

LÚCIA HELENA DE OLIVEIRA CORDEIRO

Doença Hepática Gordurosa Não-alcoólica: Análise da Adiponectina, TNF- α , Interleucina-6 e Fragmento CK-18 como marcadores de fibrose hepática

RECIFE

2017

LÚCIA HELENA DE OLIVEIRA CORDEIRO



Doença Hepática Gordurosa Não-alcoólica: Análise da Adiponectina, TNF- α , Interleucina-6 e Fragmento CK-18 como marcadores de fibrose hepática

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Geral, nível Doutorado, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Cirurgia

Orientador

DR. JOSEMBERG MARINS CAMPOS

Professor do Departamento de Cirurgia do CCS/ UFPE

Co-Orientador

DR. JOSÉ LUIZ LIMA FILHO

Professor Adjunto de Bioquímica da UFPE

Diretor Científico do LIKA

RECIFE, 2017

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4 1010

C794d Cordeiro, Lúcia Helena de Oliveira.
Doença hepática gordurosa não-alcoólica: análise da adiponectina, TNF- α , interleucina-6 e fragmento CK-18 como marcadores de fibrose hepática / Lúcia Helena de Oliveira Cordeiro. – 2017.
71 f.: il.; tab.; quad.; 30 cm.

Orientador: Josemberg Marins Campos.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-graduação em Cirurgia. Recife, 2017.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Obesidade. 2. Cirurgia bariátrica. 3. Fibrogênese. 4. Citocina. 5. Adiponectina. I. Campos, Josemberg Marins (Orientador). II. Título.

617.91

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2017-321)

LÚCIA HELENA DE OLIVEIRA CORDEIRO

**Doença Hepática Gordurosa Não-alcoólica: Análise da Adiponectina, TNF- α ,
Interleucina-6 e Fragmento CK-18 como marcadores de fibrose hepática**

Aprovada em: 02/03/2017

Banca Examinadora

Prof. Dr. JOSEMBERG MARINS CAMPOS

Instituição: CCS/UFPE

Prof. Dr. LUCIO VILAR RABELO FILHO

Instituição: CCS/UFPE

Prof. Dr. THIAGO FREIRE PINTO BEZERRA

Instituição: CCS/UFPE

Prof. Dr. EDMUNDO PESSOA DE ALMEIDA LOPES NETO

Instituição: CCS/UFPE

Prof. Dr. JOSÉ GUIDO CORRÊIA DE ARAÚJO JÚNIOR

Instituição: CCS/UFPE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Professor Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Profa. Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Pró-Reitor: Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DIRETOR

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA GERAL

Prof. Dr. Sílvio da Silva Caldas Neto

HOSPITAL DAS CLÍNICAS - DIRETOR SUPERINTENDENTE

Dr. Frederico Jorge Ribeiro

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA GERAL NÍVEL MESTRADO E DOUTORADO

COORDENADOR

Prof. Dr. Rodrigo Pessoa Cavalcanti Lira

VICE-COORDENADOR

Prof. Dr. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

CORPO DOCENTE

Prof. Dr. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

Prof. Dr. Josemberg Marins Campos

Prof. Dr. Carlos Teixeira Brandt

Prof. Dr. Fernando Ribeiro de Moraes Neto

Prof. Dr. José Lamartine de Andrade Aguiar

Prof. Dr. Josimário João da Silva (Membro colaborador)

Prof. Dr. Lucio Vilar Rabelo Filho

Prof^a. Dr^a. Magdala de Araújo Novaes (Membro colaborador)

Prof. Dr. Salvador Vilar Correia Lima

Prof. Dr. Sílvio da Silva Caldas Neto

Prof. Dr. Euclides Dias Martins Filho

Dedico essa tese a todos os meus pacientes, que são o fator motivador para que eu continue estudando e aprimorando o meu conhecimento

Agradecimentos

Agradecimentos mais do que especiais ao meu marido **Rodrigo Barros Pereira**, aos meus filhos **Mateus Cordeiro Pereira e Henrique Cordeiro Pereira**, pelo apoio incondicional e compreensão nas horas de ausência. **Minha mãe e meu pai** grandes exemplos de generosidade e incentivo ao estudo.

Prof. Ney Cavalcanti, pelo entusiasmo nos ensinamentos da Endocrinologia e nas lições de vida que nos fazem engrandecer.

Aos **Professores** que contribuíram de modo especial para a realização deste trabalho:

Prof. Josemberg Mariz Campos pela cuidadosa orientação, paciência e riqueza de conhecimentos que permitiram a elaboração da pesquisa.

Prof. José Luiz da Silva Filho pela sua contagiante energia e solicitude

Prof. Fabricio Oliveira Souto e Dra. Taciana Salviano pelo apoio na biologia molecular e amizade

Prof. Álvaro Ferraz e seu staff pelo apoio e solicitude

Prof. Lucio Vilar e Prof. Ruy Lyra pela orientação e disponibilidade nas revisões do texto.

Prof. Edmundo Lopes que me incentivou na realização deste estudo

Prof^a Norma Thomé Jucá, um agradecimento especial pela análise histológica pelas sugestões.

Prof^a Cristina Raposo estatística, pela colaboração na análise estatística

A **todos** que contribuíram de forma direta ou indireta, em especial:

Aos **Colegas do Doutorado** pelo companheirismo e incentivo.

Todos que contribuíram com gestos ou palavras, meu sincero agradecimento

RESUMO

Introdução: Genética, epigenética, hábitos alimentares e de vida são fatores atribuídos ao aumento alarmante da obesidade em todo o mundo, atingindo um em cada quatro americanos. Dentre as doenças associadas à obesidade estão a Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) com suas formas principais como esteatose hepática (EH) e esteato-hepatite não alcoólica (EHNA). Pacientes com EHNA desenvolvem fibrose semelhante à hepatite alcoólica e viral com risco de cirrose e câncer e, ainda apresentam maior mortalidade cardiovascular. O tecido adiposo é metabolicamente ativo e produz adipocitocinas que têm influência na EHNA. Este estudo tem como objetivo avaliar a expressão hepática da Adiponectina, Interleucina-6, TNF- α e marcador de apoptose caspase-mediada, o fragmento CK-18, no fígado de pacientes com obesidade grave submetidos à cirurgia bariátrica. **Pacientes e Métodos:** Pacientes selecionados para cirurgia bariátrica foram submetidos à biópsia hepática entre 2014 e 15, após excluir causas secundárias de doença hepática e uso de álcool. A histologia foi realizada por patologista experiente. A DHGNA foi classificada em EH e EHNA caracterizada pela presença de infiltrado misto centrolobular, degeneração em balão e fibrose perisinusoidal. IL-6, TNF- α , Adiponectina e fragmento CK-18 analisado por técnica de PCR-RT, análise do fragmento CK-18 e do LPS por ELISA). Calcularam-se as médias, desvio padrão e proporções e testou-se as diferenças entre presença de EH ou EHNA através do teste não paramétrico Mann-Whitney de comparação de duas médias. Utilizou-se o teste não paramétrico Kruskal Wallis, de comparação de múltiplas médias, para as variáveis com relação aos achados histológicos (degeneração em balão, inflamação lobular e presença de fibrose). Testaram-se a independência de classificação (associação entre variáveis) foi utilizado o teste Qui-quadrado de independência de Pearson ou o teste exato de Fisher. Adotou-se o nível de significância de 5%. Os cálculos foram feitos no software SPSS versão 20.0. Aprovação pelo CEP. **Resultados:** Foram avaliados 52 pacientes, idade média 38 anos e IMC médio 40,74. Dentre os pacientes estudados 42 (80,8%) tinham esteatose hepática e 10 pacientes (19,2%) EHNA (1 portador de cirrose). Houve correlação estatística dos parâmetros avaliados nos casos de EH e EHNA concernente à extração hepática da ADIPO ($70.231,32 \pm 70,231,32$ vs. $820.823,43 \pm 333.554,54$, respectivamente; $p=0,012$), IL-6 ($1,39 \pm 2,22$ vs. $3,46 \pm 2,95$, respectivamente; $p= 0,009$) e TNF- α ($10,07 \pm 9,70$ vs. $59,40 \pm 61,87$, respectivamente; $p= 0,015$). O CK-18 na EH foi encontrado $5858,15 \pm 6834,80$ e na EHNA $24066,55 \pm 33854,16$ ($p=0,016$). Na análise dos achados histológicos que diferenciam a EHNA, com relação à presença da degeneração em balão, não houve diferença estatística. Na presença de infiltrado misto, houve correlação estatística com adiponectina ($p=0,02$) e a presença de fibrose perisinusoidal com TNF- α correlação ($p=0,012$). **Conclusão:** No presente estudo, os marcadores de inflamação se correlacionaram positivamente EHNA havendo diferença significativa. A expressão da Adiponectina no tecido hepático foi aumentada no infiltrado inflamatório ($p=0,015$) enquanto a expressão do TNF- α foi aumentada para a presença de fibrose ($p=0,016$).

Palavras-chave: Obesidade. Cirurgia Bariátrica. Fibrogênese. Citocina. Adiponectina

ABSTRACT

Introduction: Genetic, epigenetic and environmental influences have been cited as the reasons for the obesity which affects 1 in 4 American adults. Many diseases are associated with obesity, among them the Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and the more advanced type of it, Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH). Patients with NASH develop fibrosis very similar to alcoholic and viral hepatitis. NASH is associated with an inflammation, in addition to cardiovascular mortality, non-hepatic cancer, cirrhosis and liver cancer. The reason the inflammation remains and patients develop progressive liver disease and cirrhosis even after bariatric surgery or weight loss is still unknown. Adipose tissue is metabolically active and secretes adipokine and anti-inflammatory and antifibrotic substances such as adiponectin. Adiponectin is reduced in the obese and insulin resistant patients. This study aims to evaluate the expression of Adiponectin, Interleukin-6, TNF- α and CK-18 fragments, in the liver of patients with severe obesity undergoing bariatric surgery. **Methods:** Fifty-two patients with hepatic biopsy between 2014-15 were included. There were no secondary causes such as the consumption of alcohol. Histology was performed by an expert pathologist. NAFLD was classified in hepatic steatosis and NASH was characterized by the presence of necroinflammation, balloon degeneration and perisinusoidal fibrosis. Quantitative PCR for IL-6, TNF- α , Adiponectin and CK-18 fragment was performed. Detection and quantification of CK-18 was undertaken using ELISA (Human Apoptosense M30 (AM30) and detection and quantification of LPS using ELISA. The standards and proportions were calculated as means, and tested for differences between the presence of Steatosis or NASH using the non-parametric Mann-Whitney test of two-way comparison. The non-parametric Kruskal Wallis test was used to compare variables to multiple histological findings (balloon degeneration, necroinflammation and presence of fibrosis). Independence (association between variables) was tested using Pearson's Chi-square test of independence or Fisher's exact test. A significance level of 5% was adopted. SPSS software, version 20.0, was used. Ethics Committee 042/2003-CEP/CSS. **Results:** Fifty-two patients were evaluated, with an average age of 38 years old, with a mean BMI of 40.74. Among the patients studied, 42 (80.8%) had hepatic steatosis and 10 patients (19.2%) had NASH. There was a statistical correlation of ADIPO in EH $70,231,32 \pm 70,231,32$ and EHNA $820,823,43 \pm 333,554,54$ ($p = .012$), IL-6 in HD was 1.39 ± 2.22 and NASH $3.46 \pm 2,95$ ($p = .009$) and TNF α in HD was 10.07 ± 9.70 and in NASH 59.40 ± 61.87 ($p = .015$). Regarding the caspase-dependent apoptosis marker, the CK-18 fragment in HD was found to be 5858.15 ± 6834.80 and in the NASH 24066.55 ± 33854.16 ($p = 0.016$). **Conclusion:** In the present study, markers of inflammation correlated positively with NASH, with a statistically significant difference. The relative expression of Adipo in the hepatic tissue was increased in the inflammatory infiltrate ($p = 0.015$) whereas the expression of TNF- α was increased for the presence of fibrosis ($p = 0.016$).

Keywords: Adipokines. Adiponectin. Bariatric Surgery. Liver cirrhosis. Obesity,.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1	Critérios para diagnóstico de síndrome metabólica segundo OMS, IDF e NCEP	19
Figura 1	Modelo Explicativo	25
Figura 2	Boxplot e gráfico de média com intervalo de confiança para o marcador adiponectina nos pacientes com EHNA e Esteatose hepática	39
Figura 3	Boxplot e gráfico de média com intervalo de confiança para o marcador TNF- α nos pacientes com EHNA e Esteatose hepática	39
Figura 4	Boxplot e gráfico de média com intervalo de confiança para o marcador IL-6 nos pacientes com EHNA e Esteatose hepática	40
Figura 5	Boxplot e gráfico de média com intervalo de confiança para o marcador CK-18 nos pacientes com EHNA e Esteatose hepática	40
Figura 6	Boxplot e gráfico de média com intervalo de confiança para o marcador Adiponectina nos pacientes Infiltrado Inflamatório misto	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	<i>Primers</i> específicos para PCR quantitativo em tempo real	31
Tabela 2	Valores de referências dos exames laboratoriais	32
Tabela 3	Características clínicas dos 52 pacientes com obesidade com DHGNA	38
Tabela 4	. Função Hepática, HOMA-IR, LPS e CK-18 ELISA dos 52 pacientes com obesidade com DHGNA	37
Tabela 5	Extração do RNA por PCR-real time dos marcadores inflamatórios: Adiponectina, Interleucina-6, TNF- α CK-18, em relação a esteatose e esteatohepatite	38
Tabela 6	Características dos 52 pacientes de acordo com a presença de Esteatose Hepática (método de Brunt)	41
Tabela 7	Características dos 52 pacientes de acordo com a presença de EHNA (método de Brunt e fibrose NASH CRN sistema de escore histológico)	42
Tabela 8	Expressão das citocinas com relação a presença da degeneração em balão	44
Tabela 9	Expressão das citocinas com relação a presença da Infiltrado Inflamatório	44
Tabela 10	Expressão das citocinas com relação a presença da Fibrose Perisinusoidal	45

LISTAS DAS ABREVIATURAS E SIGLAS

DHGNA	Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica
EH	Esteatose Hepática
EHNA	Esteato-hepatite não alcoólica
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
IMC	Índice de Massa Corporal
SRI	Síndrome de resistência Insulínica
RI	Resistência Insulínica
CT	Colesterol Total
HDL-C	Colesterol da lipoproteína de alta densidade
LDL-C	Colesterol da lipoproteína de baixa densidade
VLDL-C	Colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade
TG	Triglicerídeos
AGL	Ácidos Graxos Livres
AST	Aspartato aminotransferase
AST	Alanina aminotransferase
GGT	Gama glutamiltransferase
ADIPO re	Adiponectina
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
IL-6	Interleucina-6
CK-18	Fragmento CK-18
RE	Real expression
LPS	Lipopolissacarídeos
TLR-4	<i>Toll Like</i> Receptor-4
HSC	<i>Hepatic stellate cell</i>

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	ESTADO DA ARTE	18
2.2	JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	24
2.3	MODELO EXPLICATIVO	25
3.	DEFINIÇÃO DOS OBJETIVOS	26
3.1	Geral	26
3.2	Específicos	26
4.	METODOLOGIA	27
4.1	LOCAL DO ESTUDO	27
4.2	DELINEAMENTO DO ESTUDO	27
4.3	SELEÇÃO DOS PACIENTES	27
4.3.1	Critérios de inclusão e exclusão	27
4.4	FLUXOGRAMA	28
4.5	PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS	29
4.5.1	Método	29
4.5.1.1	<i>Coleta de dados</i>	29
4.5.2	Procedimentos Técnicos	29
4.5.2.1	<i>Biópsia Hepática</i>	29
4.5.2.2	<i>Classificação do padrão histológico</i>	30
4.5.3	Extração do RNA	30
4.5.4	Análises de sangue periférico	31
4.6	LIMITAÇÕES METODOLÓGICAS	32
4.7	PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS	32
4.7.1	Variáveis	32
4.7.2	Testes Estatísticos	33
4.8	PROCEDIMENTOS ÉTICOS	33
4.8.1	Aprovação pelo Comitê de Ética do CCS	33
4.8.2	Proteção aos indivíduos e animais envolvidos no estudo	34
4.8.3	Benefícios aos indivíduos e animais ou para a sociedade	34
5.0	RESULTADOS	35
6.0	DISCUSSÃO	46
7.0	CONCLUSÕES	52
	REFERÊNCIAS	53
	APÊNDICE - A	59
	APÊNDICE - B	62
	APÊNDICE - C	66

1 INTRODUÇÃO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) corresponde a um espectro de distúrbios que pode variar desde simples acúmulo de triglicerídeos até esteatohepatite não-alcoólica (EHNA), fibrose, cirrose e hepatocarcinoma, sem relação com álcool e doença hepática viral. Constitui uma condição clínica emergente no mundo. Está relacionada com o aumento no número de transplantes hepáticos, inicialmente atribuídos à cirrose criptogénica¹. Antes de 1980, havia apenas relatos de casos de esteatose em fígado de pacientes obesos submetidos à cirurgia bariátrica. Coube a Ludwig descrever pela primeira vez o termo esteatohepatite, onde o tecido hepático apresentava características histológicas de esteatose, infiltrado inflamatório, corpúsculos de Mallory, fibrose e cirrose, em série de 20 pacientes sem antecedentes de etilismo².

A prevalência da DHGNA tem aumentado bastante, concomitante com a epidemia mundial da obesidade e o diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Este cenário torna, atualmente, a DHGNA a enfermidade crônica do fígado mais frequente nos países ocidentais, sendo considerada a expressão hepática da síndrome metabólica ou síndrome de resistência Insulínica (SRI). Estima-se que a DHGNA afete 30% da população dos Estados Unidos da América (EUA), 27% da Ásia, sendo maior no leste asiático, com 32% da população acometida, 30% da América do Sul, 24% da população da Europa e 13% da população africana³. A esteatohepatite é a forma menos comum de DHGNA, mas é a de maior interesse clínico devido à possibilidade de progressão e pior prognóstico. Tem sido descrita em 3% a 5% dos indivíduos da população geral e em até 37% daqueles com obesidade grave⁴⁻⁵. Dentre os portadores de EHNA, a metade irá desenvolver fibrose, 30% cirrose e 3% insuficiência hepática, com necessidade de transplante hepático⁶. Quando a EHNA está presente, a sobrevida em 5 anos é estimada em 67% e em 10 anos, 59%³. Em estudo sueco, uma coorte de pacientes com DGHNA acompanhada por 28 anos, a principal causa de morte nos pacientes com EHNA foi atribuída doenças cardiovasculares e a segunda a de câncer extra-hepático, enquanto câncer hepático foi a terceira causa de morte, evidenciando um caráter sistêmico da doença⁷.

Em 1998, Day e James⁸ sugeriram a teoria dos “múltiplos insultos” para tentar explicar a patogênese da EHNA. O primeiro seria a conversão do fígado normal para o fígado gorduroso, devido à desregulação no metabolismo dos ácidos graxos livres, o que resulta em acúmulo de triglicerídeos no órgão. Nesta etapa, a resistência insulínica (RI) tem papel fundamental e os pacientes podem permanecer assim indefinidamente, tendo uma sobrevida semelhante à da população geral. Porém, após o primeiro insulto, o fígado fica suscetível a insultos subsequentes. Esses insultos têm influência genética e ambiental e levam a inflamação e necrose com ativação da cascata fibrogênica, resultando em inflamação e fibrose, até cirrose⁹.

O fígado, uma vez vulnerável aos múltiplos insultos, sofre ação do estresse oxidativo (ES) e peroxidação de lipídeos, endotoxemia, ativação das células de Kupffer, alteração das adipocitocinas, ativação das células estreladas hepáticas (HSC) e disfunção mitocondrial levando a morte do hepatócito e fibrose¹⁰⁻¹².

O tecido adiposo é um órgão metabolicamente ativo que secreta substâncias pró-inflamatórias chamadas adipocinas, especialmente representada pelo Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α)¹³ e anti-inflamatórias como a adiponectina¹⁴. É atribuído ao TNF- α papel na piora da resistência insulínica, formação de estresse oxidativo (ROS) e indução da fibrose e apoptose do hepatócito e à adiponectina papel protetor do fígado esteatótico, com ação anti-inflamatória, sensibilizadora da insulina e inibidora do acúmulo de lipídio hepático¹⁵.

O padrão-ouro para o diagnóstico de DHGNA para a diferenciação entre esteatose simples e esteato-hepatite é o estudo histopatológico do fígado por biópsia hepática. Todavia, apesar de ser procedimento seguro, não é isento de riscos, sendo a dor a complicação mais frequente (20%), enquanto o risco de complicações graves é de 0,57%, conforme um grande estudo francês¹⁶. Além disso, o fragmento retirado representa uma fração de apenas 1/50.000 - 1/65.000 do fígado, podendo haver erros de amostragem, o que dificulta o diagnóstico da DHGNA¹⁷

O tratamento da obesidade e do DM2, através da cirurgia bariátrica, tem sido relacionado à melhora da histologia hepática tanto dos graus de esteatose hepática

como reversão dos diferentes graus de fibrose. Porém em até 6% a 11% dos casos ocorre progressão da fibrose ou novos casos de esteato-hepatite. Dentre os fatores apontados para a progressão da esteatose hepática para a esteato-hepatite estão a rápida perda de peso e os graus mais avançados de fibrose hepática antes da cirurgia¹⁸⁻²⁰. Patologistas já reconhecem padrões intermediários da doença, com esteatose e com fibrose, sem degeneração ou inflamação, ou ainda, degeneração em balão com leve inflamação e esteatose sem fibrose refletindo um padrão dinâmico da DHGNA²¹. A razão pela qual alguns pacientes desenvolvem fibrose hepática progressiva e se tornam cirróticos mesmo depois de um tratamento efetivo para perda de peso, como a cirurgia bariátrica, e outros permanecem estáveis é desconhecida.

O desafio é reconhecer pacientes que vão ser submetidos à cirurgia bariátrica e são portadores da forma mais avançada da EHNA e que podem progredir para cirrose sem, no entanto, terem que ser submetidos à biópsia hepática. As dosagens séricas de substâncias produzidas pelo tecido adiposo como a adiponectina que tem relação inversa com o grau de esteatose e esteatohepatite; TNF- α e interleucina-6 que se encontram elevados e se relacionam diretamente com o avanço da fibrose hepática e, por fim, o Fragmento CK-18 produto de apoptose dos hepatócitos, após a transformação do colágeno da matriz extracelular em fibrose tem potencial como marcador para diagnóstico como também alvo terapêutico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ESTADO DA ARTE

A insulina é um hormônio peptídeo secretado pela célula β pancreática responsável pela homeostase da glicose, lipídeo e proteína além de efeitos mitogênicos. Por definição, a RI constitui o aumento da insulina por resposta biológica atenuada provocando aumento compensatório pela célula β para manter o nível de glicose normal na vigência da resistência à insulina no músculo e no tecido adiposo. A síndrome da resistência insulínica (SRI) representa um diagnóstico clínico para identificar indivíduos com alto risco de morbidade especialmente cardiovascular.^{22,23}

O tecido adiposo apresenta-se diferente de acordo com a sua distribuição. Na distribuição periférica a gordura é acumulada no quadril e na distribuição central é acumulada no abdômen, conhecida como gordura visceral. Esse tipo de distribuição confere características distintas aos adipócitos, visto que o tecido adiposo não é simplesmente um local com capacidade de armazenamento de gordura, mas apresenta interessante capacidade secretora. O tecido adiposo produz substâncias conhecidas como citocinas que são peptídeos metabolicamente ativos com ação autócrina, parácrina e endócrina. O acúmulo do tecido adiposo visceral é o principal responsável pela SRI¹³.

A SRI pode ser classificada de acordo com fatores metabólicos: hipertensão, obesidade central, glicose plasmática elevada, elevação dos triglicérides e baixo Colesterol HDL. O critério pode variar de acordo com o número de alterações envolvidas (quadro 1)²³.

As manifestações clínicas da SRI incluem doença cardiovascular (DCV), hipertensão arterial sistêmica (HAS), síndrome dos ovários policísticos (SOP), síndrome da apneia obstrutiva do sono (SOAS), dislipidemia e a DHGNA²⁴. As alterações hepáticas estão compreendidas na doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA). Esta engloba a esteatose hepática (EH) e a esteato-hepatite não-alcoólica (EHNA). EH e EHNA ocorrem mais frequentemente em obesos, diabéticos e no sexo feminino².

Quadro 1. Critérios para diagnóstico de síndrome metabólica segundo OMS, IDF e NCEP

	OMS	IDF	NCEP
Obesidade	Relação cintura/quadril > 0,9 em homens e > 0,85 em mulheres e/ou IMC > 30 kg/m ²	Cintura abdominal > 94 cm em homens europeus, > 90 cm em homens asiáticos e > 80 cm em mulheres***	Cintura abdominal > 102 cm em homens e > 88 cm em mulheres Glicose plasmática
Glicose plasmática	intolerância à glicose ou resistência insulínica comprovada pelo clamp*	≥ 100 mg/dL ou diagnóstico prévio de diabetes	≥ 110 mg/dL
Triglicerídeos	Triglicerídeos ≥ 150 mg/dL**	≥ 150 mg/dL ou tratamento para dislipidemia	≥ 150 mg/dL
HDL	HDL < 35 mg/dL em homens e < 39 mg/dL em mulheres	< 40 mg/dL em homens ou < 50 mg/dL em mulheres ou tratamento para dislipidemia	< 40 mg/dL em homens e < 50 mg/dL em mulheres
Pressão arterial	Pressão arterial Pressão sistólica ≥ 140 mmHg ou diastólica ≥ 90 mmHg, ou tratamento para hipertensão arterial	Pressão sistólica ≥ 130 mmHg ou diastólica ≥ 85 mmHg ou tratamento para hipertensão arterial	Pressão sistólica ≥ 130 mmHg ou diastólica ≥ 85 mmHg
Outros	Excreção urinária de albumina ≥ 20 mcg ou relação albumina/creatinina ≥ 30 mg/g *		

*Dois fatores e obrigatoriamente o componente assinalado; ** Tanto triglicerídeos elevados ou HDL baixo constituem apenas um fator pela OMS; *** Componente obrigatório; **** Presença de três ou mais dos componentes citados. IDF: International Diabetes Federation; NCEP: National Cholesterol Education Program; OMS: Organização Mundial da Saúde

- **Adiponectina e marcadores de atividade inflamatória**

O acúmulo de gordura no tecido visceral pode desregular a produção de adipocitocinas com altos níveis de leptina e redução dos níveis de adiponectina. O nível de adiponectina na população obesa é inversamente proporcional ao número de fatores metabólicos presentes na síndrome metabólica. Adiponectina é uma adipocitocina com propriedades antidiabética, anti-inflamatória e é inversamente relacionado aos níveis de glicemia e estado de resistência insulínica²⁵.

Modelos animais são utilizados na tentativa de explicar a história natural da DHGNA e, sobretudo, sua progressão para EHNA e presença de fibrose. A maioria dos estudos utiliza modelos genéticos, indução química ou dieta deficiente em metionina. Um modelo animal desenvolvido para hipertensão com dieta rica em

colesterol, ratos SHR5/Dmcr (*stroke-prone spontaneously hypertensive 5/Dmcr*) mostrou-se adequado para o avaliar os mecanismos moleculares da fibrogênese. Nesse estudo, a adiponectina aumenta nas 2 semanas após início da dieta hiperlipídica com posterior redução embora a expressão do seu receptor Adipo R2, presente em maior número no hepatócito, permaneça elevado. Por outro lado, o TNF- α encontra-se aumentado sendo importante em todas as fases da DHGNA^{26,27}.

- **Adiponectina**

A adiponectina é uma adipocitocina largamente secretada por adipócitos e abundante no plasma humano. Pode ser também secretada por cardiomiócitos, hepatócitos e placenta em menores concentrações. Uma vez sintetizada a adiponectina pode ter três isoformas: alto peso molecular, médio peso (hexamérica) e globular²⁸.

A adiponectina tem efeito na melhora da sensibilidade à ação da insulina, proporcionando supressão da gliconeogênese e aumento da oxidação de ácidos graxos no músculo. Incluem ainda a redução da expressão do TNF- α , diminuição da quimiotaxia de macrófagos, inibição da adesão de monócitos, inibição da transformação de macrófagos em células espumosas, aumento da produção do óxido nítrico. De acordo com sua multiplicidade de funções benéficas, a adiponectina é importante adipocina com efeitos anti-inflamatórios, antidiabético e antiaterogênico²⁹.

Em experimentos com ratos com knockout para o gene da adiponectina, observou-se baixos níveis circulantes de mRNA de proteínas transportadoras de ácidos graxos em seus músculos³⁰. Em outro experimento, com animais submetidos à uma dieta hiperlipídica e a infusão de adiponectina, se observou que houve redução da concentração plasmática de ácidos graxos livres, com perda de peso e redução da concentração de triglicerídeos hepático e muscular nos animais que receberam a infusão de adiponectina comparados àqueles que não receberam a infusão³¹. Interessantemente, em indivíduos obesos comparados à não obesos

foram observados valores plasmáticos menores de adiponectina nos obesos em relação aos não obesos.

A DHGNA é uma entidade clínica de prevalência crescente e que se associa ao diabetes mellitus tipo 2, obesidade e síndrome metabólica, também se correlacionam com níveis diminuídos de adiponectina. Em uma revisão sistemática multicêntrica, foi demonstrado, em 22 mil indivíduos, que o grupo portador de EHNA, documentada por biópsia, exibiu menores níveis de adiponectina circulantes que aqueles do grupo controle³¹.

- **Fator de Necrose Tumoral α**

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória caracterizada por vários efeitos biológicos, incluindo metabólico, inflamatório, proliferativo e também necrótico com expressão aumentada no fígado e no tecido adiposo, sendo, desta forma, um importante agente causal e mantenedor da DHGNA. É secretado pelo tecido adiposo e por macrófagos infiltrados no hepatócito (células de *Kupffer*) e outros tipos de células em resposta à atividade inflamatória crônica. O TNF- α está associado com RI, aumento da lipólise periférica, EH, inflamação, necrose, apoptose e fibrose no hepatócito³².

A complexidade dos mecanismos de ação do TNF- α tem sido amplamente estudada. Uma vez que é produzido no tecido adiposo, TNF- α pode causar alteração da captação periférica da glicose dependente da insulina por aumento da fosforilação da serina no receptor da insulina substrato-1 (IRS-1) e conseqüentemente inibição da translocação do transportador de glicose tipo 4 (GLUT-4) para a membrana plasmática, resultando em aumento periférico dos ácidos graxos livres e seu acúmulo no fígado. Também estimula lipase hormônio sensível resultando em acúmulo de lipídeos^{33,34}.

Outra fonte adicional do TNF- α no fígado são as células de Kupffer em resposta à endotoxinas bacterianas, mediadas pelo *Toll-Like* Receptores (TLR). Nos hepatócitos ainda o TNF- α estimula os elementos de ligação da proteína 1c esteróide levando a esteatose. TNF- α produz ceramidas que aumentam os ROS num mecanismo de ciclo vicioso. Os ROS por sua vez aumentam ainda mais a

produção de TNF-alfa que aumentam a permeabilidade da mitocôndria liberando citocromo C mitocondrial o que propicia maior a produção ROS e peroxidação de lipídeos resultando na morte do hepatócito³⁴.

O TNF- α produzido pela célula de Kupffer aumenta a expressão do RNAm do TIMP-1 (*promoting tissue inhibitor of metalloproteinase-1*) na célula estrelada hepática e suprime a indução apoptótica da célula estrelada ativada, reforçando o papel na fibrose hepática³⁵. (Ver modelo explicativo)

A predisposição genética também está relacionada a susceptibilidade a DHGNA. Polimorfismos do TNF- α já foram identificados em determinadas populações com EHNA^{36, 37}.

- **Interleucina-6**

A inflamação crônica de baixo grau provocada pelo tecido adiposo visceral leva à resistência Insulínica e ao acúmulo de gordura no hepatócito ativando vias do IKK- β e NF- $\kappa\beta$ que coordenam o aumento de citocinas inflamatórias dentre elas a interleucina-6. A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória associada com o desenvolvimento da Resistência Insulínica, atua de forma bastante parecida com o TNF- α . O seu exato mecanismo fisiopatológico na patogênese da DHGNA ainda não está determinado. O seu papel na progressão para EHNA é controverso sendo estudada em modelos experimentais^{38,39}.

- **Fragmento CK-18**

A organização das células eucarióticas é formada por citoesqueleto. São estruturas tridimensionais compostas de microtúbulos, microfilamentos e filamentos intermediários, este último compreende os da citoqueratina. As citoqueratinas participam, além da função estrutural, também da regulação do controle da proliferação celular e da apoptose⁴⁰.

A citoqueratina 8 e 18 estão presentes no hepatócito, células renais e células endócrinas pancreáticas. No hepatócito as queratinas estão envolvidas no processo

de formação do Corpúsculo de Mallory-Denky (CMD), que são determinantes morfológicos de processos patológicos crônicos do fígado ⁴⁰.

O processo de apoptose da citoqueratina-18 é substrato da caspase 3. Dois fragmentos solúveis são possíveis de serem analisados através de seus epítomos por ensaios imunoenzimáticos e dão informação da morte celular, a dosagem do anticorpo M65 relaciona à apoptose total e necrose e o M30 é específico para a ação da caspase-3 ⁴¹.

Estudos populacionais têm demonstrado que mutações nos genes CK-8 e CK-18 são associados a um risco três vezes maior de doença hepática terminal independente da etiologia, como descrito na hepatite C. O fragmento CK-18 gerado pela ação das caspases durante o processo de apoptose são indicativas de dano hepático ⁴².

Em pacientes com obesidade grave submetidos à cirurgia bariátrica, com EHNA a dosagem dos fragmentos da caspase, o CK-18 teste M30 teve um valor preditivo positivo 99% e valor preditivo negativo de 85,7% ⁴³⁻⁴⁴ no diagnóstico da DHGNA.

- **Microbiota Intestinal na DHGNA e Lipopolissacarídeos**

Mamíferos albergam no intestino 10^{14} bactérias, mais que o número total de células nos tecidos. Nos últimos 10 anos, o *status* da flora intestinal recebeu o nome de órgão microbiano, pois contribui para a homeostase e impacta diretamente o metabolismo de energia e a sensibilidade à insulina. Dois filos estão presentes nas fezes e intestino distal: bacteroidetes e firmicutes. Em ratos obesos foi observado aumento do filo firmicutes comparado ao bacteroidetes sendo esse desequilíbrio denominado disbiose. A hipótese atribuída a associação com obesidade e resistência insulínica seria uma maior capacidade genética de armazenar energia (que vem da dieta) e/ou o aumento das bactérias que produzem enzimas mais eficientes em degradar nutrientes disponíveis da dieta ⁴⁵.

As bactérias intestinais Gram negativas, apresentam na sua parede celular o lipopolissacarídeo (LPS). A inflamação sistêmica decorrente da disbiose ocorre

por um aumento da permeabilidade intestinal. Há uma redução da expressão das proteínas das *tight junctions* conhecidas como *zonula occludens* I (ZO-1) e ocludina. O aumento da permeabilidade intestinal leva a passagem de produtos bacterianos como o LPS e translocação bacteriana. O LPS pode reagir com AGL que se encontra aumentado na circulação do obeso devido ao aumento da lipólise e a lipogênese hepática *de novo*. O fígado recebe o sangue portal, sendo o primeiro ponto de toxinas endógenas e exógenas e componentes da microbiota e bactérias intestinais que geram resposta imunológica e humoral. A LPS tem uma alta especificidade pelo o *Toll Like Receptor-4* (TLR-4), esse complexo é responsável pela geração da Resistência Insulínica nos órgãos sensíveis inclusive o fígado, levando ao acúmulo de Gordura a à inflamação, DGHNA/EHNA.⁴⁶

2.2 Justificativa do estudo

O conhecimento dos mecanismos envolvidos na progressão da EH para EHNA se faz importante por haver diferenças no prognóstico entre as duas enfermidades, aliado à dificuldade no diagnóstico diferencial, exigindo análise histológica através da biópsia hepática, procedimento que envolve riscos. E ainda a necessidade de intensificar o tratamento da EHNA, inclusive com a indicação de cirurgia bariátrica. A análise da expressão hepática das citocinas, sobretudo TNF- α , adiponectina, interleucina -6 e os marcadores de fibrose hepática podem auxiliar no entendimento dessa progressão.

2.3 MODELO EXPLICATIVO:

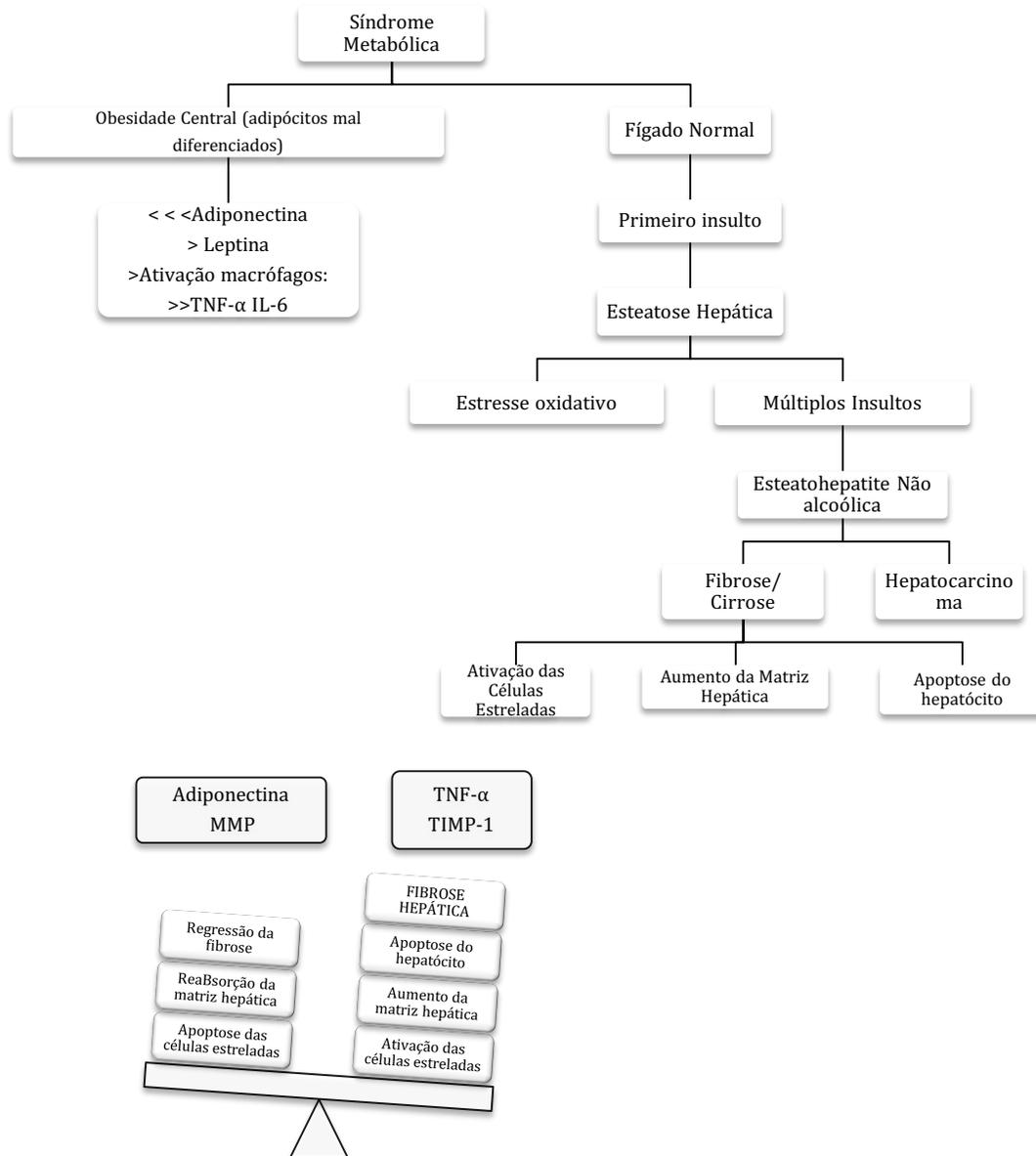


Figura 1. MMP: *Metalloproteinases*, TIMP-1: *Promoting Tissue Inhibitor of metalloproteinase-1*. A síndrome metabólica é caracterizada pela obesidade central, com adipócitos mal diferenciados. Na SM há redução dos níveis séricos da adiponectina, aumento da leptina, produção de TNF- α e acúmulo de gordura no fígado. No fígado esteatótico o TNF- α promove estresse oxidativo, mobilização de macrófagos com inflamação e EHNA. Ocorre ativação das células estreladas quiescentes em células hepáticas ativadas que sofrem também ação do TNF- α liberado pelos macrófagos, ocorre ainda alteração da matriz extracelular e apoptose do hepatócito. Os TIMP-1 são proteínas estimuladas pelo TNF- α e promovem a destruição da matrix extracelular. Nesse modelo, a célula estrelada ativada sofre ação da adiponectina que tem efeito anti-inflamatório e promove a estimulação das Metaloproteinases (MMP) que ativam a apoptose da célula estrelada ativada tendo uma ação antifibrótica.

3 Definição dos Objetivos

3.1 Geral:

- Correlacionar a quantidade das adipocitocinas: adiponectina, TNF- α , interleucina-6 e fragmento CK-18 através da técnica de extração de RNA do fragmento hepático com a presença de esteatose hepática (EH) e esteato-hepatite não-alcoólica (EHNA) em pacientes submetidos à cirurgia bariátrica.

3.2 Específicos

- Correlacionar parâmetros clínicos (gênero, idade, Peso, IMC, tempo de obesidade, antecedente familiar de obesidade, hipertensão, diabetes, uso de hipoglicemiante, dislipidemia, Síndrome de apneia obstrutiva do sono, esofagite, hérnia hiatal, gastrite, esteatose hepática na ultrassonografia) com a presença de esteatose hepática (EH) e esteato-hepatite não-alcoólica (EHNA).

- Determinar e correlacionar os valores de dosagens plasmáticas das enzimas hepáticas AST, ALT, ferritina, HOMA-IR do lipopolissacarídeo (LPS) e do fragmento CK-18 com EH e EHNA

- Determinar a quantidade das adipocitocinas: adiponectina, TNF- α , interleucina-6 e fragmento CK-18 através da técnica de extração de RNA do fragmento hepático com as características histológicas da esteato-hepatite não alcoólica: presença de degeneração em balão (DG), presença de infiltrado inflamatório Misto (IIM), presença de fibrose perisinusoidal (FPS).

4 METODOLOGIA

4.1 LOCAL DO ESTUDO: estudo de base hospitalar. Pacientes obesos, moderado e grave, triados do ambulatório de Cirurgia Geral do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco e da Clínica Neogastro. Os dois serviços têm atendimento especializado ao paciente obeso com equipe multidisciplinar que conta com médicos, enfermeiras, psicólogas e nutricionistas.

4.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO: Estudo de intervenção experimental. Os 52 pacientes avaliados são portadores de obesidade grau II (IMC entre 35 e 39,9 Kg/m²) ou grau III (IMC \geq 40 Kg/m²) e foram submetidos à cirurgia bariátrica. (ver fluxograma)

4.3 SELEÇÃO DE PACIENTE

4.3.1 Critérios de Inclusão e Exclusão

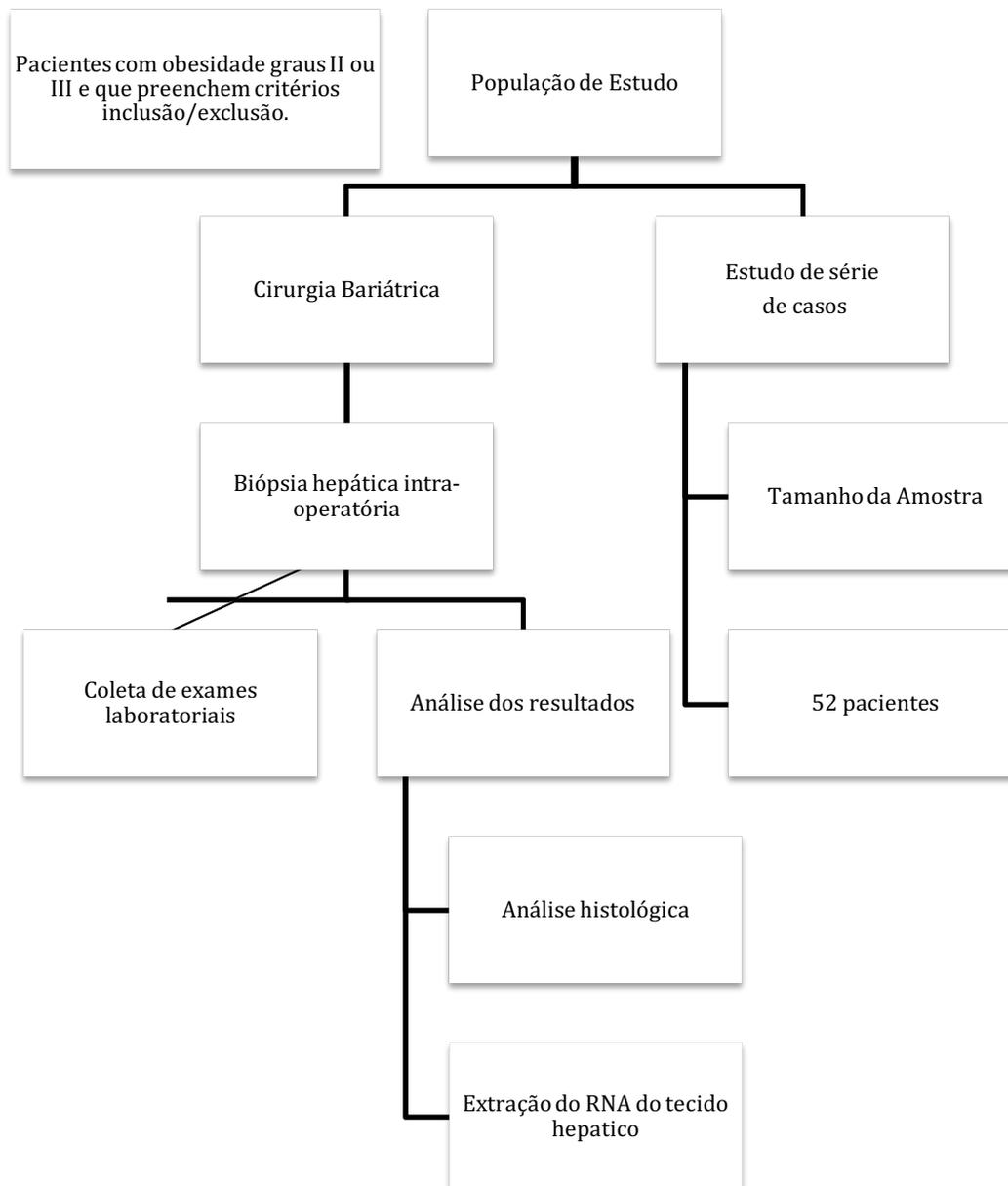
Critérios de inclusão

- Idade entre 18 e 65 anos de ambos os sexos
- Portadores de obesidade grau II ou III com indicação de cirurgia bariátrica (IMC entre 35,0 e 39,9 Kg/m² com comorbidades associadas à obesidade ou \geq 40 Kg/m², mesmo na ausência de comorbidades)
- Capacidade de entender os procedimentos do estudo e assinar termo de consentimento livre e informado (TCLE)

Critérios de exclusão

- Pacientes portadores de doença hepática conhecida, como hepatite viral, hepatite auto-imune, exposição a drogas hepatotóxicas, hemocromatose ou qualquer outra doença que altere a função hepática
- Ingesta de álcool > 20g/dia ou 140g/semana para homens e > 10g/dia ou 70g/semana para mulheres

4.4 FLUXOGRAMA:



4.5 PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS

4.5.1 Método:

4.5.1.1 Coleta de dados

Os pacientes obesos mórbidos do Ambulatório de Cirurgia Geral do Hospital das Clínicas da UFPE e do Serviço de cirurgia da Neogastro, com indicação da cirurgia bariátrica, foram abordados no momento da marcação de cirurgia. Os pacientes responderam a questionário (anexo1) e assinaram termo de consentimento livre esclarecido com autorização para biópsia hepática (anexo 2). As medidas antropométricas peso e altura foram realizadas no momento da marcação cirúrgica. Com o peso e a altura foi calculado o Índice de Massa Corpórea (IMC- peso em quilogramas dividido pelo quadrado da altura em metros).

A indicação para cirurgia obedeceu aos critérios do Consenso Latino-Americano de Obesidade para pacientes com IMC maior ou igual a 40 Kg/m² ou naqueles pacientes com IMC maior ou igual a 35 associados a co-morbidades (HAS, DM, dislipidemia, apneia do sono, doenças articulares, distúrbios psicológicos).

4.5.2 Procedimentos Técnicos

4.5.2.1 Biópsia Hepática

Foram realizadas duas biópsias imediatamente após a introdução dos trocateres na cavidade abdominal, com agulha de biópsia hepática- Hepafix® 16G. Um dos fragmentos foi conservado em formaldeído a 10% e enviado para o Serviço de Anatomia Patológica da UFPE para análise por um único patologista experiente e outro fragmento conservado em RNA later para análise no laboratório de biologia molecular.

Houve retirada de fragmento de 1cm a 3 cm de comprimento com 1,2 mm a 2 mm de diâmetro que representa 1/50000 do total da massa hepática. O material foi conservado em formaldeído a 10 % e enviado à patologia, onde foi corado com

Hematoxilina-Eosina e tricrômio de Masson. As amostras foram analisadas por um único e experiente patologista.

Esse tipo de procedimento já foi aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da UFPE, quando se avaliou um grupo semelhante de pacientes, sendo os resultados tema da tese de Mestrado dessa autora em 2003, pelo Centro de Ciências da Saúde desta Universidade.

4.5.2.2 Classificação do padrão histológico:

A classificação das alterações histológicas foi baseada nos critérios da Conferência da Associação Americana para o estudo das Doenças Hepáticas, (Brunt, Neuschwander-Tetri, Caldwell, 2003), de acordo com o anexo 5. Para facilidade de classificação foi elaborado formulário que conta no anexo (3). A Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica foi estratificada em Esteatose Hepática (EH) e esteatohepatite não alcoólica (EHNA) e cirrose hepática (CH). Esteatose foi graduada como: grau 1 (acomatimento de 5% a 33% dos hepatócitos acometidos) grau 2 (33%-66% dos hepatócitos acometidos); e grau 3 (66% dos hepatócitos acometidos). A classificação para fibrose hepática é realizada em separado e consta no anexo 2 de acordo com EHNA CRN *histologic scoring system*. Os estágios de fibrose foram classificados em leve de 0 a 2 e avançada 3 a 4, sendo 4 considerado cirrose.

4.5.3 Extração De RNA

Tubo de 2ml com 1ml de RNA later e PCR quantitativo em tempo real (Q-PCR) O RNA total será extraído de biópsias hepáticas armazenadas em RNA later usando o kit RNA *Miniprep System* (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total será quantificado pelo Nanodrop 2000 (*Thermo Scientific*) e transcrito através do kit *Reverse Transcription* (Qiagen). PCRs quantitativos para adiponectina, IL-6 e TNF- α e CK-18 serão realizados em duplicata a partir de 25 ng de cDNA e primers específicos (tabela 1) utilizando SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). As condições de ciclagem serão 50°C - 2 min, 95°C- 15 min, e 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. Os resultados serão representados

graficamente como expressão relativa e os dados serão analisados estatisticamente pelo teste T de Student.

Tabela 1. Primers específicos para PCR quantitativo em tempo real

Primers	Primer forward	Primer reverse
IL-6	3'-TGGCAGAAAACAACCTGAAC-5'	3'-TGATTTTCACCAGGCAAGTC-5'
TNF- α	3'-TGCCCCAATCCCTTTATTAC-5'	3'-AGCCCCCAATTCTCTTTTTG-5'
Adiponectina	3'-GGTTCAAGCGATTCTTCTGC-5'	3'-CCTGGCCAATATGGTGAAAC-5'
CK-18	3'-ATCTTGGTGATGCCTTGGAC-5'	3'-TCAGACACCACTTTGCCATC-5'

4.5.4 Análises laboratoriais no sangue periférico

Amostras de sangue foram obtidas após venopunção, com 12 horas de jejum antes do início da cirurgia. Um total de 10 ml de sangue periférico foi coletado em tubo estéril. Após centrifugação para separação do plasma, alíquotas foram realizadas para armazenamento em freezer a -80°C para realização da dosagem do CK-18 ELISA e LPS por metodologia ELISA

- **Deteção e quantificação do CK-18 por ELISA imunoensaio**

A presença de adiponectina foi investigada utilizando o kit comercial *Human Adiponectin* ELISA (Millipore) Cat No EZHADP-61K e *Keratin 18 (antibodies-online)* Cat No ABIN366976. A leitura das placas foi realizada em leitor de ELISA (Thermo Scientific). A análise foi realizada no laboratório de Bioquímica da UPE.

- **Deteção e quantificação de LPS por ELISA imunoensaio**

A Determinação do LPS em amostras de soro estéril, obtidas de sangue periférico, foram diluídas a 20% (vol./vol) com água *endotoxin-free* e então aquecida a 70°C por 10 min para inativar proteínas séricas. LPS foi quantificada usando kit comercial *Limulus Amebocyte Assay* (Cambrex, Walkersville, MD, USA), de acordo com protocolo. A análise foi realizada no laboratório de Bioquímica da UPE.

Os exames laboratoriais foram executados no Laboratório Central do HC-UFPE e no laboratório privado Edmar Victor.

Tabela 2: valores de referências dos exames laboratoriais

Exames laboratoriais	Método	Valor Normal
Colesterol total	Enzimático	< 200 mg/100 ml
Colesterol LDL	Enzimático	< 130 mg/100 ml
Colesterol HDL	Enzimático	mulher > 55 mg/100 ml homem > 45 mg/100 ml
Triglicerídeos	Enzimático	150 mg/ 100 ml
Glicemia de Jejum	Enzimático	>126 mg/dL
Insulina	Enzimático	3-25uUI/ml
Aspartato Aminotransferase	Enzimático	> 35 UI/mL
Alanina Aminotransferase	Enzimática	>40 UI/mL
Ferritina	Enzimático	mulher 4,63 a 204 ng/ml homem 21,81a 274,66 ng/ml

O cálculo do modelo de homeostase para avaliação de resistência Insulínica foi obtido através da fórmula: $HOMA-IR = \text{insulina de jejum (mU/L)} \times \text{glicose plasmática plasma glucose (mg/dL)} / 450$.

4.6 Limitações Metodológicas

Número da amostra: os pacientes apresentavam receio com relação ao procedimento da biópsia hepática, pequeno número de diabéticos.

Dificuldade em estabelecer o início da doença por se tratar de doença insidiosa.

Grau de confiabilidade na informação relacionada à ingestão de álcool.

4.7 Procedimentos Estatísticos

4.7.1 Variáveis:

- Dependente: Presença de Esteatose e Esteatohepatite
- Independentes: Quantificação da extração hepática da adiponectina, TNF- α , interleucina-6 e fragmento CK-18, Dosagem do fragmento hepático Ck-18, dosagem do lipopolissacarídeo, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), gamaglutamil transferase (GGT), bilirrubina total e frações (BTF), ferritina, glicemia de jejum,

hemoglobina glicada, colesterol total e frações, triglicerídeos, insulina basal, HOMA IR.

- Dados demográficos: Idade, Gênero, Tempo de obesidade, IMC, presença de Diabetes, caracterizado como história prévia de diabetes, uso de medicação para diabetes e ou glicemia plasmática jejum maior ou igual a 126 mg/dL ou hemoglobina glicada A1c maior ou igual a 6,5%. Critérios do American College of Clinical Endocrinologists.
- Hipertensão Arterial Sistêmica caracterizada como Pressão Sistólica maior ou igual a 130 mmHg e Pressão Diastólica maior ou igual a 85 mmHg.
- Dislipidemia caracterizada como redução de colesterol HDL, elevação de triglicerídeos, aumento do colesterol total e LDL e níveis ALT e AST.

4.7.2 Testes Estatísticos

Foi realizada uma análise descritiva dos dados a partir do cálculo de médias, desvio padrão e proporções. Foram testadas as diferenças entre os graus de doença hepática gordurosa não alcoólica, em relação à histologia hepática, presença de EH ou EHNA através do teste não paramétrico Mann-Whitney de comparação de duas médias, visto que as variáveis não apresentavam distribuição normal. E o teste não paramétrico Kruskal Wallis, de comparação de múltiplas médias, para as variáveis com relação aos achados histológicos (degeneração em balão, inflamação lobular e presença de fibrose). Para testar a independência de classificação (associação entre variáveis) foi utilizado o teste Qui-quadrado de independência de Pearson e, quando necessário, o teste exato de Fisher. Em todos os testes foi adotado o nível de significância de 5%. Os cálculos foram feitos no software SPSS versão 20.0.

4.8 PROCEDIMENTOS ÉTICOS: Análise pela Comissão de Ética do HC/UFPE

4.8.1 Aprovação pelo comitê de ética do CCS

O presente projeto de pesquisa de doutorado **“Doença Hepática Gordurosa não-alcoólica em Cirurgia Bariátrica: Análise da Adiponectina, TNF- α ,**

Interleucina-6 e Fragmento CK-18 como marcadores de fibrose hepática” foi analisado e autorizado CEP/CCS/UFPE, conforme protocolo CEP ofício no 042/2003-CEP/CSS. (Anexo 4)

4.8.2 Proteção dos indivíduos e animais envolvidos no estudo

Este protocolo foi elaborado de acordo com os princípios éticos enunciados na Declaração de Helsinque (*World Medical Association, 2004*) e de acordo com a resolução 196/96 do CNS do Brasil.

4.8.3 Benefícios para os indivíduos, animais ou para a sociedade

Os sujeitos convidados a participar da pesquisa estarão em acompanhamento no ambulatório de cirurgia a obesidade do SCG-HC-UFP.

Não haverá qualquer interferência nas consultas médicas dos pacientes, que continuarão sendo acompanhados conforme a rotina do serviço.

5 Resultados

Foram avaliados 52 pacientes, com média de idade de 38 anos, IMC médio 40,74. Dentre os pacientes estudados, 42 (80,8%) apresentavam EH e 10 pacientes (19,2%) EHNA, sendo 1 portador de cirrose. Dentre as características clínicas, houve diferença estatística na variável média de idade, 43,78 anos (95% IC=34,32;53,25) para EH vs 35,48 anos (95% IC=32,0;38,9) para EHNA ($p=0,044$) e esofagite de refluxo 13,9% nos portadores de EH vs 66,7% vs EHNA $p=0,004$ (**tabela 3**). Não houve diferença significativa entre as variáveis: gêneros, tipo de cirurgia, IMC, tempo de obesidade, história familiar de obesidade, presença de hipertensão, dislipidemia, diabetes ou uso de hipoglicemiante oral, doença arterial coronariana, síndrome da apneia do sono, presença de hérnia hiatal ou gastrite. Tampouco houve ainda diferença com a presença de esteatose hepática à ultrassonografia.

Tabela 3: Características clínicas e comorbidades dos 52 pacientes com obesidade submetidos à cirurgia bariátrica

	Esteatose N=42 (80,8%)	EHNA N=10 (19,2%)	p value
Gênero	Masculino 20 (46,5%) Feminino 23 (53,5%)	4 (40%) 6 (60%)	1,00*
Idade (anos)	43,78 (95% IC=34,32-53,25)	35,48 (95% IC=32,0-38,9)	0,044*
Peso (kg)	120,01 (95% IC=103,6-136,6)	123,1 (95% IC=115,9-130,2)	0,780*
IMC	42,2 (95% IC=28,5;45,9)	40,0 (95% IC= 36,8-43,2)	0,569*
Tempo de Obesidade			
Entre 1 a 5 a	3 (7,0%)	1 (10%)	0,857 [#]
> 5 <=10 a	7 (16,3%)	1 (10%)	
cima de 10 anos	30 (69,8%)	7 (70%)	
Ant familiar de Ob	21 (48,8%)	6 (68% ^o)	0,467 [#]
HAS	23 (59%)	7 (77%)	0,451 [#]
DAC	0	2(5,6%)	0,478 [#]
Diabetes Hipoglicemiante	9 (25%) 11 (37,9%)	3 (33,3%) 5 (50,0%)	0,682
Dislipidemia	19 (51,4)	6 (66,7%)	0,478 [#]
SAOS	8 (24%)	4 (50%)	0,339 [#]
Esofagite	5 (13,9%)	6 (66,7%)	0,004 [#]
Hérnia Hiatal	3 (8,3)	1 (11,1%)	1,00 [#]
Gastrite	20 (54,1)	4 (44,4%)	0,884 [#]
USG	31 (81,6)	8 (88,9%)	1,00 [#]

IMC: índice de massa corpórea; HAS: hipertensão arterial sistêmica; DAC: doença arterial sistêmica, SAOS: síndrome de apneia obstrutiva do sono; USG: Ultrassonografia hepática
 Informação não disponível em 1 paciente do grupo da EHNA e 6 pacientes no grupo EH

*Teste exato de Fischer ou Teste de Qui-quadrado de Pearson

[#] Teste de Mann Whitney de comparação de médias

Na **tabela 4**, encontram-se os resultados com relação à função hepática, HOMA-IR, CK-18 ELISA. Com relação à função hepática, ferritina e glicemia não houve diferença estatística entre os grupos. Na avaliação do HOMA-IR não houve diferença significativa entre os grupos EH e EHNA, com 4,44 (95% IC=2,97-5,91) para EH vs 5,88 (95% IC=1,11-10,65) na EHNA, muito embora tenha sido maior no grupo na EHNA. Glicose, insulina e HOMA-IR não apresentaram diferença estatística entre os grupos embora o HOMA –IR tenha sido mais elevado no grupo da EHNA 5,88 (95% IC= 1,11-10,65) vs 4,44 (95% IC= 2,97-5,91) na EH. Glicose, insulina e HOMA-IR não apresentaram diferença estatística entre os grupos embora o HOMA –IR tenha sido mais elevado no grupo da EHNA 5,88 (95% IC= 1,11-10,65) vs 4,44 (95% IC= 2,97-5,91) na EH. Na análise do lipopolissacarídeo houve um aumento no grupo da EHNA 0,07 (95% IC=0,01-0,35) vs 0,15 (95% IC=0,01-0,35) não significativo, com $p=0,35$

Tabela 4 : Níveis séricos das enzimas hepáticas, ferritina, glicose, insulina, HOMA-IR, LPS e CK-18 ELISA dos 52 pacientes com DHGNA

	Esteatose (N=42)	EHNA (N=10)	p value
ALT (UI/mL)	32,21 (95% IC= 23,00-41,42)	22,11 (95% IC= 1,51-42,71)	0,102
AST (UI/mL)	45,52 (95% IC= 27,41-63,62)	37,00 (95% IC= 15,29-58,71)	0,991
Ferritina (ng /mL)	287,40 (95% IC= 167,66-497,14)	160,60 (95% IC= 62,62-258,58)	0,552
Glicose (mg/dL)	113,39 (95% IC= 98,52-128,27)	108,67 (95% IC= 91,75-125,59)	0,827
Insulina (UI/mL)	15,69 (95% IC= 11,31-20,27)	20,48 (95% IC= 5,99-34,97)	0,881
HOMA-IR	4,44 (95% IC= 2,97-5,91)	5,88 (95% IC= 1,11-10,65)	0,553
LPS ELISA (EU/mL)¹	0,07 (95% IC= 0-0,12)	0,15 (95% IC= 0,01-0,35)	0,303
CK-18 ELISA (ng/mL)²	2,55 (95% IC= 5,34-24,18)	14,76 (95% IC= 1,68-3,40)	0,183

ALT: Aspartato aminotransferase; AST: aspartate glutamiltransferase, HOMA-IR modelo de homeostase para avaliação de resistência Insulínica; LPS: lipopolissacarídeo; CK-18 ELISA: Fragmento CK-18 por ELISA imunoenensaio.

O cálculo do modelo de homeostase para avaliação de resistência Insulínica foi obtido através da fórmula: HOMA-IR = insulina de jejum (mU/L) x glicose plasmática plasma glucose (mg/dL)/450

¹ LPS foi dosada em 25 pacientes

²CK-18 ELISA foi dosado em 34 pacientes

Com relação aos marcadores inflamatórios dispostos na **tabela 5**, na quantificação do RNA da adiponectina, os valores encontrados foram na EH 70.231,32 ± 1124 e na EHNA 820.823,43 ± 3.555 (p=0,012). Com relação a quantificação do RNA da IL-6 na EH foi 1,394 ± 2,22 e EHNA 3,46 ± 2,95 (p= 0,015); do TNF- α , na EH foi 10,07 ± 9,76 e na EHNA 59,40 ± 61,87 (p=0,015). Com relação ao marcador de apoptose caspase-dependente, o fragmento CK-18 nos pacientes com EH, a média encontrada foi 5.858,15 ± 6.834,80 e nos pacientes com EHNA 24.066,55 ± 33.854,16 (p=0,016).

ADIPO: adiponectina, IL-6: Interleucina-6, TNF- α : fator de necrose tumoral-alfa, CK-18: Fragmento CK- 18,

Tabela 5. Quantificação da expressão de citocinas no tecido hepático por PCR-real time: Adiponectina, Interleucina-6, TNF- α CK-18 em pacientes obesos com DHGNA submetidos à cirurgia bariátrica

VARIÁVEIS	ESTEATOSE N =42 (80.8%)	EHNA N=10 (19.2%)	P value
ADIPO	70.231,54 ± 1.124	333.554,54 ± 3.555	0,012
IL-6	1,394 ± 2,22	3,46 ± 2,95	0,015
TNF-α	10,07 ± 9,76	59,40 ± 61,87	0,015
CK-18	58 18,16 ± 6.834,8	24.006,56 ± 33.854,16	0,016

As representações gráficas através do Boxplot encontram-se abaixo (**figuras 2-5**)

Figura 2. Boxplot e gráfico de média com intervalo de confiança para o marcador adiponectina nos pacientes com EHNA e esteatose hepática

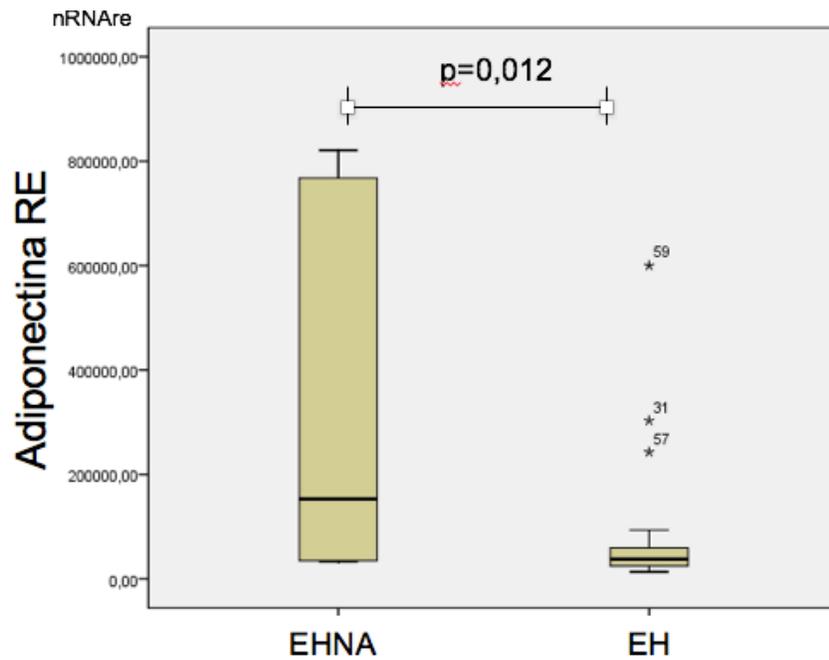


Figura 3: Boxplot e gráfico de média com intervalo de confiança para o marcador TNF- α nos pacientes com EHNA e esteatose hepática

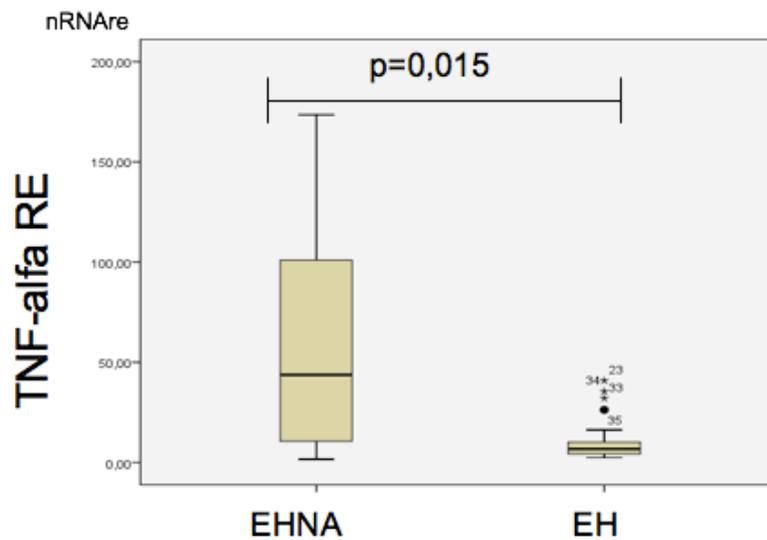


Figura 4: Boxplot e gráfico de média com intervalo de confiança para o marcador IL-6 nos pacientes com EHNA e Esteatose Hepática

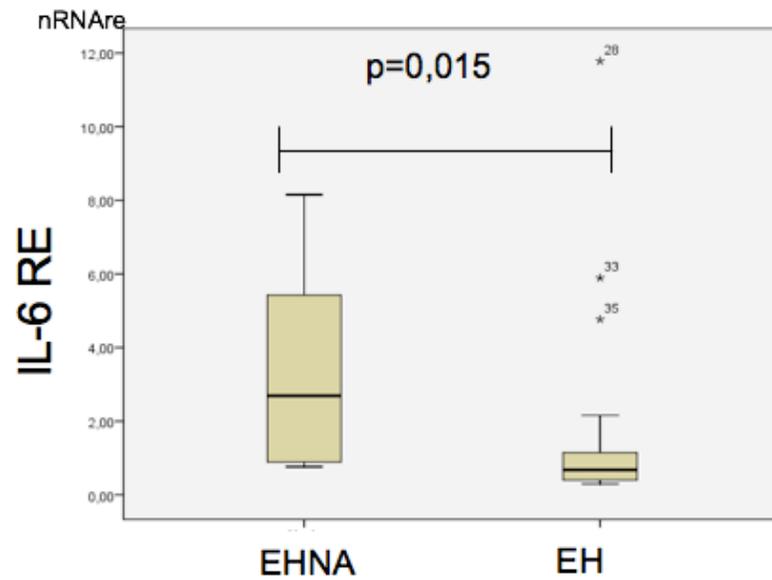
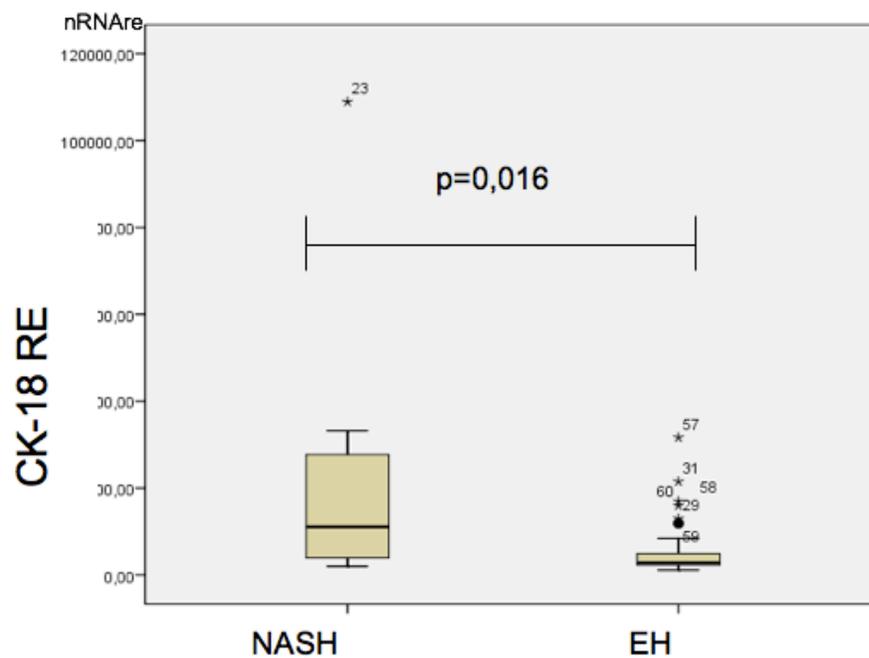


Figura 5: Boxplot e gráfico de média com intervalo de confiança para o marcador CK-18 nos pacientes com EHNA e Esteatose Hepática



Na **tabela 6** encontram-se os pacientes classificados de acordo com o tipo de Esteatose. Todos os 52 pacientes apresentavam macroesteatose, sendo que 29 pacientes apresentaram associação de mais de tipo de classificação da esteatose deles associado com medioesteatose e 8 com microesteatose,

Tabela 6. Classificação dos 52 pacientes de acordo com a presença de Esteatose Hepática (métodode Brunt e fibrose EHNA CRN sistema de escore histológico)

<i>Classificação Histológica</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
Macroesteatose		
1	20/52	38,5%
2	16/52	30,7%
3	11/52	21,2%
4	5/52	9,6%
Medioesteatose		
1	14/52	26,9%
2	10/52	19,2%
3	5/52	9,6%
Microesteatose		
1	4/52	7,6%
2	1/52	1,7%
3	3/52	5,9%

Na **tabela 7**, está descrição das alterações histológicas que classificam a DHGNA. Dos 42 pacientes com EH, 19 apresentaram degeneração em balão sendo 17/51 (27%) degeneração em balão grau 1 e 6/51 (8,8%) degeneração em balão grau 2, em 1 paciente essa informação não foi registrada. Com relação inflamação mista 25 pacientes apresentaram essa alteração sendo, 8 o grau 1, 4 grau 2 e 3 grau 3. A presença da fibrose perisinusoidal ocorreu em 16 pacientes sendo 9 grau, 1, 6 grau 2 e, apenas 1 grau 4, considerado cirrose hepática. Todos os 10 pacientes

com EHNA apresentaram alterações na expressão hepática do mRNA dos marcadores inflamatórios quando comparados aos com EH.

Tabela 7. Classificação dos 52 pacientes de acordo com os critérios para diagnóstico de EHNA (method of Brunt e fibrosis EHNA CRN histologic scoring system)

<i>Classificação Histológica</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
Degeneração em balão		
1	17/51*	27,9%
2	6/51*	8,8%
Inflamação portal mista		
1	18/52	34,6%
2	4/52	7,7%
3	3/52	1,9%
Fibrose Perisinusoidal		
1	9/52	17,3%
2	6/52	11,5%
4	1/52	1,9%

*Informação não coletada em 1 paciente.

Com relação aos achados histológicos e quantificação dos marcadores inflamatórios não se observou diferença estatística na expressão hepática dos marcadores inflamatórios naqueles pacientes com alteração histológica do tipo Degeneração em Balão. Já naqueles com alteração histológica tipo infiltrado inflamatório misto, verificou-se aumento da expressão do RNA da adiponectina ($p=0,02$). Por outro lado, nos pacientes alteração histológica do tipo fibrose perisinusoidal a expressão do TNF- α teve uma expressão elevada no tecido hepático com diferença estatística ($p=0,022$). (fig 6 e tabelas 8 a 9).

Figura 6: Boxplot e gráfico de média com intervalo de confiança para o marcador Adiponectina nos pacientes Infiltrado Inflamatório misto

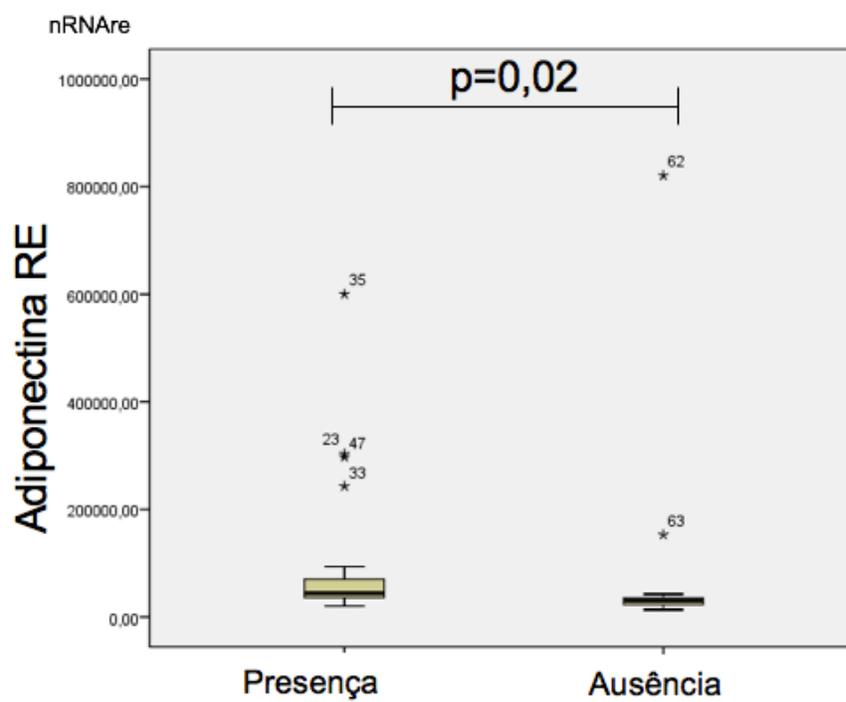


Tabela 8- Expressão hepática das citocinas em 23 pacientes com relação a presença da degeneração em balão.

	CK18.1 RE	ADIPO1 RE	IL-6 RE	TNFa RE
Chi-Square	1,409	2,624	3,880	,717
df	2	2	2	2
Asymp. Sig.	,494	,269	,144	,699
a. Kruskal Wallis Test	,398	,022	,436	,301
b. Grouping Variable: DEG BAL	,411 ^a	,022 ^a	,451 ^a	

a. Not corrected for ties. b. Grouping Variable: DEG BAL

Tabela 9- Expressão hepática das citocinas em 25 pacientes com relação a presença de inflamação mista.

	CK18.1 RE	ADIPO1 RE	IL-6 RE	TNFa RE
Mann-Whitney U	134,000	88,000	130,000	128,000
Wilcoxon W	239,000	193,000	383,000	233,000
Z	-,846	-2,286	-,779	-1,033
Asymp. Sig. (2-tailed)	,398	,022	,436	,301
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,411 ^a	,022 ^a	,451 ^a	,313 ^a

a. Not corrected for ties. b. Grouping Variable: Infamação_mista

**Tabela-10-Expressão das citocinas em 16
pacientes com relação a presença da Fibrose
Perisinusoidal**

	CK18.1 RE	ADIPO1 RE	IL-6 RE	TNFa RE
Chi-Square	4,778	4,403	4,964	8,851
df	2	2	2	2
Asymp. Sig.	,092	,111	,084	,012

a. Kruskal Wallis Test b. Grouping Variable: FPS_codificado_3

6 Discussão:

Os mecanismos relacionados à fibrogênese hepática são ainda pouco esclarecidos, especialmente quando relacionados à DHGNA, onde a resistência insulínica tem um papel central com suas múltiplas facetas, sejam elas obesidade, dislipidemia, diabetes, síndrome do ovário policístico, síndrome da apneia do sono. Vários fatores podem corroborar para os múltiplos insultos que deflagram os mecanismos de fibrose e apoptose do hepatócito^{1,13}

O entendimento do papel das adipocitocinas, especialmente adiponectina e TNF- α , são claramente antagônicos e os fatores que podem influenciá-las é de suma importância. A adiponectina sérica encontra-se reduzida em pacientes com Obesidade, RI, EH e EHNA, enquanto TNF- α e IL-6 encontram-se elevados em todas as fases na DHGNA, tanto na EH quanto na EHNA³⁷. Nenhum tratamento efetivo para fibrose avançada existe, exceto transplante. No entanto, em recentes anos, o conceito de reversibilidade da fibrogênese tem sido cada vez mais evidenciado na literatura⁴⁷. O tratamento da obesidade com cirurgia bariátrica ou fármacos com ação antiobesidade e antidiabética têm mostrado resposta benéfica na reversibilidade da EHNA^{18-20,48}.

Na população do estudo, foram avaliados 52 pacientes, sendo 42 (80,8%) com esteatose hepática e 10 com EHNA (19,2%), sendo um caso de cirrose hepática 1,8% (tabela 3). Tal frequência não difere da população descrita na literatura¹⁸⁻²⁰.

Não houve diferença entre as características clínicas dos pacientes, exceto quanto à idade, média de idade, 43,78 anos (95% IC=34,32-53,25) para EH vs 35,48 anos (95% IC=32,0- 38,9) para EHNA ($p=0,044$). Este achado ocorreu em recente estudo com população de obesos a serem submetidos à cirurgia bariátrica⁴⁹. Em estudo da história natural da DGHNA com biópsia sequenciada observou-se que o IMC, é um forte preditor de avanço da fibrose, obesidade central caracterizada por circunferência abdominal e HOMA e hipertrigliceridemia têm uma correlação igualmente forte com a progressão para. ⁴⁹⁻⁵⁰. No nosso estudo, apesar da média de insulina sérica e glicose e HOMA –IR ter sido maior no grupo da EHNA quando comparado a EH sugerindo maior RI nessa população, não foi significativo.

Interessantemente a presença de esofagite de refluxo também foi significativamente maior para o grupo da EHNA quando comparado à EH ($p=0,004$). Hung *et al*⁶¹ em 2014 em sua análise de 12.090 pacientes encaminhados para endoscopia de rotina, identificou em 1922 pacientes (15,3%) DHGNA e uma correlação positiva de esofagite erosiva. Essa correlação foi independente de obesidade visceral ou periférica e, o autor sugere um papel das citocinas inflamatórias especialmente interleucina 1 e 6.

Com relação aos marcadores de RI e função à hepática, tampouco houve diferença estatística. No entanto, houve uma tendência a um nível maior de insulina 15,69 UI/ml (11,31; 20,27) na EH vs 20,48 (5,99; 34,97) na EHNA com $p=0,081$ e do HOMA IR. A RI já tem um papel bem esclarecido na DHGNA como descreveu Day & James em 1998⁸.

Do total da amostra, 25 pacientes realizaram a dosagem do lipopolissacarídeo na EH com 0,07 EU/ml vs 0,15 EU/ml $p=0,303$, embora sem diferença estatística, mostra um expressivo aumento nos pacientes com EHNA. A dificuldade em realizar a dosagem da LPS é a necessidade na coleta de amostra estéril, embora toda metodologia tenha sido aplicada com rigor. A alteração da microbiota no obeso onde a relação firmicutes/bacteroidetes está modificada permite o aumento da permeabilidade intestinal, resultando na passagem de produtos bacterianos como o LPS e translocação bacteriana pela barreira intestinal. O LPS tem alta afinidade pelos AGL circulantes, os quais, por sua vez, tem uma alta especificidade para o *Toll Like Receptor-4* (TLR-4), esse complexo é responsável pela geração da Resistência Insulínica nos órgãos sensíveis, inclusive o fígado, levando ao acúmulo de gordura, à inflamação, à presença da DGHNA e suas formas mais graves, como EHNA e cirrose^{44,45}.

Diferentemente da Doença Hepática Alcoólica, a EHNA apresenta padrão de deposição de colágeno ao redor dos hepatócitos da zona 3, havendo progressão para fibrose portal e cirrose. Esse padrão é descrito em modelos animais, com evidente influência da inflamação presente, tipicamente na RI e obesidade¹⁷. A liberação de adipocitocinas, mobilização e ativação de macrófagos presentes no tecido adiposo, além de endotoxinas provenientes da microbiota intestinal e

estresse oxidativo, estão entre os mecanismos descritos para a ativação da célula estrelada e a cascata de apoptose do hepatócito, onde os estímulos persistem como um ciclo vicioso.

A adiponectina tem efeito anti-inflamatório no hepatócito, pois aumenta a oxidação dos ácidos graxos livres. Tem importante efeito protetor da apoptose dos hepatócitos pois facilita a remoção das células estreladas e de Kupffer³². Em um estudo em humanos, Salman *et al*²¹ avaliaram o nível sérico da adiponectina por ELISA. Foram 40 pacientes com cirrose hepática por vírus C, e 30 com cirrose/colestase, comparados a 20 controles saudáveis. Nos pacientes com cirrose a adiponectina foi significativamente elevada ($p < 0,001$). Quando os pacientes foram classificados por gravidade em Child A, B e C, os autores identificaram que os pacientes Child A e B tiveram níveis de adiponectina mais elevados ($p = 0,05$), mas o mesmo não foi observado em pacientes com Child C, a forma mais avançada da doença, onde a adiponectina foi encontrada em baixos níveis. O autor conclui que o elevado nível da adiponectina se deve ao seu papel anti-inflamatório na doença hepática.

Em recente revisão, Ramachandran & Iredale⁴⁶ descreveram um modelo explicativo bidirecional de fibrose e resolução de fibrose mediado por macrófagos. Nesse modelo, os autores sugerem um papel bidirecional da resposta imune inata. Macrófagos recrutados por atividade inflamatória secretam fatores que levam à fibrogênese, como TNF- α , IL-6 e TGF- β . Por outro lado, macrófagos também têm um papel crucial na resolução da fibrose. O autor conclui que macrófagos podem adotar funções distintas a depender do estímulo, tais como pró-fibrose ou anti-fibrose.

Além do estímulo de miofibroblastos, a degradação da matriz extracelular também tem um papel crucial na fibrogênese. Metalloproteinases da Matrix (MMPs) são endopeptidases que atuam formando a matrix extracelular e são inibidas pelo TIMP-1, miofibroblastos ativados produzem o TIMP-1 que agravam a fibrose. Por outro lado, miofibroblastos ativados também estimulam MMPs que promovem resolução da fibrose e produzem apoptose das células estreladas, tendo um papel antifibrótico⁴⁸. Em modelos animais, a adiponectina reduziu a mobilização das

células estreladas através da inibição da secreção do TIMP-1 (*promoting tissue inhibitor of metalloproteinase-1*), fornecendo um papel protetor, enquanto o TNF- α estimula as MMPs, tendo um papel pró-fibrótico, ou seja, adiponectina e TNF- α atuam com forças opostas em nível molecular, mantendo um papel dinâmico na hepatócito²¹. No presente estudo, os marcadores de inflamação foram estatisticamente mais elevados nos graus mais avançados da DHGNA, havendo aumento significativo nos pacientes com EHNA. Sendo assim, a expressão dos TNF- α e IL-6 foram significativamente elevadas nos pacientes com EHNA em relação aos pacientes com EH com $p=0,015$ para ambos os marcadores, e a adiponectina também foi estatisticamente mais elevada na EHNA com $p=0,016$. Sugerindo a participação da adiponectina e do TNF- α neste modelo bidirecional de formação e resolução de fibrose.

O papel da IL-6 não está bem elucidado²⁵. A IL-6 é uma citocina inflamatória derivada do tecido adiposo que tem relação com RI hepática e muscular, tem participação na teoria dos múltiplos insultos relacionados a DHGNA⁵¹. No entanto, em evidências recentes o papel da IL-6 na homeostase metabólica vem sendo questionado. A razão é o complexo mecanismo envolvido com a sua sinalização. Kraakman et al mostrou o bloqueio da interleucina solúvel não impede a ocorrência da resistência insulínica em modelos animais.

Alguns pontos fora da curva podem ser observados nos pacientes com esteatose, especialmente os casos #28, #33 e #35 (tabela 3). Nesses pacientes, ao fazer uma revisão dos dados clínicos observam-se os maiores níveis de colesterol. A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória derivada do tecido adiposo que tem relação com RI e hepática e muscular, uma importante participação na teoria dos múltiplos insultos relacionados a DHGNA⁴⁰⁻⁴¹.

Em adição, quando a análise foi realizada pelas características histológicas encontradas na DHGNA, como presença de degeneração em balão, inflamação lobular ou necroinflamação e fibrose, de acordo com a descrição EHNA-CRN score *histologic scoring system*¹⁷, não houve correlação positiva com a presença da degeneração em balão. Já a presença da necroinflamação teve uma correlação positiva com a expressão da adiponectina ($p=0,022$). Por outro lado, a expressão

do TNF- foi aumentada na presença de fibrose ($p=0,012$). Esses dados são apoiados pelo fato de que a adiponectina é uma proteína com papel antifibrótico e que atrai macrófagos que produzem apoptose das células fibrogênicas.

Em estudos em animais, a expressão da adiponectina foi aumentada em células estreladas ativadas, mas não nas quiescentes, o que revela o papel antifibrótico da adiponectina, que é de proteção da matrix extracelular hepática³⁰. Modelos animais são utilizados na tentativa de explicar a história natural da DHGNA e, sobretudo, sua progressão para EHNA e presença de fibrose. A maioria dos estudos utiliza modelos genéticos, indução química ou dieta deficiente em metionina. Um modelo animal desenvolvido para hipertensão com dieta rica em colesterol, ratos SHRP5/Dmcr (*Stroke-prone spontaneously hypertensive 5/Dmcr*) bastante semelhante à história natural da EHNA em humanos. Nesse estudo, a adiponectina mostrou um papel conflitante. Nos animais com EHNA, adiponectina encontrava-se reduzida no sangue, embora a expressão do seu receptor Adipo R2 (específico hepático), encontrava-se elevado, até que o TNF- α alcançasse seu maior valor. TNF- α esteve elevado em todas as etapas do estudo, até a último estágio^{26,27}. Os resultados deste estudo mostram um papel importante da adiponectina em nível molecular.

A progressão da fibrose ocorre por estímulo das células estreladas hepáticas e a apoptose celular por ativação da caspase, aumentando o fragmento CK-18. Em série de estudo com pacientes submetidos à cirurgia bariátrica, a dosagem sérica do CK-18 por método do ELISA imunoenensaio foi realizada na tentativa de encontrar um marcador não invasivo que permita a diferenciação entre EH e EHNA sem que seja necessária biópsia. No estudo de Feldstein *et al*⁵³, de caráter multicêntrico, 129 pacientes submetidos à biópsia hepática durante cirurgia bariátrica foram comparados a 150 controles. Os pacientes com fibrose hepática apresentaram média de elevação do CK-18 ELISA significativamente maior comparado aos sem fibrose. Para cada aumento de 50 U/L no plasma do CK-18 houve um aumento de 30% na chance de EHNA. Um ponto de corte de risco para EHNA foi estabelecido a quando o CK-18 estava acima de 335 U/L (196, 511) ($p<0,001$). Utilizando a curva ROC, a predição de EHNA vs não EHNA foi de 0,83 (0,61,0,78)⁵². Muitos modelos

não invasivos preditivos de EHNA são elaborados, seja utilizando dados clínicos, laboratoriais ou associados à imagem⁵⁴. Em 2011, Tamimi *et al*⁴¹ descreveram um painel para diagnóstico de EHNA associando sFas (soluble Fas) com fragment CK-18, com um valor preditivo de diagnóstico 0,93 vs 0,83 utilizando somente avaliação do Fas. O Fas e sFas correspondem a proteínas que estão associadas a RI e aumento de ácidos graxos livres. No nosso estudo, a expressão hepática do CK-18 foi significativamente elevada nos pacientes com EHNA comparada aos pacientes com EH p=0,016. Nesse estudo, a dosagem do CK-18 ELISA não foi significativa quando comparada à EH, no entanto houve grande perda de material por dificuldades técnicas em realizar o ELISA.

O nosso estudo tem como pontos fortes o rigoroso critério utilizado para o diagnóstico da DHGNA e sua classificação, e o achado inédito em humanos, do aumento da expressão das citocinas inflamatórias em pacientes com DHGNA, adiponectina, TNF- α e Il-6. Por outro lado, a população foi restrita a obesos moderado e grave, respeitando os critérios de indicação de cirurgia bariátrica das sociedades médicas, corroborando dificuldade em realizar estudos que envolvam biópsia hepática na população susceptível à DHGNA.

7 CONCLUSÕES

1. Houve maior expressão no tecido hepático das adipocitocinas: adiponectina, TNF- α , Interleucina-6 e Fragmento CK-18 de pacientes com esteatohepatite não-alcoólica (EHNA)
2. Houve diferença estatística entre os grupos analisados quanto aos parâmetros clínicos idade e esofagite de refluxo
3. Não houve correlação entre as dosagens plasmáticas das enzimas hepáticas AST, ALT, Ferritina, HOMA-IR do Lipopolissacarídeo (LPS) e do Fragmento CK-18 com os grupos estudados EH e EHNA
4. A quantificação do RNA da adiponectina no tecido hepático teve diferença estatística no achado histológico infiltrado inflamatório e o TNF- α com o achado de fibrose perisinusoidal

Nesse estudo identificamos a expressão de marcadores inflamatórios TNF- α , Interleucina-6 e fragmento CK-18 e antiinflamatório como a adiponectina em pacientes com a forma mais avançada da DHGNA, sugerindo um caráter dinâmico da doença com potencial de reversibilidade. Estudos com maior número de pacientes devem ser realizados para aumentar o poder estatístico da associação.

REFERÊNCIAS

1. Neuschwander-Tetri BA, Clark JM, Bass NM, Van Natta ML, Unalp-Arida A, Tonascia J, et al. Clinical, laboratory and histological associations in adults with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2010;52(3):913-24.
2. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clinic proceedings*. 1980;55(7):434-8.
3. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2016;64(1):73-84.
4. Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Systematic review: the diagnosis and staging of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2011;33(5):525-40.
5. Machado M, Marques-Vidal P, Cortez-Pinto H. Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery. *Journal of hepatology*. 2006;45(4):600-6.
6. Kemmer N, Neff GW, Franco E, Osman-Mohammed H, Leone J, Parkinson E, et al. Nonalcoholic fatty liver disease epidemic and its implications for liver transplantation. *Transplantation*. 2013;96(10):860-2.
7. Soderberg C, Stal P, Askling J, Glaumann H, Lindberg G, Marmur J, et al. Decreased survival of subjects with elevated liver function tests during a 28-year follow-up. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2010;51(2):595-602.
8. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*. 1998;114(4):842-5.
9. Bian Z, Ma X. Liver fibrogenesis in non-alcoholic steatohepatitis. *Frontiers in physiology*. 2012;3:248.
10. Guturu P, Duchini A. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: role of obesity, insulin resistance and mechanisms of hepatotoxicity. *International journal of hepatology*. 2012;2012:212865.

11. Wasmuth HE, Tacke F, Trautwein C. Chemokines in liver inflammation and fibrosis. *Seminars in liver disease*. 2010;30(3):215-25.
12. Wynn TA, Barron L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Seminars in liver disease*. 2010;30(3):245-57.
13. Cusi K. Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications. *Gastroenterology*. 2012;142(4):711-25 e 6.
14. 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.
15. Xu A.; Srinivasan s.; Anania FA.; The roles of leptin and adiponectin a novel paradigm in adipocytokine regulation of liver. *american journal of pathology*. 166(6):1655–69, 2005
16. Cadranel JF, Rufat P, Degos F. Practices of liver biopsy in France: results of a prospective nationwide survey. For the Group of Epidemiology of the French Association for the Study of the Liver (AFEF). *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2000;32(3):477-81.
17. Brunt EM, Tiniakos DG. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. *World journal of gastroenterology*. 2010;16(42):5286-96.
18. Rabl C, Campos GM. The impact of bariatric surgery on nonalcoholic steatohepatitis. *Seminars in liver disease*. 2012;32(1):80-91.
19. Barker KB, Palekar NA, Bowers SP, Goldberg JE, Pulcini JP, Harrison SA. Non-alcoholic steatohepatitis: effect of Roux-en-Y gastric bypass surgery. *The American journal of gastroenterology*. 2006;101(2):368-73.
20. Csendes A, Smok G, Burgos AM. Histological findings in the liver before and after gastric bypass. *Obesity surgery*. 2006;16(5):607-11.
21. Salman TA, Allam N, Azab GI, Shaarawy AA, Hassouna MM, El-Haddad OM. Study of adiponectin in chronic liver disease and cholestasis. *Hepatology international*. 2010;4(4):767-74.
22. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988;37(12):1595-607.

23. Wilcox G. Insulin and insulin resistance. *The Clinical biochemist Reviews*. 2005;26(2):19-39.
24. Einhorn D, Reaven GM, Cobin RH, Ford E, Ganda OP, Handelsman Y, et al. American College of Endocrinology position statement on the insulin resistance syndrome. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists*. 2003;9(3):237-52.
25. Stojavljevic S, Gomercic Palcic M, Virovic Jukic L, Smircic Duvnjak L, Duvnjak M. Adipokines and proinflammatory cytokines, the key mediators in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(48):18070-91.
26. Moriya T, Kitamori K, Naito H, Yanagiba Y, Ito Y, Yamagishi N, et al. Simultaneous changes in high-fat and high-cholesterol diet-induced steatohepatitis and severe fibrosis and those underlying molecular mechanisms in novel SHRSP5/Dmcr rat. *Environmental health and preventive medicine*. 2012;17(6):444-56.
27. Kitamori K, Naito H, Tamada H, Kobayashi M, Miyazawa D, Yasui Y, et al. Development of novel rat model for high-fat and high-cholesterol diet-induced steatohepatitis and severe fibrosis progression in SHRSP5/Dmcr. *Environmental health and preventive medicine*. 2012;17(3):173-82.
28. Silva TE, Colombo G, Schiavon LL. Adiponectin: A multitasking player in the field of liver diseases. *Diabetes & metabolism*. 2014;40(2):95-107.
29. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004;89(6):2548-56.
30. Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2003;112(1):91-100
31. 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: clinical and experimental*. 2011;60(3):313-26.

32. Seo YY, Cho YK, Bae JC, Seo MH, Park SE, Rhee EJ, et al. Tumor Necrosis Factor-alpha as a Predictor for the Development of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A 4-Year Follow-Up Study. *Endocrinology and metabolism (Seoul, Korea)*. 2013;28(1):41-5.
33. Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C. The multi-hit process and the antagonistic roles of tumor necrosis factor-alpha and adiponectin in non alcoholic fatty liver disease. *Hippokratia*. 2009;13(2):127; author reply 8.
34. Guo J, Friedman SL. Toll-like receptor 4 signaling in liver injury and hepatic fibrogenesis. *Fibrogenesis & tissue repair*. 2010;3:21.
35. Tomita K, Tamiya G, Ando S, Ohsumi K, Chiyo T, Mizutani A, et al. Tumour necrosis factor alpha signalling through activation of Kupffer cells plays an essential role in liver fibrosis of non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Gut*. 2006;55(3):415-24.
36. Tokushige K, Takakura M, Tsuchiya-Matsushita N, Taniai M, Hashimoto E, Shiratori K. Influence of TNF gene polymorphisms in Japanese patients with NASH and simple steatosis. *Journal of hepatology*. 2007;46(6):1104-10.
37. Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin? *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2004;40(1):46-54.
38. Tsochatzis EA, Papatheodoridis GV, Archimandritis AJ. Adipokines in nonalcoholic steatohepatitis: from pathogenesis to implications in diagnosis and therapy. *Mediators of inflammation*. 2009;2009:831670
39. Kumar R, Prakash S, Chhabra S, Singla V, Madan K, Gupta SD, et al. Association of pro-inflammatory cytokines, adipokines & oxidative stress with insulin resistance & non-alcoholic fatty liver disease. *The Indian journal of medical research*. 2012;136(2):229-36.
40. Geoffrey M. Cooper Robert E. Hausman. *The Cell: A Molecular Approach*, Sixth Edition.
41. Yang ZH, Yang SX, Qin CZ, Chen YX. Clinical values of elevated serum cytokeratin-18 levels in hepatitis: a meta-analysis. *Hepatitis monthly*. 2015;15(5):e25328.

42. Tamimi TI, Elgouhari HM, Alkhouri N, Yerian LM, Berk MP, Lopez R, et al. An apoptosis panel for nonalcoholic steatohepatitis diagnosis. *Journal of hepatology*. 2011;54(6):1224-9.
42. Pastuszak M, Groszewski K, Pastuszak M, Dyrła P, Wojtun S, Gil J. Cytokeratins in gastroenterology. Systematic review. *Przegląd gastroenterologiczny*. 2015;10(2):61-70
43. Yilmaz Y. Systematic review: caspase-cleaved fragments of cytokeratin 18 - the promises and challenges of a biomarker for chronic liver disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2009;30(11-12):1103-9.
44. Arslan N. Obesity, fatty liver disease and intestinal microbiota. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(44):16452-63
45. Zhang W, Hartmann R, Tun HM, Elson CO, Khafipour E, Garvey WT. Deletion of the Toll-Like Receptor 5 Gene Per Se Does Not Determine the Gut Microbiome Profile That Induces Metabolic Syndrome: Environment Trumps Genotype. *PloS one*. 2016;11(3):e0150943
46. Ramachandran P, Iredale JP. Liver fibrosis: a bidirectional model of fibrogenesis and resolution. *QJM: monthly journal of the Association of Physicians*. 2012;105(9):813-7
47. Armstrong MJ, Gaunt P, Aithal GP, Barton D, Hull D, Parker R, et al. Liraglutide safety and efficacy in patients with non-alcoholic steatohepatitis (LEAN): a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet (London, England)*. 2016;387(10019):679-90
48. Cordeiro L, Campos JM, dePaula PS, et al. Nonalcoholic steatohepatitis on preoperative period of gastric bypass: lack of correlation with degree of obesity Esteato-hepatite.ABCD. 013;26(Suplemento 1):39-42
49. Adams LA, Sanderson S, Lindor KD, Angulo P. The histological course of nonalcoholic fatty liver disease: a longitudinal study of 103 patients with sequential liver biopsies. 2003, *Jornal of Hepatology*, 42(2005):132–138
50. Hung, WC; Wu, J ; Yang, Y et al. Non alcoholic fatty liver disease vs obesity on the risk of erosive oesophagitis. *European Journal of Clinical Investigation*.2014;44(12), 1143-49.

51. Jamali R, Razavizade M, Arj A, Aarabi MH. Serum adipokines might predict liver histology findings in non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 2016; 22(21):5096–5103
52. Kraakman M, Kammoun HL et al. Blocking IL-6 trans-signaling prevents high-fat diet induced adipose tissue macrophage recruitment but does not improve insulin resistance 21, 403–416
53. Feldstein AE, Wieckowska A, Lopes AR, Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarker for nonalcoholic steatohepatitis: a multicenter validation study. *Hepatology*.2009 v. 50, n. 4, p. 1072–1078.
54. Alkhouri N, McCullough AJ. Noninvasive Diagnosis of NASH and Liver Fibrosis Within the Spectrum of NAFLD. *Gastroenterology & hepatology*. 2012;8(10):661-8

APÊNDICE

APÊNDICE A: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM ESTUDO CLÍNICO

Título: Doença Hepática Gordurosa Não-alcoólica em Cirurgia Bariátrica: Análise da Adiponectina, TNF- α , Interleucina-6 e Fragmento CK-18 como marcadores de DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO-ALCOÓLICA

Investigador Principal: Dra. Lúcia Helena de Oliveira Cordeiro

Orientadores: Dr. Josemberg Campos e Dr. José Luis Lima Filho

Unidade: Av. Prof. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50670-901, Tel.: 2126 8588

Você está sendo convidado (a) para participar de uma pesquisa cujo título é: **Doença Hepática Gordurosa Não-alcoólica em Cirurgia Bariátrica: Análise da Adiponectina, como marcadores de Doença hepática gordurosa não alcoólica**

O objetivo do projeto é avaliar substâncias que possam ser identificadas no sangue ou no tecido hepático que possam diferenciar a forma simples da esteatose hepática com a forma inflamatória chamada de esteato-hepatite. Essas substâncias são denominadas marcadores inflamatórios e são aqui denominadas Adiponectina, TNF- α , Interleucina-6 e Fragmento CK-18, pacientes com obesidade e suas complicações como diabetes, alteração das gorduras séricas tem um risco de 80 a 100 % de ter esteatose hepática sendo que 25% podem ter esteato-hepatite não alcoólica e a única forma de diferenciar é através da biópsia hepática. Com a análise desse fragmento hepático, será possível diferenciar quem é portador apenas do acúmulo de gordura no fígado daqueles que tem inflamação relacionada com essa gordura (chamado de esteatohepatite), que em alguns casos pode levar a cirrose hepática.

Estou ciente de que esta avaliação será realizada através da retirada de um diminuto fragmento do meu fígado, durante a cirurgia a qual serei submetido, e analisado posteriormente por um grupo de profissionais especializados.

Ao participar dessa pesquisa, além do benéfico natural da própria cirurgia, proporcionando perda de peso, controle do diabetes e das outras doenças associadas ao peso, você estará participando de uma pesquisa cujo resultado proporcionará um melhor entendimento sobre a relação da doença hepática gordurosa não alcoólica em pessoas com diabetes mellitus tipo II e sobrepeso (IMC 25-30kg/m²) ou obesidade (IMC > 30Kg/m²).

Também não podem ser excluídos os riscos relacionados com a retirada desse pequeno fragmento do fígado, como sangramento, que pode ser prontamente resolvido durante a cirurgia a qual estarei sendo submetido sem causar grandes repercussões, e dor no local da punção, geralmente de leve intensidade, que também pode ser tratada com medicações durante a recuperação da cirurgia realizada.

Entendo que minha participação neste estudo específico é inteiramente voluntária e não é, de forma alguma, condição para que receba qualquer outro tratamento médico nesta instituição.

Eu serei informado de qualquer alteração no estudo ou qualquer nova observação pertinente ao mesmo. Estou ciente que os médicos que estão conduzindo este estudo são capacitados e bem treinados, de forma a me oferecer os maiores benefícios possíveis. Todos os dados da minha participação neste estudo serão documentados e mantidos confidencialmente e estarão armazenados no computador pessoal da pesquisadora responsável, sendo disponíveis apenas para as autoridades de saúde e minha pessoa.

Como minha participação é voluntária, posso abandonar o estudo a qualquer momento, sem que isso resulte em qualquer penalidade ou perda de meus direitos nesta instituição. Não receberei compensação financeira por eventuais injúrias que possam me ocorrer, mas não me privo de meus direitos legais agindo desta forma.

Se eu tiver qualquer dúvida ou perguntas relativas a este estudo ou aos meus direitos, no que diz respeito à minha participação, ou ainda se quiser relatar eventos adversos, posso contatar a **Dra. Lúcia Cordeiro através do telefone (81) 8838-3838, correio eletrônico: luciacordeiro.endo@gmail.com**. O presente projeto foi

submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da UFPE (Hospital das Clínicas – Universidade Federal de Pernambuco. Av. Da Engenharia, s/n, 1º andar, Cidade Universitária, Recife- PE. CEP: 50740-600. Fone: 21268588

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação.

Eu concordo em seguir as instruções das pessoas que estão conduzindo e monitorizando este estudo, de forma a obter o máximo de benefícios da atenção médica oferecida por esta pesquisa.

Recife, ____ de _____ de _____

Assinatura do pesquisador

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Assinatura do paciente ou responsável

Testemunha 1: _____

Testemunha 2: _____

APÊNDICE B: Protocolo coleta de dados tese de doutorado:

Doença Hepática Gordurosa Não-alcoólica em Cirurgia Bariátrica: Análise da Adiponectina, TNF- α , Interleucina-6 e Fragmento CK-18 como marcadores de Doença hepática Gordurosa não-alcoólica.

Responsável: Dra. Lúcia Cordeiro

1. Identificação:

A.

Nome: _____

B. Número do Registro: _____

C. Endereço: _____

D. Telefones de contato:

1. (____) _____ 2. (____) _____

E. Idade: _____ anos Data nascimento: ____/____/19____

F. GÊNERO: M F

G. Profissão: _____

H. Estado Civil : H1.Casado H2.Solteiro H3.viúvo H4.divorciado H5

OUTRO

2. Dados da cirurgia:

A. Tipo de Cirurgia:

Derivação gástrica em Y Roux

a1.com anel a2. sem anel

Gastroplastia Vertical

C. Data da Cirurgia: ____/____/____

3. História do Sobrepeso/ obesidade:

A1. <2 anos

2-5 anos

5-10 anos

> 10 anos

B. História Familiar de sobrepeso/ obesidade: Pai Mãe Irmãos
Tios Outros _____

4. Antecedentes Pessoais:

B. Doenças associadas:

B1.HAS? Sim Não. Quais medicações:

B2.Dislipidemia? Sim Não. Quais medicações:

B3.Doença coronariana? Sim Não. Quais medicações: _____

B4.Dores articulares? Sim Não

Qual? joelhos tornozelos coluna outros _____

B5. Apneia do sono? Sim Não

B6. EDA: Esofagite Hérnia Hiatal Gastrite

Ultrassonografia: Esteatose Hepática Classificação: _____

Colelitíase Sim Não

Outros? _____

C. História de doença hepática:

C1. Hemotransfusão? Sim Não

C2. História de Hepatite? Sim Não

Se sim, qual? A B C (curado? sim não)

C3. História familiar de d. Hepática? Sim Não

Qual: _____

C4. Ingesta alcoólica? Sim Não

Qual bebida? _____

Quantidade: copos? _____ garrafas? _____

Qual freqüência? Dias/ semana: _____

Obs: ver tabela para calcular gramas de álcool/semana.

Mulheres: > 70g/semana? Sim Não

Homens: > 140g/semana? Sim Não

E. Diabetes? Sim Não

E1. Tempo de diabetes antes da cirurgia: <1 ano 1a 5 anos >10 anos

E2. Medicções: () Oral () Insulina () Nenhuma

E3. Tempo do hipoglicemiante: _____ anos. Qual (is)? _____

E4. Uso de Insulina? Sim Não

E5. Tempo de uso de insulina antes da cirurgia: <1 ano 1a 5 anos >10 anos

E6. Dose insulina diária: _____

E7. Diabetes (Familiar): () Pais () Avós () Irmãos () Tios () Primos

F. Tabagismo : sim não

G. Se Gênero feminino: uso de anticoncepcional oral? Sim Não. Qual _____

H. Outra doença associada? Sim Não

Qual? _____

5. EXAME FÍSICO:

Peso : _____ (Kg) Altura: _____ (cm) IMC: _____ Kg/m²

Circunferência abdominal: _____ cm Circunf. quadril _____

PA: _____

6. Tabela de Exames Complementares

DATA DA COLETA				
Adiponectina				
TNF- α				
Interleucina-6				
Fragmento CK-18				
Glicemia jejum				
Hb glicada				
AST				
ALT				
FA				
GGT				
Bilirrubina Total				
BD/BI				
Colest. Total				
C-HDL				
C-LDL				
Triglicerídeos				
Albumina sérica				
INR				
Ferritina				
Ferro sérico				
Insulina sérica				
PCR				

APÊNDICE-C**BIÓPSIA HEPÁTICA:**

NOME do paciente: _____

REG. _____

No. Lâmina _____ Página do livro: _____

Resultado:**7.1 CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DA ESTEATO-HEPATITE**

GRAU		0	1	2	3
Esteatose Macrovesicular					
Esteatose Microvesicular					
Esteatose Pura					
Degeneração em Balão					
Inflamação lobular					
	PMN				
	Linfócito				
	Lipogranulomas				
Inflamação trato portal					
	PMN				
	LMN				
Corpúsculos Mallory					
Núcleo Glicogenado					
Fibrose					
	Perisinusoidal				
	Portal				
	Fibrose septal				
Cirrose		S		N	

DHGNA

- Grau I
 Grau II
 Grau III
 Grau IV

FIBROSE

- Grau I
 Grau II
 Grau III

Perisinusoidal

- 0- não tem
 1- 1/3 da zona 3
 2- 2/3 da zona 3
 3- + 2/3 da zona 3

Portal

- 0- Nenhuma
 1- Até o trato portal
 2- F. periportal
 3- F. ponte com arquitetura nodular

Fibrose em ponte

- 0- não tem
 1- pouca
 2- maior que 1 cm
 3- fibrose em ponte com arq. nodular

<i>Gradação Necroinflamatória da Esteatohepatite</i>	
GRAU I:	Esteatose predominantemente macrovesicular em + de 50%
	Hepatócitos balonados ocasionais
	PMN lobular com ou sem linfócitos
	Inflamação crônica leve
GRAU II:	Esteatose qualquer grau
	Muitos hepatócitos balonados na zona 3
	PMN lobular com ou sem fibrose pericelular na zona 3
GRAU III:	Esteatose periacinar
	Baloneamento com desarranjo óbvio pp// em zona 3
	PMN associado a hepatócitos em balão
	Inflamação crônica leve a moderada

Fonte: Neushwander-Tetri & Caldwell. Non Alcoholic Steatohepatitis: summary of an AALSD - Single topic conference. Hepatology, 2003; 17(5):1202-19.

ANEXO**ANEXO A: PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Doença Hepática Gordurosa Não-alcoólica em Cirurgia Bariátrica: Análise da Adiponectina, TNF- α , Interleucina-6 e Fragmento CK-18 como marcadores de fibrose hepática

Pesquisador: Lucia Helena de Oliveira Cordeiro **Área Temática:** **Versão:** 1 **CAAE:** 34692714.8.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE **Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER Número do Parecer: 815.390

Data da Relatoria: 01/10/2014

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa apresentado na seleção para ingresso ao Programa- Ano Letivo 2013-Doutorado, pós graduação em cirurgia-CCS-UFPE. A doença hepática gordurosa não alcoólica do fígado (DHGNA) corresponde a um espectro de desordens que pode variar desde simples acúmulo de triglicerídeos até esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), fibrose, cirrose e hepatocarcinoma, sem relação com álcool e doença hepática viral, sendo uma condição clínica emergente no mundo.

O projeto visa avaliar a possibilidade de diagnóstico através de dosagens bioquímicas, sem necessidade de biópsia hepática. Os pacientes terão coleta de sangue para o processamento dos exames laboratoriais previstos na pesquisa e serão submetidos à biópsia hepática no intra-operatório da cirurgia bariátrica. O estudo vai ser desenvolvido no Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os pacientes serão selecionados nos ambulatórios de endocrinologia e de cirurgia geral do referido hospital, preenchendo os critérios de seleção para a cirurgia proposta. Serão estudados 50 pacientes.

Objetivo da Pesquisa:

Correlacionar a quantidade das substâncias adiponectina, TNF-, interleucina-6 e fragmento CK-18

Endereço: Av. da Engenharia s/no - 1o andar, sala 4, Prédio do CCS **Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600 **UF:** PE **Município:** RECIFE **Telefone:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

Página 01 de 03



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE /
UFPE-Continuação do Parecer: 815.390

através da técnica de extração de RNA do fragmento hepático com os diferentes graus de esteatose hepática e de fibrose hepática em pacientes submetidos à DGYR (Derivação gástrica em Y de Roux). Determinar a ocorrência de DHGNA e EHNA através da histologia hepática em pacientes com diferentes categorias de peso (sobrepeso, obesidade graus I, II e III), submetidos à DGYR.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Adequados

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante, inovadora que visa oferecer possibilidade de diagnóstico não invasivo para uma condição na qual a biópsia hepática tem sido o padrão ouro.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

adequados

Recomendações:

Nenhuma

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão e o pesquisador está autorizado para iniciar a coleta de dados. Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, após a entrega do relatório final, na PLATAFORMA BRASIL, através de "Notificação" e, após apreciação, será emitido Parecer Consubstanciado.

Endereço: Av. da Engenharia s/no - 1o andar, sala 4, Prédio do CCS **Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600 **UF:** PE **Município:** RECIFE **Telefone:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

Página 02 de 03



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE /
UFPE-Continuação do Parecer: 815.390

RECIFE, 01 de Outubro de 2014

Assinado por:

GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO (Coordenador)