Sprung VS, Pugh CJ, Daousi C, Irwin A, Aziz N, et al. Polycystic ovary syndrome with hyperandrogenism is characterized by an increased risk of hepatic steatosis compared to nonhyperandrogenic PCOS phenotypes and healthy controls, independent of obesity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(10):3709-16.
92. Tan S, Bechmann LP, Benson S, Dietz T, Eichner S, Hahn S, et al. Apoptotic markers indicate nonalcoholic steatohepatitis in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(1):343-8.
93. Baranova A, Tran TP, Afendy A, Wang L, Shamsaddini A, Mehta R, et al. Molecular signature of adipose tissue in patients with both non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and polycystic ovarian syndrome (PCOS). *J Transl Med.* 2013;11:133.
94. Kelley CE, Brown AJ, Diehl AM, Setji TL. Review of nonalcoholic fatty liver disease in women with polycystic ovary syndrome. *World J Gastroenterol.* 2014;20(39):14172-84.
95. Ma RC, Liu KH, Lam PM, Cheung LP, Tam WH, Ko GT, et al. Sonographic measurement of mesenteric fat predicts presence of fatty liver among subjects with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(3):799-807.
96. Blouin K, Boivin A, Tchernof A. Androgens and body fat distribution. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2008;108(3-5):272-80.

97. O'Connor A, Phelan N, Tun TK, Boran G, Gibney J, Roche HM. High-molecular-weight adiponectin is selectively reduced in women with polycystic ovary syndrome independent of body mass index and severity of insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(3):1378-85.
98. Xu A, Chan KW, Hoo RL, Wang Y, Tan KC, Zhang J, et al. Testosterone selectively reduces the high molecular weight form of adiponectin by inhibiting its secretion from adipocytes. *J Biol Chem.* 2005;280(18):18073-80.
99. Cankaya S, Demir B, Aksakal SE, Dilbaz B, Demirtas C, Goktolga U. Insulin resistance and its relationship with high molecular weight adiponectin in adolescents with polycystic ovary syndrome and a maternal history of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2014;102(3):826-30.
100. Heiker JT, Kosel D, Beck-Sickinger AG. Molecular mechanisms of signal transduction via adiponectin and adiponectin receptors. *Biol Chem.* 2010;391(9):1005-18.
101. Jung TW, Lee YJ, Lee MW, Kim SM. Full-length adiponectin protects hepatocytes from palmitate-induced apoptosis via inhibition of c-Jun NH2 terminal kinase. *FEBS J.* 2009;276(8):2278-84.
102. Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin? *Hepatology.* 2004;40(1):46-54.
103. Polyzos SA, Toulis KA, Goulis DG, Zavos C, Kountouras J. Serum total adiponectin in nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Metabolism.* 2011;60(3):313-26.
104. Targher G, Bertolini L, Rodella S, Zoppini G, Scala L, Zenari L, et al. Associations between plasma adiponectin concentrations and liver histology in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2006;64(6):679-83.
105. Ma H, Gomez V, Lu L, Yang X, Wu X, Xiao SY. Expression of adiponectin and its receptors in livers of morbidly obese patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009;24(2):233-7.
106. Kaser S, Moschen A, Cayon A, Kaser A, Crespo J, Pons-Romero F, et al. Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis. *Gut.* 2005;54(1):117-21.
107. Petta S, Ciresi A, Bianco J, Geraci V, Boemi R, Galvano L, et al. Insulin resistance and hyperandrogenism drive steatosis and fibrosis risk in young females with PCOS. *PLoS One.* 2017;12(11):e0186136.
108. Stepto NK, Cassar S, Joham AE, Hutchison SK, Harrison CL, Goldstein RF, et al. Women with polycystic ovary syndrome have intrinsic insulin resistance on euglycaemic-hyperinsulinaemic clamp. *Hum Reprod.* 2013;28(3):777-84.
109. Dunaif A, Segal KR, Futterweit W, Dobrjansky A. Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. *Diabetes.* 1989;38(9):1165-74.
110. Cerda C, Pérez-Ayuso RM, Riquelme A, Soza A, Villaseca P, Sir-Petermann T, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in women with polycystic ovary syndrome. *J Hepatol.* 2007;47(3):412-7.
111. Setji TL, Holland ND, Sanders LL, Pereira KC, Diehl AM, Brown AJ. Nonalcoholic steatohepatitis and nonalcoholic Fatty liver disease in young women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(5):1741-7.
112. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 2000;894:i-xii, 1-253.
113. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2005;41(6):1313-21.
114. Mueller S, Sandrin L. Liver stiffness: a novel parameter for the diagnosis of liver disease. *Hepat Med.* 2010;2:49-67.
115. de Lédinghen V, Vergniol J. Transient elastography for the diagnosis of liver fibrosis. *Expert Rev Med Devices.* 2010;7(6):811-23.
116. Sasso M, Beaugrand M, de Lédinghen V, Douvin C, Marcellin P, Poupon R, et al. Controlled attenuation parameter (CAP): a novel VCTE™ guided ultrasonic attenuation measurement for the

- evaluation of hepatic steatosis: preliminary study and validation in a cohort of patients with chronic liver disease from various causes. *Ultrasound Med Biol*. 2010;36(11):1825-35.
117. Shah AG, Lydecker A, Murray K, Tetri BN, Contos MJ, Sanyal AJ, et al. Comparison of noninvasive markers of fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009;7(10):1104-12.
 118. Cheah MC, McCullough AJ, Goh GB. Current Modalities of Fibrosis Assessment in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *J Clin Transl Hepatol*. 2017;5(3):261-71.
 119. Group REA-SPCW. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2004;81(1):19-25.
 120. Teede HJ, Misso ML, Costello MF, Dokras A, Laven J, Moran L, et al. Recommendations from the international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2018;110(3):364-79.
 121. Hatch R, Rosenfield RL, Kim MH, Tredway D. Hirsutism: implications, etiology, and management. *Am J Obstet Gynecol*. 1981;140(7):815-30.
 122. Yildiz BO, Bolour S, Woods K, Moore A, Azziz R. Visually scoring hirsutism. *Hum Reprod Update*. 2010;16(1):51-64.
 123. Spritzer PM. Polycystic ovary syndrome: reviewing diagnosis and management of metabolic disturbances. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2014;58(2):182-7.
 124. Azziz R, Carmina E, Chen Z, Dunaif A, Laven JS, Legro RS, et al. Polycystic ovary syndrome. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16057.
 125. Handelsman Y, Bloomgarden ZT, Grunberger G, Umpierrez G, Zimmerman RS, Bailey TS, et al. American association of clinical endocrinologists and american college of endocrinology - clinical practice guidelines for developing a diabetes mellitus comprehensive care plan - 2015. *Endocr Pract*. 2015;21 Suppl 1:1-87.
 126. Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, Casey DE, Collins KJ, Dennison Himmelfarb C, et al. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2017.
 127. Faludi AA, Izar MCO, Saraiva JFK, Chacra APM, Bianco HT, Afiune A, et al. *Arq Bras Cardiol* 2017. p. 1-76.
 128. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28(7):412-9.
 129. Vasques AC, Rosado LE, Cássia GAlfenas R, Geloneze B. [Critical analysis on the use of the homeostasis model assessment (HOMA) indexes in the evaluation of the insulin resistance and the pancreatic beta cells functional capacity]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008;52(1):32-9.
 130. Grundy SM, Cleeman JJ, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*. 2005;112(17):2735-52.
 131. Macut D, Tziomalos K, Božić-Antić I, Bjekić-Macut J, Katsikis I, Papadakis E, et al. Non-alcoholic fatty liver disease is associated with insulin resistance and lipid accumulation product in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 2016;31(6):1347-53.
 132. Zueff LF, Martins WP, Vieira CS, Ferriani RA. Ultrasonographic and laboratory markers of metabolic and cardiovascular disease risk in obese women with polycystic ovary syndrome. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2012;39(3):341-7.
 133. Gutierrez-Grobe Y, Ponciano-Rodríguez G, Ramos MH, Uribe M, Méndez-Sánchez N. Prevalence of non alcoholic fatty liver disease in premenopausal, postmenopausal and polycystic ovary syndrome women. The role of estrogens. *Ann Hepatol*. 2010;9(4):402-9.
 134. Lizneva D, Suturina L, Walker W, Brakta S, Gavrilova-Jordan L, Azziz R. Criteria, prevalence, and phenotypes of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2016;106(1):6-15.

135. Chan JL, Kar S, Vanky E, Morin-Papunen L, Piltonen T, Puurunen J, et al. Racial and ethnic differences in the prevalence of metabolic syndrome and its components of metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome: a regional cross-sectional study. *Am J Obstet Gynecol*. 2017;217(2):189.e1-e8.
136. Taranto DOL, Guimarães TCM, Couto CA, Cândido AL, Azevedo RCS, Mattos FS, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in women with polycystic ovary syndrome: associated factors and noninvasive fibrosis staging in a single Brazilian center. *Arch Endocrinol Metab*. 2020;64(3):235-42.
137. Oliveira AIN, Malta FM, Zitelli PMY, Salles APM, Gomes-Gouvea MS, Nastri ACS, et al. The role of PNPLA3 and TM6SF2 polymorphisms on liver fibrosis and metabolic abnormalities in Brazilian patients with chronic hepatitis C. *BMC Gastroenterol*. 2021;21(1):81.
138. Mazo DF, Malta FM, Stefano JT, Salles APM, Gomes-Gouvea MS, Nastri ACS, et al. Validation of PNPLA3 polymorphisms as risk factor for NAFLD and liver fibrosis in an admixed population. *Ann Hepatol*. 2019;18(3):466-71.
139. Wolf WM, Wattick RA, Kinkade ON, Olfert MD. Geographical Prevalence of Polycystic Ovary Syndrome as Determined by Region and Race/Ethnicity. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(11).
140. de Oliveira CP, Stefano JT, de Siqueira ER, Silva LS, de Campos Mazo DF, Lima VM, et al. Combination of N-acetylcysteine and metformin improves histological steatosis and fibrosis in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res*. 2008;38(2):159-65.
141. Won YB, Seo SK, Yun BH, Cho S, Choi YS, Lee BS. Non-alcoholic fatty liver disease in polycystic ovary syndrome women. *Sci Rep*. 2021;11(1):7085.
142. Reid SP, Kao CN, Pasch L, Shinkai K, Cedars MI, Huddleston HG. Ovarian morphology is associated with insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome: a cross sectional study. *Fertil Res Pract*. 2017;3:8.
143. Piazzolla VA, Mangia A. Noninvasive Diagnosis of NAFLD and NASH. *Cells*. 2020;9(4).
144. Yang N, Lu Y, Cao L, Lu M. The association between non-alcoholic fatty liver disease and serum ferritin levels in American adults. *J Clin Lab Anal*. 2022:e24225.
145. Du SX, Lu LL, Geng N, Victor DW, Chen LZ, Wang C, et al. Association of serum ferritin with non-alcoholic fatty liver disease: a meta-analysis. *Lipids Health Dis*. 2017;16(1):228.
146. Dongiovanni P, Fracanzani AL, Fargion S, Valenti L. Iron in fatty liver and in the metabolic syndrome: a promising therapeutic target. *J Hepatol*. 2011;55(4):920-32.
147. Bugianesi E, Manzini P, D'Antico S, Vanni E, Longo F, Leone N, et al. Relative contribution of iron burden, HFE mutations, and insulin resistance to fibrosis in nonalcoholic fatty liver. *Hepatology*. 2004;39(1):179-87.
148. Kim CW, Chang Y, Sung E, Shin H, Ryu S. Serum ferritin levels predict incident non-alcoholic fatty liver disease in healthy Korean men. *Metabolism*. 2012;61(8):1182-8.
149. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018;15(1):11-20.
150. Shi W, Zhao Q, Zhao X, Xing C, He B. Analysis of Endocrine and Metabolic Indexes in Non-Obese Patients with Polycystic Ovary Syndrome and Its Compare with Obese Patients. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2021;14:4275-81.
151. Armandi A, Rosso C, Caviglia GP, Bugianesi E. Insulin Resistance across the Spectrum of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Metabolites*. 2021;11(3).
152. Ramezani-Binabaj M, Motalebi M, Karimi-Sari H, Rezaee-Zavareh MS, Alavian SM. Are women with polycystic ovarian syndrome at a high risk of non-alcoholic Fatty liver disease; a meta-analysis. *Hepat Mon*. 2014;14(11):e23235.
153. Kantartzis K, Machann J, Schick F, Fritsche A, Häring HU, Stefan N. The impact of liver fat vs visceral fat in determining categories of prediabetes. *Diabetologia*. 2010;53(5):882-9.
154. Trojak A, Waluś-Miarka M, Woźniakiewicz E, Małeck MT, Idzior-Waluś B. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with low HDL cholesterol and coronary angioplasty in patients with type 2 diabetes. *Med Sci Monit*. 2013;19:1167-72.

155. Zhang J, Hu J, Zhang C, Jiao Y, Kong X, Wang W. Analyses of risk factors for polycystic ovary syndrome complicated with non-alcoholic fatty liver disease. *Exp Ther Med*. 2018;15(5):4259-64.
156. Arguello G, Balboa E, Arrese M, Zanlungo S. Recent insights on the role of cholesterol in non-alcoholic fatty liver disease. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1852(9):1765-78.
157. Hamaguchi M, Kojima T, Ohbora A, Takeda N, Fukui M, Kato T. Aging is a risk factor of nonalcoholic fatty liver disease in premenopausal women. *World J Gastroenterol*. 2012;18(3):237-43.
158. Falcetta P, Benelli E, Molinaro A, Di Cosmo C, Bagattini B, Del Ghianda S, et al. Effect of aging on clinical features and metabolic complications of women with polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Invest*. 2021;44(12):2725-33.
159. de Medeiros SF, Yamamoto MMW, Souto de Medeiros MA, Barbosa BB, Soares JM, Baracat EC. Changes in clinical and biochemical characteristics of polycystic ovary syndrome with advancing age. *Endocr Connect*. 2020;9(2):74-89.
160. Tantanavipas S, Vallibhakara O, Sobhonslidsuk A, Phongkitkarun S, Vallibhakara SA, Promson K, et al. Abdominal Obesity as a Predictive Factor of Nonalcoholic Fatty Liver Disease Assessed by Ultrasonography and Transient Elastography in Polycystic Ovary Syndrome and Healthy Women. *Biomed Res Int*. 2019;2019:9047324.
161. Zhang X, Wong GL, Wong VW. Application of transient elastography in nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Mol Hepatol*. 2020;26(2):128-41.
162. Karlas T, Petroff D, Sasso M, Fan JG, Mi YQ, de Lédinghen V, et al. Individual patient data meta-analysis of controlled attenuation parameter (CAP) technology for assessing steatosis. *J Hepatol*. 2017;66(5):1022-30.
163. Petta S, Cammà C, DI Marco V, Calvaruso V, Enea M, Bronte F, et al. Insulin resistance is a major determinant of liver stiffness in nondiabetic patients with HCV genotype 1 chronic hepatitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2009;30(6):603-13.
164. Wong GL, Chan HL, Choi PC, Chan AW, Lo AO, Chim AM, et al. Association between anthropometric parameters and measurements of liver stiffness by transient elastography. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013;11(3):295-302.e1-3.
165. Wong VW, Irls M, Wong GL, Shili S, Chan AW, Merrouche W, et al. Unified interpretation of liver stiffness measurement by M and XL probes in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*. 2019;68(11):2057-64.
166. Ferraioli G, Wong VW, Castera L, Berzigotti A, Sporea I, Dietrich CF, et al. Liver Ultrasound Elastography: An Update to the World Federation for Ultrasound in Medicine and Biology Guidelines and Recommendations. *Ultrasound Med Biol*. 2018;44(12):2419-40.
167. Dietrich CF, Bamber J, Berzigotti A, Bota S, Cantisani V, Castera L, et al. EFSUMB Guidelines and Recommendations on the Clinical Use of Liver Ultrasound Elastography, Update 2017 (Long Version). *Ultraschall Med*. 2017;38(4):e16-e47.
168. Cotter TG, Rinella M. Nonalcoholic Fatty Liver Disease 2020: The State of the Disease. *Gastroenterology*. 2020;158(7):1851-64.
169. Shengir M, Krishnamurthy S, Ghali P, Deschenes M, Wong P, Chen T, et al. Prevalence and predictors of nonalcoholic fatty liver disease in South Asian women with polycystic ovary syndrome. *World J Gastroenterol*. 2020;26(44):7046-60.
170. Salva-Pastor N, López-Sánchez GN, Chávez-Tapia NC, Audifred-Salomón JR, Niebla-Cárdenas D, Topete-Estrada R, et al. Polycystic ovary syndrome with feasible equivalence to overweight as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease development and severity in Mexican population. *Ann Hepatol*. 2020;19(3):251-7.
171. Polyzos SA, Goulis DG, Kountouras J, Mintziori G, Chatzis P, Papadakis E, et al. Non-alcoholic fatty liver disease in women with polycystic ovary syndrome: assessment of non-invasive indices predicting hepatic steatosis and fibrosis. *Hormones (Athens)*. 2014;13(4):519-31.
172. Sarkar M, Terrault N, Duwaerts CC, Tien P, Cedars MI, Huddleston H. The Association of Hispanic Ethnicity with Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Polycystic Ovary Syndrome. *Curr Opin Gynecol Obstet*. 2018;1(1):24-33.

173. Andreasson A, Carlsson AC, Önnérhag K, Hagström H. Waist/Hip Ratio Better Predicts Development of Severe Liver Disease Within 20 Years Than Body Mass Index: A Population-based Cohort Study. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2017;15(8):1294-301.e2.
174. Dongiovanni P, Meroni M, Baselli GA, Bassani GA, Rametta R, Pietrelli A, et al. Insulin resistance promotes Lysyl Oxidase Like 2 induction and fibrosis accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci (Lond)*. 2017;131(12):1301-15.
175. Petta S, Wong VW, Cammà C, Hiriart JB, Wong GL, Marra F, et al. Improved noninvasive prediction of liver fibrosis by liver stiffness measurement in patients with nonalcoholic fatty liver disease accounting for controlled attenuation parameter values. *Hepatology*. 2017;65(4):1145-55.
176. Kanwar P, Nelson JE, Yates K, Kleiner DE, Unalp-Arida A, Kowdley KV. Association between metabolic syndrome and liver histology among NAFLD patients without diabetes. *BMJ Open Gastroenterol*. 2016;3(1):e000114.
177. Jarvis H, Craig D, Barker R, Spiers G, Stow D, Anstee QM, et al. Metabolic risk factors and incident advanced liver disease in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): A systematic review and meta-analysis of population-based observational studies. *PLoS Med*. 2020;17(4):e1003100.
178. Kanwal F, Kramer JR, Li L, Dai J, Natarajan Y, Yu X, et al. Effect of Metabolic Traits on the Risk of Cirrhosis and Hepatocellular Cancer in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology*. 2020;71(3):808-19.
179. Shin WG, Park SH, Jang MK, Hahn TH, Kim JB, Lee MS, et al. Aspartate aminotransferase to platelet ratio index (APRI) can predict liver fibrosis in chronic hepatitis B. *Dig Liver Dis*. 2008;40(4):267-74.
180. Huang C, Seah JJ, Tan CK, Kam JW, Tan J, Teo EK, et al. Modified AST to platelet ratio index improves APRI and better predicts advanced fibrosis and liver cirrhosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2021;45(4):101528.
181. Hannah WN, Harrison SA. Noninvasive imaging methods to determine severity of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2016;64(6):2234-43.
182. Ratziu V, Charlotte F, Heurtier A, Gombert S, Giral P, Bruckert E, et al. Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2005;128(7):1898-906.
183. Goodman NF, Cobin RH, Futterweit W, Glueck JS, Legro RS, Carmina E, et al. AMERICAN ASSOCIATION OF CLINICAL ENDOCRINOLOGISTS, AMERICAN COLLEGE OF ENDOCRINOLOGY, AND ANDROGEN EXCESS AND PCOS SOCIETY DISEASE STATE CLINICAL REVIEW: GUIDE TO THE BEST PRACTICES IN THE EVALUATION AND TREATMENT OF POLYCYSTIC OVARY SYNDROME - PART 2. *Endocr Pract*. 2015;21(12):1415-26.
184. Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G, et al. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(7):2402-10.
185. Lansang MC, Williams GH, Carroll JS. Correlation between the glucose clamp technique and the homeostasis model assessment in hypertension. *Am J Hypertens*. 2001;14(1):51-3.
186. Dokras A, Saini S, Gibson-Helm M, Schulkin J, Cooney L, Teede H. Gaps in knowledge among physicians regarding diagnostic criteria and management of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2017;107(6):1380-6.e1.
187. Wang JZ, Cao HX, Chen JN, Pan Q. PNPLA3 rs738409 underlies treatment response in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Clin Cases*. 2018;6(8):167-75.

