



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU**

**LAYENE PEIXOTO BARROS**

**O potencial diagnóstico da fetuina-A sérica como  
biomarcador para distúrbios metabólicos  
associados à esteatose hepática não-alcoólica**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Ciências – Área: Patologia.

Orientador: Prof. Titular Roberto Carlos Burini  
Co-orientadora: Profa. Dra. Camila Renata Corrêa Camacho

**Botucatu  
2019**

LAYENE PEIXOTO BARROS

**O potencial diagnóstico da fetuina-A sérica como  
biomarcador para distúrbios metabólicos  
associados à esteatose hepática não-alcoólica**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Ciências – Área: Patologia.

Orientador: Prof. Titular Roberto Carlos Burini  
Co-orientadora: Profa. Dra. Camila Renata Corrêa Camacho

**Botucatu  
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Barros, Layene Peixoto.

O potencial diagnóstico da fetuina-A sérica como biomarcador para distúrbios metabólicos associados à esteatose hepática não-alcoólica / Layene Peixoto Barros. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu  
Orientador: Roberto Carlos Burini Coorientador:  
Camila Renata Corrêa Camacho Capes: 40105008

1. Hepatopatia gordurosa não alcoólica. 2. Fetuínas.  
3. Inflamação. 4. Fibrose hepática. 5. Doenças cardiovasculares.

Palavras-chave: Doença Gordurosa Hepática Não-Alcoólica; Doenças Cardiovasculares; Fetuina-A; Fibrose Hepática; Inflamação.

**LAYENE PEIXOTO BARROS**

**O potencial diagnóstico da fetuina-A sérica como  
biomarcador para distúrbios metabólicos  
associados à esteatose hepática não-alcoólica**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Ciências – Área: Patologia.

Orientador: Prof. Titular Roberto Carlos Burini  
Co-orientadora: Profa. Dra. Camila Renata Corrêa Camacho

**Comissão examinadora:**

\_\_\_\_\_  
Prof. Titular Roberto Carlos Burini

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Rodrigo Minoru Manda

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Fernando Gomes Romeiro

Botucatu, \_\_\_\_\_ de Julho de 2019.

## *Dedicatória*

*Aos meus pais, Natalina Peixoto Barros e José Ivam da Silva Barros*

*Eu tenho muito ou tudo a agradecer a vocês...*

*Vocês quem se sacrificaram, se dedicaram, abdicaram de projetos pessoais para que eu tivesse a oportunidade de estudar e de ter uma boa formação profissional e pessoal.*

*Vocês quem sempre se esforçaram para me darem o melhor de vocês, me ensinaram princípios, como ser honesta, humilde e corajosa.*

*Vocês me deram todo apoio, me ensinaram o amor que serve como fundamento, força e segurança para me permitir voar.*

*Eu devo tudo que sou a vocês!*

*Se hoje cheguei até aqui, se realizei mais um sonho, foi porque vocês vieram segurando a minha mão. Nunca me disseram que iria ser fácil, mas sempre me ensinaram a lutar e buscar pelos meus sonhos.*

*E a cada sonho que eu compartilho com vocês, mesmo sem entender, vocês sempre estão ao meu lado e me encorajam a buscá-lo.*

*Agradeço a Deus pela vida e família que me deu.*

*Agradeço a vocês por cumprirem o papel de pais com excelência.*

*Obrigada, aos melhores do mundo, meu pai e minha mãe.*

*Eu dedico este título a vocês!*

*Sem vocês, nada disso seria possível. Eu amo muito vocês!*

*“Honra teu pai e tua mãe, a fim de que tenhas vida longa na terra que o Senhor, teu Deus, te dá.” (Êxodo 20:12)*

*À minha irmã, Luísa Peixoto Barros*

*Pode ser que você ainda não compreenda o motivo da minha distância, e que até goste de ser viver como “filha única”. Mas, por todo tempo que estive longe, por um propósito, saiba que você foi diariamente, a minha maior saudade. Abrir mão de te ver crescer, de compartilhar sua infância e não estar 100% presente, não foi fácil. Dedico esta conquista a você, e espero que um dia se orgulhe da sua irmã mais velha.*

*E quando você crescer, e quiser voar, eu estarei ao seu lado para te apoiar e te aconselhar. Eu te amo, minha pequena!*

*“Guie uma criança pelo caminho que ela deve seguir e guie-se por ela de vez em quando.”(Josh Billings)*

## *Agradecimentos especiais*

*Ao professor Roberto Carlos Burini*

*Com quem eu tanto aprendi, e aprendo. O senhor é um exemplo de professor e mestre, sinto-me orgulhosa de ter sido orientada pelo senhor. Obrigada pela sua atenção, dedicação, comprometimento e paciência, por me despertar a curiosidade e me permitir conviver na prática o que é Ciência. Gratidão pelos aprendizados, que literatura nenhuma poderia me proporcionar.*

*“Educar verdadeiramente não é ensinar fatos novos ou enumerar fórmulas prontas, mas sim preparar a mente para pensar.”*

*(Albert Einstein)*

*À professora, Camila Renata Corrêa Camacho*

*Obrigada por aceitar ser minha coorientadora, pela sua atenção e suporte no conhecimento científico e nas análises laboratoriais.*

*“Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe.”*

*(Clarice Lispector)*

*Aos biomédicos, Rodrigo Minoru Manda e Hugo Tadashi Kano*

*Obrigada meus amigos e colegas de trabalho, por me receberam muito bem no grupo e na equipe de laboratório, vocês foram essenciais na minha formação, e são exemplos de profissionais. Obrigada por sempre estarem dispostos a me ajudar e pela paciência de ensinar.*

*“A amizade se expressa na ajuda mútua e na gratidão.”*

*(Santo Agostinho)*

*Ao Dr. Fernando Gomes Romeiro*

*Meus agradecimentos pela prontidão e gentileza no aceite em participar da banca de qualificação e defesa. Obrigada por me permitir contar com a sua experiência profissional e pela sua contribuição para enriquecer o meu trabalho.*

*“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez.”*

*(George Bernard Shaw)*

### *À minha amiga, Mariana Santoro Nakagaki*

*Agradeço primeiramente a Deus por ter te colocado na minha vida. Obrigada por ser minha amiga e a melhor vizinha que eu poderia ter, por ter me ensinado sobre educação física e lições de vida, e me ajudado sempre que eu precisei. Obrigada por ser a minha família e a irmã mais velha aqui em Botucatu. Você me faz muita falta nessa cidade, obrigada por ter marcado a minha vida. “Só não vê anjo quem não presta atenção nas pessoas que Deus coloca em nossas vidas.” (Autor desconhecido)*

### *Aos meus amigos, Carol Bernardino, Ana Carolina Malacize, Giovana Dêgelo, Tânia Rodrigues, Leid Prado, Beatriz Cabrini e Rafael Lima*

*Obrigada amigos, pela amizade e companheirismo que construímos ao longo desses anos, pelas nossas conversas, conselhos e apoio quando precisei. Gratidão em ter vocês na minha vida. Com certeza, minha estadia em Botucatu foi melhor com a presença de vocês. Obrigada de coração, por tudo. “A amizade duplica as alegrias e divide as tristezas.” (Francis Bacon)*

### *Ao meu namorado, Caio Augusto Uguetto de Andrade*

*Meu amor, você foi o melhor presente que ganhei de Botucatu. Obrigada por ter entrado na minha vida de uma maneira tão especial, ter cuidado de mim quando mais precisei e por ter continuado ao meu lado em todos os momentos. Minha imensa gratidão pelo seu cuidado, compreensão e paciência comigo nesse tempo. “Não é que você seja diferente, mas é que ninguém consegue ser igual a você.” (William Shakespeare)*

### *À equipe do Centro de Metabolismo em Exercício e Nutrição (CeMENutri)*

*Minha imensa gratidão por cada um que fez e faz parte desse time, à equipe de nutrição, profissionais de educação física, fisioterapeutas, médicos e, principalmente, aos meus companheiros de profissão biomédicos e laboratoristas, por todo suporte científico, pela contribuição na coleta e interpretação dos dados. Todos vocês me ensinaram muito e acrescentaram na minha vida profissional. “Eu sou parte de uma equipe. Então, quando venço, não sou eu apenas quem vence. De certa forma termino o trabalho de um grupo enorme de pessoas.” (Ayrton Senna)*

## *Agradecimentos*

*Aos participantes do Programa para Mudança de Estilo de Vida  
"Mexa-se Pró-Saúde"*

*Obrigada pelo consentimento em participar das avaliações do meu estudo e por confiarem no nosso trabalho.*

*"O melhor exercício é aquele que é feito" (Roberto Carlos Burini)*

*À Regina Moreto, responsável pelo laboratório de ELISA da UNIPEX  
Obrigada pelo seu tempo me ajudando para obter resultados confiáveis nas avaliações e por me explicar com paciência e dedicação.*

*Ao Escritório de Apoio à Pesquisa*

*Ao Professor José Eduardo Corrente*

*Muito obrigada pelo auxílio nas análises estatísticas e por sempre me atender e esclarecer minhas dúvidas com paciência.*

*À pós-graduação em Patologia*

*À Professora Coordenadora Márcia Guimarães da Silva*

*Não fui aluna de graduação pela UNESP, mas tive a honra de poder ser aluna ouvinte nas aulas de Patologia ministrada pela senhora.*

*Foi um período cansativo, pelo qual não me arrependo, e fizeram diferença não só para o meu ingresso no programa de pós-graduação pela Patologia, mas também no meu desenvolvimento profissional.*

*Obrigada!*

*À Vânia Soler*

*Obrigada por sempre sanar as minhas dúvidas e me ajudar com todas as questões burocráticas.*

*À CNPq*

*Obrigada pelo fornecimento da bolsa de Mestrado.*



## *Epígrafe*

*“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo.”*

*(Martin Luther King)*

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

### Artigo de Revisão da Literatura

AGL: ácidos graxos livres  
AHSG: glicoproteína alpha 2-Heremans-Schmid  
CREBP: CREB-*binding protein*  
DAMPs: padrões moleculares associados aos danos  
DCV: doença cardiovascular  
DGHNA: doença gordurosa hepática não-alcoólica  
DM2: diabetes *mellitus* tipo 2  
EHNA: esteato hepatite não-alcoólica  
ERK 1/2: quinases reguladas por sinal extracelular  
HDL-c: lipoproteína de alta densidade-colesterol  
HMGB1: *High-mobility group box 1 protein*  
HOMA-IR: modelo homeostático de avaliação da resistência à insulina  
IL: interleucina  
IL-6: interleucina-6  
IL-1 $\beta$ : interleucina-1beta  
JNK: Jun NH2-terminal kinase  
kDa: kilodalton  
LDL-c: lipoproteína de baixa densidade-colesterol  
LBP: lipopolissacarídeo  
LPS: proteína ligadora de lipopolissacarídeo  
MCP-1: proteína quimiotática de monócitos-1  
MAPK: proteína-quinases ativadas por mitógenos  
NAFLD: non-alcoholic fatty liver disease  
NF-kB: fator nuclear *kappa B*  
PAMPs: padrões moleculares associados aos patógenos  
PCR: proteína c-reativa  
PFA: proteína de fase aguda  
RE: retículo endoplasmático  
RI: resistência insulínica  
RBP: proteína ligadora do retinol  
SM: síndrome metabólica  
TLR: *toll like receptor*  
TLR-4: *toll like receptor-4*  
TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral-alpha

### Artigo Científico

AASLD: *American Association for the Study of Liver Diseases*  
AGL: ácido graxo livre  
AHA: *American Heart Association*  
ALT: alanina aminotransferase  
AST: aspartato aminotransferase  
CA: circunferência abdominal  
CeMENutri: Centro de Metabolismo em Exercício e Nutrição  
CEP: Comitê de ética em pesquisa  
CT: colesterol total  
CVD: *cardiovascular disease*  
DCNT: doenças crônicas não-transmissíveis

DCV: doenças cardiovasculares  
DGHNA: doença gordurosa hepática não-alcoólica  
DM2: diabetes *mellitus* tipo 2  
EF: Escore de Framingham  
EHNA: esteatohepatite não-alcoólica  
ELISA: ensaio imunoadsorvente ligado à enzima  
FLI: *fatty liver index*  
γ-GT: gama-glutamiltranspeptidase  
HDL-c: lipoproteína de alta densidade-colesterol  
HOMA-IR: modelo homeostático de avaliação da resistência à insulina  
hs-CRP: *high-sensitivity C-reactive protein*  
IAP: Índice aterogênico plasmático  
IAS-ad: Índice de alimentação saudável - adaptado  
IGH: Índice de gordura hepática  
IL-6: interleucina-6  
IMC: Índice de massa corporal  
IPAQ: questionário internacional de atividade física  
IR: insulin resistance  
K3EDTA: etileno diamino tetra acetato de potássio  
LBP: proteína ligadora de lipopolissacarídeo  
LDL-c: lipoproteína de baixa densidade-colesterol  
LPS: lipopolissacarídeo  
mRNA: ácido ribonucleico mensageiro  
NAF: nível de atividade física  
NAFLD: *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*  
NCEP-ATPIII: *National Cholesterol Program's Adult Treatment Panel III*  
NFS: *NAFLD Fibrosis Score*  
NF-κB: fator nuclear kappa B  
NHLBI: *National Heart Lung and Blood Institute*  
PAD: pressão arterial diastólica  
PAS: pressão arterial sistólica  
PCR-us: proteína-C reativa ultra-sensível  
PFA: proteína de fase aguda  
RI: resistência insulínica  
SM: síndrome metabólica  
TG: triacilglicerol  
TGF-β1: Fator de crescimento transformador-beta1  
TLR: *toll like receptor*  
TLR-4: *toll like receptor-4*  
TNF-α: fator de necrose tumoral-alpha  
UNESP: Universidade Estadual Paulista  
VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade

## SUMÁRIO

### ***CAPÍTULO I: REVISÃO DA LITERATURA***

RESUMO.....	14
ABSTRACT .....	15
1. Introdução .....	16
2. Ação inflamatória na evolução da DGHNA.....	17
2.1. Resposta positiva da fase-aguda .....	18
2.2. Resposta negativa da fase aguda.....	19
3. Fetuina-A.....	20
3.1. Papel fisiopatológico da fetuina-A.....	21
3.1.1. Fetuina-A: Resistência Insulínica, Esteatose Hepática e Inflamação .....	21
3.1.2. Fetuina-A: Síndrome Metabólica.....	22
3.1.3. Fetuina-A: Inibição da calcificação extra-esquelética .....	22
3.1.4. Fetuina-A: Doenças Cardiovasculares.....	22
4. Considerações finais .....	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	25

### ***CAPÍTULO II: ARTIGO ORIGINAL***

RESUMO.....	34
ABSTRACT .....	35
1. INTRODUÇÃO .....	36
3. METODOLOGIA.....	38
3.1. Delineamento do Estudo .....	38
3.2. População do Estudo .....	38
3.3. Avaliação Clínica.....	40
3.4. Caracterização Demográfica, Socioeconômica e Nível de Atividade Física ...	41
3.5. Avaliação Antropométrica .....	41
3.6. Avaliação da Ingestão Alimentar.....	42
3.7. Avaliação Bioquímica .....	42
3.7.1. Estresse Inflamatório .....	43
3.7.2. Proteína Ligadora de Lipopolissacarídeo.....	44
3.7.3. Fetuina-A .....	44

3.8. Diagnóstico da Síndrome Metabólica.....	44
3.9. Resistência Insulínica e Diagnóstico de Diabetes <i>Mellitus</i> Tipo 2.....	45
3.10. Índice de Gordura Hepática .....	45
3.11. Escore de Fibrose Hepática .....	46
3.12. Índice Aterogênico Plasmático .....	46
3.13. Escore de <i>Framingham</i> .....	47
3.14. Análise Estatística.....	47
4. RESULTADOS .....	48
4.1. Caracterização da Amostra.....	48
4.2. Caracterização das Mulheres com DGHNA .....	50
5. DISCUSSÃO .....	54
6. CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	61
ANEXO 1.....	71

*Capítulo I*  
*Revisão da Literatura*

## RESUMO

BARROS, LP; BURINI RC. **O papel diagnóstico da fetuina-A nas complicações metabólicas da doença gordurosa hepática não-alcoólica.** Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2019.

A doença gordurosa hepática não-alcoólica (DGHNA) é uma epidemia mundial, e está associada a diversas doenças cardiometabólicas, tendo como um dos mecanismos etiológico o estado inflamatório. Durante a inflamação, o fígado sintetiza e libera proteínas de fase aguda. A fetuina-A, considerada proteína de fase aguda negativa é sintetizada principalmente pelo fígado, e sua concentração sérica está associada ao acúmulo de gordura no fígado. Fisiologicamente, a fetuina-A atua na inibição do receptor de insulina tirosina quinase e, portanto, associada à resistência insulínica comumente encontrada em doenças como obesidade, síndrome metabólica, DGHNA e diabetes mellitus tipo 2. A fetuina-A desempenha papel potencialmente protetor contra doença arterial coronariana e eventos cardiovasculares agudos, evitando a precipitação espontânea de minerais no endotélio, devido sua atuação como inibidor da calcificação ectópica. Associações de alta e baixa concentração de fetuina-A com doenças cardiovasculares e risco de mortalidade têm sido relatadas. Assim, a fetuina-A é multifuncional e o papel diagnóstico da fetuina-A nas complicações metabólicas da DGHNA ainda é discutido. O objetivo da presente revisão narrativa é discutir evidências científicas que embasam a relação da DGHNA com a fetuina-A, bem como o papel fisiopatológico dessa proteína nas doenças metabólicas associadas à DGHNA e doenças cardiovasculares.

**Palavras-chave:** Fetuina-A; Doença Gordurosa Hepática Não-Alcoólica, Resistência Insulínica, Síndrome Metabólica; Doenças Cardiovasculares.

## ABSTRACT

BARROS, LP; BURINI, RC. **The diagnostic role of fetuin-A in the metabolic complications of non-alcoholic fatty liver disease.** Thesis (Master) - Botucatu Medical School, State University of São Paulo, Botucatu, 2019.

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a worldwide epidemic, and is associated with several cardiometabolic diseases, with one of the etiological mechanisms being the inflammatory state. During inflammation, the liver synthesizes and releases acute phase proteins. Fetuin-A, a negative acute phase protein, is synthesized mainly by the liver, and its serum concentration is associated with accumulation of fat in the liver. Physiologically, fetuin-A acts on inhibition of the insulin receptor tyrosine kinase and, therefore, insulin resistance, commonly found in diseases such as obesity, metabolic syndrome, NAFLD and type 2 diabetes mellitus. Fetuin-A plays a potentially protective role against coronary artery disease and acute cardiovascular events, preventing the spontaneous precipitation of minerals in the vasculature due to its action as an inhibitor of ectopic calcification. Associations of high and low concentration of fetuin-A with cardiovascular diseases and mortality risk have been reported. Thus, fetuin-A is multifunctional and the diagnostic role of fetuin-A in the metabolic complications of NAFLD is still discussed. The aim of the present narrative review is to discuss scientific evidence supporting the relationship between NAFLD and fetuin-A, as well as the pathophysiological role of this protein in the metabolic diseases associated with NAFLD and cardiovascular diseases.

**Key-words:** Fetuin-A; Non-Alcoholic Fatty Liver Disease; Insulin Resistance, Metabolic Syndrome; Cardiovascular Diseases.



## 1. Introdução

A esteatose hepática, na ausência de causas secundárias, como o consumo excessivo de álcool e drogas esteatogênicas, caracteriza a Doença Gordurosa Hepática Não-Alcoólica (DGHNA), considerada epidemia mundial, de grave ameaça à saúde pública (1). A DGHNA possui espectro progressivo, que inclui esteatose hepática, esteatohepatite não-alcoólica (EHNA), fibrose hepática, cirrose e carcinoma hepatocelular (2, 3). A DGHNA é considerada como manifestação hepática da síndrome metabólica (SM) (4). A DGHNA afeta cerca de 30 a 50% de diabéticos, enquanto nas populações obesas e dislipidêmicas, sua prevalência sobe para 90% (5).

A DGHNA resulta do acúmulo de gordura ectópica, provavelmente secundário à resistência à insulina (RI) (6). Adicionalmente, sabe-se que o acúmulo de gordura em regiões ectópicas, particularmente no fígado, é geralmente acompanhado por inflamação, e que, a disbiose intestinal e o consequente processo inflamatório decorrente, fazem parte da progressão da DGHNA a EHNA (7). A EHNA é doença modulada por numerosos fatores, incluindo metabólicos, genéticos, ambientais e com comprometimento da microbiota intestinal. Os mecanismos que levam um paciente a desenvolver EHNA e outro a ter apenas esteatose hepática simples não estão bem delineados (8).

O processo inflamatório crônico de baixo grau é relevante na patogenia de várias doenças (9). A resposta inflamatória subaguda induzida pela esteatose hepática pode ser detectada sistemicamente, pela dosagem da proteína C-reativa (PCR), proteína de fase aguda positiva produzida principalmente no fígado (10). As concentrações séricas de PCR são maiores em pacientes com EHNA histologicamente comprovada em comparação com a esteatose simples (11). Analogamente à PCR, o fígado produz também a fetuina-A. Entretanto, ao contrário da PCR, a fetuina-A é considerada proteína de fase aguda negativa (12, 13).

Fisiologicamente, no fígado, a fetuina-A é inibidora do receptor de insulina tirosina quinase e, portanto, associado à RI, comumente encontrada em doenças como obesidade, síndrome metabólica (SM), DGHNA e diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (13, 14). No vaso sanguíneo, a fetuina-A desempenha papel protetor na evolução da calcificação arterial, pois atua inibindo a calcificação extra-óssea. Quando desregulada, a fetuina-A pode levar à calcificação ectópica, contribuindo

para a aterosclerose (15, 16). Assim, a fetuina-A é multifuncional e suas concentrações séricas estão associadas às diversas doenças, mas o seu papel como potencial biomarcador para essas doenças, ainda é discutido. O objetivo da presente revisão narrativa é discutir evidências científicas que embasam a relação da DGHNA com a fetuina-A, bem como o papel fisiopatológico dessa proteína nas doenças metabólicas associadas à DGHNA e doenças cardiovasculares (DCV).

## 2. Ação inflamatória na evolução da DGHNA

Como já mencionado, a DGHNA resulta do acúmulo de gordura ectópica, provavelmente secundária à RI, sendo que a RI, via serina quinase pode ser ativada pela Jun NH2-terminal kinase (JNK), conseqüente tanto ao acúmulo de ácidos graxos livres (AGL) e formação de ceramida, como por citocinas pró-inflamatórias e/ou pelo estresse oxidativo (17). Na DGHNA todos esses mecanismos fisiopatológicos podem estar presentes (6).

No caso do acúmulo de AGL no hepatócito, o maior afluxo de AGL ao fígado pode ocorrer, conseqüente ao aumento da lipólise do tecido adiposo periférico (6) e liberação dos mesmos na circulação. Estes AGL saturados são reconhecidos, pelos hepatócitos, como padrões moleculares associados aos danos (DAMPs) ligantes do *toll-like receptor-4* (TLR-4) da membrana celular (18). Desta forma, podem induzir inflamação estimulando, intracelularmente, o fator nuclear *kappa B* (NF- $\kappa$ B) e a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (19, 20). Subseqüentemente, estas citocinas pró-inflamatórias, particularmente a interleucina-6 (IL-6), suprimem a produção de adiponectina, hormônio inibidor da lipogênese hepática e estimulador da utilização de glicose e da oxidação de ácidos graxos (21). Com a inibição da beta-oxidação e com maior lipogênese há maior esterificação dos AGL formando triacilglicerol e ceramida. Por outro lado, sabe-se que os adipócitos expandidos no fígado são biologicamente ativos e secretam várias quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias (22), incluindo proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleucinas (IL) causando estado inflamatório de baixo grau, que é relatado como promotor da resistência à insulina (23-25).

O fígado é órgão metabolizador, mas não estocador de gorduras, portanto, a quantidade excessiva de triacilglicerol (ou ceramida) intra-hepática

representa desequilíbrio metabólico e está associada a alterações adversas no metabolismo da glicose, ácidos graxos e lipoproteína (26). Neste último, a DGHNA tem sido independentemente associada com aumento de pequenas partículas densas de lipoproteínas de baixa densidade-colesterol (LDL-c) e diminuição da concentração de lipoproteínas de alta densidade-colesterol (HDL-c), resultando em padrão mais aterogênico (6, 27).

A possibilidade adicional ou alternativa da atividade inflamatória hepática pode ser decorrente de citocinas ou outras substâncias pró-inflamatórias levadas ao fígado pela circulação Porta (28). Por exemplo, o lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano, de origem intestinal, que desencadeia a ativação inicial do NF- $\kappa$ B e MAPK com produção de quimiocinas e citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (29-31). Sabe-se que o fígado é importante órgão do sistema imune inato. Grande parte (80%-90%) dos macrófagos de tecido hepático são células de Kupffer (32). As substâncias pró-inflamatórias ativam as células de Kupffer existentes a liberarem citocinas, mas não implicam no aumento do número de macrófagos (33).

Em resumo, pela teoria “da dupla agressão” vigente, a progressão da esteatose hepática a EHNA, o dano hepático inicial (“*first hit*”) seria dado pelo acúmulo de lipídios nos hepatócitos, complementado pelo “*second hit*” dado por citocinas e adipocinas extra-hepáticas, endotoxina bacteriana, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, e o estresse do retículo endoplasmático (RE) (34, 35).

## 2.1. Resposta positiva da fase-aguda

Em resposta inflamatória às infecções e lesões, o fígado estrategicamente prioriza a síntese e liberação sistêmica de proteínas denominadas coletivamente de proteínas de fase aguda (PFA), cujas concentrações plasmáticas aumentam (PFA positiva) ou diminuem (PFA negativa) durante a inflamação (36).

Na DGHNA, parte da resposta inflamatória subaguda é atribuída ao estresse do retículo endoplasmático (RE). O RE está envolvido na geração de espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente, estresse oxidativo. No hepatócito, o acúmulo de lipídios causa estresse no RE, e é acompanhado pelo acúmulo de proteínas desdobradas ou mal dobradas, amplamente mediado pela ativação do JNK, resultando em comprometimento da sinalização da insulina (17).

Adicionalmente, o estresse do RE está associado à ativação de múltiplas respostas de estresse e à ativação específica da CREBP, fator de transcrição específico para hepatócitos, com papel importante na resposta hepática de fase aguda, pela indução da transcrição dos genes do componente amilóide-P sérico e genes da proteína C-reativa, ambas, proteínas de fase aguda positiva (37).

Os níveis plasmáticos da PCR são muito baixos em condições fisiológicas, mas aumentam em até 100 vezes em resposta ao processo inflamatório. Devido à sua meia-vida relativamente curta, de 18 horas, a PCR representa marcador útil de inflamação aguda, mas é inespecífico (10). A PCR plasmática é produzida predominantemente por hepatócitos e está sob controle transcricional da IL-6 e outras citocinas pró-inflamatórias como a IL-1, assim como do cortisol (36). A PCR circulante está positivamente correlacionada com a esteatose hepática (38, 39). Além disso, as concentrações séricas de PCR são maiores em pacientes com EHNA em comparação aos com apenas esteatose hepática (11).

Aumento das concentrações séricas de PCR foi observado também em distúrbios relacionados à DGHNA, como obesidade, RI e SM (38, 40-42). Os níveis de PCR são maiores em indivíduos obesos que também são resistentes à insulina e diminuem com a perda de peso e com a melhora da sensibilidade à insulina (43, 44). Consequentemente, os níveis circulantes de PCR podem diminuir após a cirurgia bariátrica (45). De interesse, a PCR circulante provavelmente não é meramente um indicador de inflamação sistêmica, mas também está envolvida na patogênese da aterosclerose (10). Portanto, as concentrações circulantes de PCR estão correlacionadas com a resistência à insulina, e são consideradas como marcador de risco cardiovascular (46-48).

## **2.2. Resposta negativa da fase aguda**

Diferentemente das PFA positivas, as proteínas hepáticas de fase aguda negativas têm sua síntese diminuída durante doenças acompanhadas por processo inflamatório, bem como em situações de desnutrição crônica (49, 50). Representam as proteínas de fase aguda negativa, a albumina, proteína ligadora de retinol (RBP), globulina transportadora de cortisol, transferrina, e fetuina-A (12, 51). Em diferentes estudos, baixas concentrações séricas de albumina foram identificadas como fator

relacionado à EHNA e à fibrose hepática (52-54) e como preditor de mortalidade relacionada ao fígado (55, 56).

O comportamento da fetuina-A sérica é ambíguo, pois apesar de ser considerada PFA negativa, em crianças obesas diagnosticadas histologicamente com esteatose hepática as concentrações de fetuina-A correlacionaram-se positivamente com as concentrações séricas de PCR (57).

### 3. Fetuina-A

Fetuina-A é o antigo nome da proteína humana glicoproteína alpha 2- Heremans-Schmid (AHSG), glicoproteína multifuncional de 60 kDa, descrita como proteína de fase aguda negativa, portanto inversamente correlacionada com a concentração sérica de PCR (16, 58, 59).

A fetuina-A é predominantemente expressa no fígado e, em menor grau, na placenta e na língua (60). Como a expressão placentária é relevante apenas durante a gravidez e a língua não é órgão com atividade endócrina, o fígado é o responsável pela regulação dos níveis circulantes de fetuina-A. Em adultos, aproximadamente 95% da fetuina-A é secretada pelo fígado (58). Os valores de referência da fetuina-A sérica em indivíduos humanos saudáveis variam de 450 a 600 µg/mL. Os dados indicam que as concentrações de fetuina-A são independentes do gênero (61, 62).

A síntese de fetuina-A é regulada de forma divergente em resposta a lesão ou infecção, o que pode levar a uma classificação ambígua, como PFA negativa ou positiva (63). O reconhecimento de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) e de padrões moleculares associados aos danos (DAMPs) por TLRs em células imunes inatas leva à liberação de citocinas pró-inflamatórias precoces (TNF- $\alpha$ , IL-6, interferon-gama) (64), que reduzem a circulação de fetuina-A plasmática durante a fase inicial de endotoxemia ou sepse (resposta de fase aguda negativa) (65). Por outro lado, mediadores inflamatórios de ação tardia, por exemplo, *High-mobility group box 1 protein* (HMGB1), servem como regulador positivo para restaurar as concentrações de fetuina-A em estágio tardio dessas doenças (63). Visto que HMGB1 pode ser passivamente liberado de células lesadas (66), e funciona como mediador precoce de lesão traumática (67, 68), é plausível que HMGB1 contribua para a regulação positiva da expressão da fetuina-A durante a

lesão celular, sugerindo que a fetuina-A atue como uma PFA positiva em resposta a lesões (63).

### **3.1. Papel fisiopatológico da fetuina-A**

O papel exato da fetuina-A na patogênese do DM2, obesidade, DGHNA, dislipidemia, aterosclerose e nas DCV ainda é discutido (69). Curiosamente, enquanto altas concentrações de fetuina-A estão associadas à RI, SM e ao perfil lipídico aterogênico, baixas concentrações de fetuina-A estão relacionadas com calcificações vasculares e infecções (70).

#### **3.1.1. Fetuina-A: Resistência Insulínica, Esteatose Hepática e Inflamação**

Classicamente, a fetuina-A é inibidora do receptor de insulina tirosina quinase no fígado e no músculo esquelético (107-109) e, portanto, associado à resistência à insulina, comumente encontrada em doenças como obesidade, SM e DM2 (58, 61).

Além de associada à resistência à insulina, a fetuina-A também está associada ao acúmulo de gordura no fígado em humanos (71). A fetuina-A tem propriedades adipogênicas devido ao controle da diferenciação de adipócitos e, pela redução da expressão de adiponectina, adipocina sensibilizadora de insulina (72). A fetuina-A também serve como proteína adaptadora para ácidos graxos saturados, permitindo a ativação do TLR4 (73). No geral, a fetuina-A deteriora não apenas a captação de ácidos graxos livres, mas também o seu armazenamento, nos adipócitos (74-76). Adicionalmente, concentrações elevadas de AGLs contribuem para a maior expressão de fetuina-A por aumentarem a atividade do NF- $\kappa$ B (76). Dessa forma, a fetuina-A induz não só a RI, mas também a sinalização inflamatória com aumento da expressão de TNF- $\alpha$  e IL-6, que conseqüentemente pode levar ao desenvolvimento de DM2 e DCV (77). Sugere-se que a fetuina-A seja, portanto, elo na compreensão da inflamação induzida por lipídios(78).

Portanto, o acúmulo de gordura no fígado pode estar associado às concentrações mais elevadas de fetuina-A (62). Outros dados sugerem que alta concentração de glicose também aumenta a expressão de fetuina-A pela ativação da via de sinalização de quinases reguladas por sinal extracelular (ERK1/2) (79).

### 3.1.2. Fetuina-A: Síndrome Metabólica

A fetuina-A tem potencial diagnóstico como biomarcador para alterações hepáticas, doenças cardiovasculares e distúrbios associados à síndrome metabólica (69). A associação entre a concentração de fetuina-A e a SM foi demonstrada em estudos transversais (75, 80, 81). Entretanto, também em análises longitudinais a fetuina-A tem sido correlacionada aos vários componentes da SM, como pressão arterial, circunferência abdominal e glicemia alterados (74, 82, 83).

A hipótese de que a fetuina-A possa promover o fenótipo da SM em humanos é apoiada por vários argumentos. O primeiro é genético, e se trata da posição do gene da fetuina-A humana no cromossomo 3q27, mapeado como locus de característica quantitativa da SM (61, 83, 84). Como segundo argumento, a fetuina-A interfere na ação da insulina nos tecidos periféricos através da interação com o receptor de insulina, aumentando a resistência à insulina, que se acredita ser o mecanismo que leva ao fenótipo da SM (75). Em terceiro lugar, a fetuina-A induz a supressão da produção de adiponectina, que é a adipocina sensibilizadora de insulina, que representaria importante determinante da resistência insulínica, e das doenças cardiovasculares (85, 86). O último argumento é a atuação da fetuina-A em TLRs induzindo inflamação de baixo grau associada à SM e ao padrão lipídico aterogênico (80, 82).

### 3.1.3. Fetuina-A: Inibição da calcificação extra-esquelética

A fetuina-A participa também da regulação da osteogênese e mineralização. Acumula-se nos ossos e dentes como fração importante das proteínas ósseas não colágenas e regula a remodelação óssea e o metabolismo do cálcio (87). Acredita-se que a fetuina-A seja responsável por aproximadamente 50% da inibição da precipitação de cálcio e fósforo; mantendo o cálcio e o fósforo solubilizados no soro e evitando a sua deposição, como hidroxapatita, nas paredes dos vasos (85). A fetuina-A consiste em inibidor importante da precipitação e calcificação do sal de cálcio in vivo (16, 62).

### 3.1.4. Fetuina-A: Doenças Cardiovasculares

Estudos indicam estreita relação entre a fetuina-A e as DCV. Indivíduos com infarto do miocárdio prévio tiveram concentrações significativamente maiores de fetuina-A do que controles saudáveis (77). Segundo estudo de coorte, pacientes com altas concentrações de fetuina-A tiveram risco quatro vezes maior de infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral isquêmico, em comparação com indivíduos com níveis baixos de fetuina-A. Concentrações mais altas de fetuina-A foram mais fortemente associadas ao maior risco de DCV nas mulheres, do que nos homens (88).

No DM2, em geral, os níveis séricos de fetuina-A estão independentemente associados à presença e gravidade da doença arterial coronariana (89). Por outro lado, estudos em pacientes não diabéticos com estenose aórtica, mostraram correlação inversa entre a fetuina-A e a presença de estenose (85), assim como outros autores encontraram forte associação entre baixa concentração de fetuina-A e DCV em pessoas magras e sem resistência à insulina (avaliadas por HOMA-IR) (90). A maior concentração de fetuina-A encontrada em pacientes não diabéticos com doença arterial coronariana, foi associada à SM e ao perfil lipídico aterogênico (74, 91). Alguns autores apóiam a hipótese de que a concentração sérica elevada de fetuina-A está relacionada ao perfil lipídico aterogênico e pode contribuir, secundariamente, ao desenvolvimento de eventos cardiovasculares (62, 77, 92). Nesse sentido, sabe-se que a fetuina-A deteriora a absorção e armazenamento de ácidos graxos livres nos adipócitos (76) de forma a reduzir a expressão da adiponectina, adipocina ateroprotetora (14, 75, 88). Assim, a fetuina-A é considerada como determinante independente das concentrações de adiponectina, sendo fator importante na progressão da aterosclerose coronariana (77). Desta forma, a diminuição nas concentrações de adiponectina, observada em pacientes com doença arterial coronariana ou com alto risco de DCV, pode aumentar os níveis de ácidos graxos livres e levar ao agravamento da aterosclerose (86, 93).

No entanto, parece que a maior concentração de fetuina-A sérica promove o desenvolvimento de DCV apenas em pacientes com distúrbios metabólicos, nos quais a resistência à insulina seja mecanismo importante. Portanto, a fetuina-A desempenha papel importante na DCV via aterosclerose relacionada ao diabetes pela resistência à insulina e disfunção dos adipócitos (89). Outra provável conexão estaria no fato da concentração de fetuina-A estar inversamente correlacionada com a presença de placas ateroscleróticas calcificadas e, portanto,



com a gravidade da aterosclerose (62, 94). Sabe-se que a fetuina-A constitui importante inibidor da calcificação vascular. Baixas concentrações de fetuina-A sérica foram correlacionadas com a gravidade da calcificação arterial coronariana (95-97). Assim, menores concentrações de fetuina-A pioram a condição aterogênica (61, 72, 75).

Uma ligação direta entre inflamação e calcificação de vasos tem sido sugerida, implicando em associação bifásica da fetuina-A com a doença vascular, dependendo do estágio da aterosclerose. Sugere-se que nos estágios iniciais da doença arterial coronariana a fetuina-A exacerba a doença devido aos seus efeitos promotores da resistência à insulina e de dislipidemia. Em estágios tardios de doença arterial coronariana, altas concentrações de fetuina-A têm resultados preventivos, devido à capacidade da fetuina-A de prevenir a deposição de cálcio vascular (89). Essa hipótese foi apoiada por estudo com pessoas idosas, em que altas concentrações de fetuina-A sérica foram associadas à morte por DCV apenas em indivíduos com DM2, enquanto que a fetuina-A foi inversamente associada à morte por DCV em indivíduos sem diabetes (98). Conclui-se que, em pacientes não diabéticos, a fetuina-A desempenha papel potencialmente protetor contra doença arterial coronariana e eventos cardiovasculares agudos (estados inflamatórios), evitando a precipitação espontânea de minerais na vasculatura (69). Nesse caso, o papel principal da fetuina-A não seria na resistência insulínica e sim, como agente antiinflamatório e inibidor da calcificação ectópica (77, 89).

#### **4. Considerações finais**

Inúmeras evidências embasam o papel da obesidade na patogênese da DGHNA, bem como na sua progressão e risco cardiovascular, tendo como um dos mecanismos etiológicos o estado inflamatório. Maior compreensão dos processos patológicos e o uso de biomarcadores plasmáticos relacionados aos distúrbios metabólicos hepáticos são importantes para o melhor controle da doença e suas complicações. Estudos em humanos devem ser encorajados, principalmente, com monitoramento de proteínas de fase aguda, já que essas proteínas poderiam servir como marcadores importantes para a progressão da esteatose simples para estágios graves de complicações hepáticas. Neste sentido, a atuação da

glicoproteína hepática fetuina-A tem potencial como biomarcador para complicações hepáticas, SM e doenças cardiovasculares.

Associações de alta e baixa concentração de fetuina-A com doenças cardiovasculares e risco de mortalidade foram relatadas, mas devem ser levadas em consideração as diferenças nas populações analisadas, como: a presença de aterosclerose e calcificações vasculares, coexistência de DM2, e/ou SM, que são doenças que podem interferir na expressão e atuação da fetuina-A. Adicionalmente, não existem, em humanos, informações suficientes que permitam estabelecer a sequência causal dos eventos inflamatórios, demonstrando se a fetuina-A seria primária a esteatose hepática, e diretamente promotora das suas co-morbidades, ou se é consequência do acúmulo de gordura hepática e agravante das suas co-morbidades metabólicas. No entanto, sabe-se que no comprometimento da função hepática as concentrações plasmáticas de fetuina-A estão alteradas. Neste sentido, a fetuina-A pode ser considerada biomarcador da funcionalidade do fígado, particularmente responsiva às agressões resultando em inflamação.

Os fatores adversos que podem influenciar na expressão da fetuina-A são múltiplos e ainda são discutidos assim como o conjunto das suas ações. Como atuação principal da fetuina-A associada à DGHNA e co-morbidades (dislipidemia, síndrome metabólica e DM2), sugere-se a indução de RI pela inibição do receptor tirosina quinase, e, portanto, de forma indireta aumentaria o risco de DCV. Isso é evidente em pacientes coronariopatas com DM2. Porém, em indivíduos não diabéticos, a fetuina-A se apresenta como fator protetor para DCV, pelo seu efeito inibidor da calcificação vascular. Desta forma, atuações pró-inflamatória e anti-inflamatória foram atribuídas a fetuina-A, assim como associações de alta e baixa concentração de fetuina-A com doenças cardiovasculares e risco de mortalidade têm sido relatadas.

Até o presente momento os estudos mostraram que nos indivíduos que já possuem alguma doença metabólica como DM2, a fetuina-A em altas concentrações aumenta o risco de DCV, porém, em indivíduos que não apresentam nenhum distúrbio metabólico, a fetuina-A se apresenta como fator protetor para DCV.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Williams CD, Stengel J, Asike MI, Torres DM, Shaw J, Contreras M, et al. Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis Among a Largely Middle-Aged Population Utilizing Ultrasound and Liver Biopsy: A Prospective Study. *Gastroenterology*. 2011;140(1):124-31.
2. Rinella ME. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review. *Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. *JAMA*. 2015;313(22):2263-73.
3. Musso G, Gambino R, Cassader M, Pagano G. Meta-analysis: Natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. *2010*. 617-49 p.
4. Araújo AR, Rosso N, Bedogni G, Tiribelli C, Bellentani S. Global epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: What we need in the future. *Liver International*. 2018;38:47-51.
5. Alli V, Rogers AM. Gastric Bypass and Influence on Improvement of NAFLD. *Current Gastroenterology Reports*. 2017;19(6):25.
6. Jung U, Choi M-S. Obesity and Its Metabolic Complications: The Role of Adipokines and the Relationship between Obesity, Inflammation, Insulin Resistance, Dyslipidemia and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014;15(4):6184-223.
7. Fabbrini E, Magkos F, Mohammed BS, Pietka T, Abumrad NA, Patterson BW, et al. Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(36):15430-5.
8. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;41(6):1313-21.
9. Hashimoto E, Tanai M, Tokushige K. Characteristics and diagnosis of NAFLD/NASH. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2013;28:64-70.
10. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *Journal of Clinical Investigation*. 2003;111(12):1805-12.
11. Yoneda M, Mawatari H, Fujita K, Iida H, Yonemitsu K, Kato S, et al. High-sensitivity C-reactive protein is an independent clinical feature of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and also of the severity of fibrosis in NASH. *Journal of Gastroenterology*. 2007;42(7):573-82.
12. Lebreton JP, Joisel F, Raoult JP, Lannuzel B, Rogez JP, Humbert G. Serum concentration of human alpha 2 HS glycoprotein during the inflammatory process: evidence that alpha 2 HS glycoprotein is a negative acute-phase reactant. *1979*;64(4):1118-29.

13. Stefan N, Hennige AM, Staiger H, Machann J, Schick F, Krober SM, et al. 2-Heremans-Schmid Glycoprotein/ Fetuin-A Is Associated With Insulin Resistance and Fat Accumulation in the Liver in Humans. *Diabetes Care*. 2006;29(4):853-7.
14. Stefan N, Fritsche A, Weikert C, Boeing H, Joost H-G, Häring H-U, et al. Plasma fetuin-A levels and the risk of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2008;57(10):2762-7.
15. Schäfer C, Heiss A, Schwarz A, Westenfeld R, Ketteler M, Floege J, et al. The serum protein  $\alpha$ 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. 2003;112(3):357-66.
16. Ketteler M, Bongartz P, Westenfeld R, Wildberger JE, Mahnken AH, Böhm R, et al. Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study. *The Lancet*. 2003;361(9360):827-33.
17. Özcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee A-H, Iwakoshi NN, Özdelen E, et al. Endoplasmic Reticulum Stress Links Obesity, Insulin Action, and Type 2 Diabetes. *Science*. 2004;306(5695):457-61.
18. Rivera CA, Adegboyega P, van Rooijen N, Tagalicud A, Allman M, Wallace M. Toll-like receptor-4 signaling and Kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of hepatology*. 2007;47(4):571-9. Epub 06/08.
19. Maher JJ. DAMPs ramp up drug toxicity. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(2):246-9. Epub 01/26.
20. Rock KL, Latz E, Ontiveros F, Kono H. The sterile inflammatory response. *Annu Rev Immunol*. 2010;28:321-42.
21. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature Medicine*. 2002;8(11):1288-95.
22. Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H. Relationship between Adipocyte Size and Adipokine Expression and Secretion. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2007;92(3):1023-33.
23. Hotamisligil G, Shargill N, Spiegelman B. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993;259(5091):87-91.
24. Sartipy P, Loskutoff DJ. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(12):7265-70. Epub 05/19.
25. Rotter V, Nagaev I, Smith U. Interleukin-6 (IL-6) Induces Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes and Is, Like IL-8 and Tumor Necrosis Factor-, Overexpressed in Human Fat Cells from Insulin-resistant Subjects. 2003;278(46):45777-84.

26. Fabbrini E, Sullivan S, Klein S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: Biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology*. 2010;51(2):679-89.
27. Bradbury MW, Berk PD. Lipid metabolism in hepatic steatosis. *Clinics in Liver Disease*. 2004;8(3):639-71.
28. Moore JB. Non-alcoholic fatty liver disease: the hepatic consequence of obesity and the metabolic syndrome. 2010;69(02):211.
29. Kopydlowski KM, Salkowski CA, Cody MJ, van Rooijen N, Major J, Hamilton TA, et al. Regulation of Macrophage Chemokine Expression by Lipopolysaccharide In Vitro and In Vivo. *The Journal of Immunology*. 1999;163(3):1537-44.
30. Kagan JC, Medzhitov R. Phosphoinositide-Mediated Adaptor Recruitment Controls Toll-like Receptor Signaling. *Cell*. 2006;125(5):943-55.
31. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*. 2006;124(4):783-801.
32. Zhan Y-T, An W. Roles of liver innate immune cells in nonalcoholic fatty liver disease. *World journal of gastroenterology*. 2010;16(37):4652-60. Epub 10/07.
33. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- $\beta$  and NF- $\kappa$ B. *Nature Medicine*. 2005;11(2):183-90.
34. Day CP, James OFW. Steatohepatitis. *Gastroenterology*. 1998;114(4):842-5.
35. Peverill W, Powell L, Skoien R. Evolving Concepts in the Pathogenesis of NASH: Beyond Steatosis and Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014;15(5):8591-638.
36. Côrrea CR & Burini RC. Proteínas plasmáticas reativas positivas à fase aguda *Jornal Brasileiro de Reumatologia*. 2000;36:26-34.
37. Zhang K, Shen X, Wu J, Sakaki K, Saunders T, Rutkowski DT, et al. Endoplasmic Reticulum Stress Activates Cleavage of CREBH to Induce a Systemic Inflammatory Response. *Cell*. 2006;124(3):587-99.
38. PARK SH, KIM BI, YUN JW, KIM JW, PARK DI, CHO YK, et al. Insulin resistance and C-reactive protein as independent risk factors for non-alcoholic fatty liver disease in non-obese Asian men. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2004;19(6):694-8.
39. Iwasaki T, Nakajima A, Yoneda M, Terauchi Y. Relationship between the Serum Concentrations of C-reactive Protein and Parameters of Adiposity and Insulin Resistance in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Endocrine Journal*. 2006;53(3):345-56.

40. Zimmermann E, Anty R, Tordjman J, Verrijken A, Gual P, Tran A, et al. C-reactive protein levels in relation to various features of non-alcoholic fatty liver disease among obese patients. 2011;55(3):660-5.
41. Anty R, Bekri S, Luciani N, Saint-Paul MC, Dahman M, Iannelli A, et al. The inflammatory C-reactive protein is increased in both liver and adipose tissue in severely obese patients independently from metabolic syndrome, Type 2 diabetes, and NASH. The American journal of gastroenterology. 2006;101(8):1824-33. Epub 2006/06/23.
42. Chaves GV, Souza DSd, Pereira SE, Saboya CJ, Peres WAF. Associação entre doença hepática gordurosa não alcoólica e marcadores de lesão/função hepática com componentes da síndrome metabólica em indivíduos obesos classe III. Revista da Associação Médica Brasileira. 2012;58:288-93.
43. Kopp HP, Kopp CW, Festa A, Krzyzanowska K, Kriwanek S, Minar E, et al. Impact of Weight Loss on Inflammatory Proteins and Their Association With the Insulin Resistance Syndrome in Morbidly Obese Patients. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2003;23(6):1042-7.
44. McLaughlin T, Abbasi F, Lamendola C, Liang L, Reaven G, Schaaf P, et al. Differentiation Between Obesity and Insulin Resistance in the Association With C-Reactive Protein. Circulation. 2002;106(23):2908-12.
45. Vázquez LA, Pazos F, Berrazueta JRn, Fernández-Escalante C, García-Unzueta MaT, Freijanes J, et al. Effects of Changes in Body Weight and Insulin Resistance on Inflammation and Endothelial Function in Morbid Obesity after Bariatric Surgery. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2005;90(1):316-22.
46. Müller S, Martin S, Koenig W, Hanifi-Moghaddam P, Rathmann W, Haastert B, et al. Impaired glucose tolerance is associated with increased serum concentrations of interleukin 6 and co-regulated acute-phase proteins but not TNF- $\alpha$  or its receptors. Diabetologia. 2002;45(6):805-12.
47. Pannacciulli N, Cantatore F, Minenna A, Bellacicco M, Giorgino R, De Pergola G. C-reactive protein is independently associated with total body fat, central fat, and insulin resistance in adult women. International Journal of Obesity. 2001;25(10):1416-20.
48. Leinonen E, Hurt-Camejo E, Wiklund O, Hultén LM, Hiukka A, Taskinen M-R. Insulin resistance and adiposity correlate with acute-phase reaction and soluble cell adhesion molecules in type 2 diabetes. Atherosclerosis. 2003;166(2):387-94.
49. D. Jr. Blackburn W. Validity of acute phase proteins as markers of disease activity 1994. 9-13 p.
50. Gruys E, Toussaint MJM, Niewold TA, Koopmans SJ. Acute phase reaction and acute phase proteins. J Zhejiang Univ Sci B. 2005;6(11):1045-56. Epub 10/28.

51. Gabay C, Kushner I. Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. *New England Journal of Medicine*. 1999;340(6):448-54.
52. Kaneda H, Hashimoto E, Yatsuji S, Tokushige K, Shiratori K. Hyaluronic acid levels can predict severe fibrosis and platelet counts can predict cirrhosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2006;21(9):1459-65.
53. Fierbinteanu Braticevici C, Baicus C, Tribus L, Papacocea R. Predictive Factors for Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) 2011. 153-9 p.
54. Ratziu V GP, Charlotte F, Bruckert E, Thibault V, Theodorou I, Khalil L, Turpin G, Opolon P, Poynard T. Liver fibrosis in overweight patients. *Gastroenterology*. 2000;118:1117-23.
55. Rafiq N, Bai C, Fang Y, Srishord M, McCullough A, Gramlich T, et al. Long-Term Follow-Up of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2009;7(2):234-8.
56. Younossi ZM, Gramlich T, Matteoni CA, Boparai N, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2004;2(3):262-5.
57. Pampanini V, Inzaghi E, Germani D, Alterio A, Puglianiello A, Alisi A, et al. Serum Fetuin-A levels in obese children with biopsy proven nonalcoholic fatty liver disease. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2018;28(1):71-6.
58. Wojtysiak-Duma B, Malecha-Jędraszek A, Burska A, Duma D, Donica H. Serum fetuin-A levels in patients with type 2 diabetes mellitus 2010. 93-9 p.
59. Chen H-Y, Chiu Y-L, Hsu S-P, Pai M-F, Lai C-F, Peng Y-S, et al. Association of serum fetuin A with truncal obesity and dyslipidemia in non-diabetic hemodialysis patients. 2009;160(5):777.
60. DENECKE B, GRÄBER S, SCHÄFER C, HEISS A, WÖLTJE M, JAHNEN-DECHENT W. Tissue distribution and activity testing suggest a similar but not identical function of fetuin-B and fetuin-A. *Biochemical Journal*. 2003;376(1):135-45.
61. Kaushik SV, Plaisance EP, Kim T, Huang EY, Mahurin AJ, Grandjean PW, et al. Extended-release niacin decreases serum fetuin-A concentrations in individuals with metabolic syndrome. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 2009;25(5):427-34.
62. Singh M, Sharma PK, Garg VK, Mondal SC, Singh AK, Kumar N. Role of fetuin-A in atherosclerosis associated with diabetic patients. 2012;64(12):1703-8.
63. Wang H, Sama AE. Anti-inflammatory role of fetuin-A in injury and infection. *Current molecular medicine*. 2012;12(5):625-33.

64. Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang R-B, Belisle JT, Bleharski JR, et al. Host Defense Mechanisms Triggered by Microbial Lipoproteins Through Toll-Like Receptors. *Science*. 1999;285(5428):732-6.
65. Li W, Zhu S, Li J, Huang Y, Rongrong Z, Fan X, et al. A Hepatic Protein, Fetuin-A, Occupies a Protective Role in Lethal Systemic Inflammation. *PLoS ONE*. 2011;6(2):e16945.
66. Peltz ED, Moore EE, Eckels PC, Damle SS, Tsuruta Y, Johnson JL, et al. HMGB1 is markedly elevated within 6 hours of mechanical trauma in humans. *Shock*. 2009;32(1):17-22.
67. Zhu S LW, Ward MF, Sama AE, Wang H. High mobility group box 1 protein as a potential drug target for infection- and injury-elicited inflammation. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2010;9(1):60-72.
68. Tsung A KJ, Zhang X, Jeyabalan G, Cao Z, Peng X, Stolz DB, Geller DA, Rosengart MR, Billiar TR. HMGB1 release induced by liver ischemia involves Toll-like receptor 4 dependent reactive oxygen species production and calcium-mediated signaling. *J Exp Med* 2007;204(12):2913–23.
69. Dabrowska AM, Tarach JS, Wojtysiak-Duma B, Duma D. Fetuin-A (AHSG) and its usefulness in clinical practice. Review of the literature. *Biomedical papers*. 2015;159(3):352-9.
70. Ix JH, Shlipak MG, Brandenburg VM, Ali S, Ketteler M, Whooley MA. Association Between Human Fetuin-A and the Metabolic Syndrome. *Circulation*. 2006;113(14):1760-7.
71. Stefan N, Hennige AM, Staiger H, Machann J, Schick F, Kröber SM, et al.  $\alpha_2$ -Heremans-Schmid Glycoprotein/ Fetuin-A Is Associated With Insulin Resistance and Fat Accumulation in the Liver in Humans. *Diabetes Care*. 2006;29(4):853-7.
72. Lavebratt C, Wahlqvist S, Nordfors L, Hoffstedt J, Arner P. AHSG gene variant is associated with leanness among Swedish men 2005. 54-60 p.
73. Pal D, Dasgupta S, Kundu R, Maitra S, Das G, Mukhopadhyay S, et al. Fetuin—A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance 2012.
74. Xu Y, Xu M, Bi Y, Song A, Huang Y, Liu Y, et al. Serum fetuin-A is correlated with metabolic syndrome in middle-aged and elderly Chinese. *Atherosclerosis*. 2011;216(1):180-6.
75. Ix JH, Shlipak MG, Brandenburg VM, Ali S, Ketteler M, Whooley MA. Association between human fetuin-A and the metabolic syndrome: data from the Heart and Soul Study. *Circulation*. 2006;113(14):1760-7. Epub 2006/03/27.
76. Dasgupta S, Bhattacharya S, Biswas A, Majumdar Subeer S, Mukhopadhyay S, Ray S, et al. NF- $\kappa$ B mediates lipid-induced fetuin-A expression in



hepatocytes that impairs adipocyte function effecting insulin resistance. *Biochemical Journal*. 2010;429(3):451-62.

77. Vörös K, Gráf L, Prohászka Z, Szenthe P, Kaszás E, Böröcz Z, et al. Serum fetuin-A in metabolic and inflammatory pathways in patients with myocardial infarction 2011. 703-9 p.

78. Heinrichsdorff J, Olefsky JM. Fetuin-A: the missing link in lipid-induced inflammation. *Nature Medicine*. 2012;18:1182.

79. Takata H, Ikeda Y, Suehiro T, Ishibashi A, Inoue M, Kumon Y, et al. High Glucose Induces Transactivation of the  $\alpha$ 2-HS Glycoprotein Gene Through the ERK1/2 Signaling Pathway. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. 2009;16(4):448-56.

80. Reinehr T, Roth CL. Fetuin-A and Its Relation to Metabolic Syndrome and Fatty Liver Disease in Obese Children Before and After Weight Loss. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2008;93(11):4479-85.

81. Erdmann J, Salmhofer H, Knauß A, Mayr M, Wagenpfeil S, Sypchenko O, et al. Relationship of fetuin-A levels to weight-dependent insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Regulatory Peptides*. 2012;178(1):6-10.

82. Ismail NA, Ragab S, Dayem SMAE, Elbaky AA, Salah N, Hamed M, et al. Fetuin-A levels in obesity: differences in relation to metabolic syndrome and correlation with clinical and laboratory variables. *Archives of Medical Science*. 2012;5:826-33.

83. Reinehr T, Roth CL. Fetuin-A and Its Relation to Metabolic Syndrome and Fatty Liver Disease in Obese Children Before and After Weight Loss. 2008;93(11):4479-85.

84. Lavebratt C. Polymorphism of the AHSG gene is associated with increased adipocyte  $\alpha$ 2-adrenoceptor function. 2005;46(10):2278-81.

85. Ix JH, Chertow GM, Shlipak MG, Brandenburg VM, Ketteler M, Whooley MA. Fetuin-A and kidney function in persons with coronary artery disease—data from the heart and soul study. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2006;21(8):2144-51.

86. Hennige AM, Staiger H, Wicke C, Machicao F, Fritsche A, Häring H-U, et al. Fetuin-A Induces Cytokine Expression and Suppresses Adiponectin Production. *PLoS ONE*. 2008;3(3):e1765.

87. Denecke B, Gräber S, Schäfer C, Heiss A, Wöltje M, Jahnke-Dechent W. Tissue distribution and activity testing suggest a similar but not identical function of fetuin-B and fetuin-A. 2003;376(1):135-45.

88. Weikert C, Stefan N, Schulze MB, Pischon T, Berger K, Joost HG, et al. Plasma Fetuin-A Levels and the Risk of Myocardial Infarction and Ischemic Stroke. 2008;118(24):2555-62.

89. Zhao Z-W, Lin C-G, Wu L-Z, Luo Y-K, Fan L, Dong X-f, et al. Serum fetuin-A levels are associated with the presence and severity of coronary artery disease in patients with type 2 diabetes. *Biomarkers*. 2013;18(2):160-4.
90. Jensen MK, Bartz TM, Mukamal KJ, Djousse L, Kizer JR, Tracy RP, et al. Fetuin-A, Type 2 Diabetes, and Risk of Cardiovascular Disease in Older Adults: The Cardiovascular Health Study. *Diabetes Care*. 2013;36(5):1222-8.
91. Mathews ST, Rakhade S, Zhou X, Parker GC, Coscina DV, Grunberger G. Fetuin-null mice are protected against obesity and insulin resistance associated with aging. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006;350(2):437-43.
92. Obuchi A, Adachi H, Enomoto M, Fukami A, Kumagai E, Nakamura S, et al. High plasma fetuin-A levels are associated with metabolic syndrome among males but not females in a Japanese general population. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2014;106(1):128-35.
93. Ix JH, Sharma K. Mechanisms Linking Obesity, Chronic Kidney Disease, and Fatty Liver Disease: The Roles of Fetuin-A, Adiponectin, and AMPK. *Diabetes Care*. 2010;21(3):406-12.
94. Emoto M, Mori K, Lee E, Kawano N, Yamazaki Y, Tsuchikura S, et al. Fetuin-A and atherosclerotic calcified plaque in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism - Clinical and Experimental*. 2010;59(6):873-8.
95. Lim P, Collet JP, Moutereau S, Guigui N, Mitchell-Heggs L, Loric S, et al. Fetuin-A Is an Independent Predictor of Death after ST-Elevation Myocardial Infarction. *Clinical Chemistry*. 2007;53(10):1835-40.
96. Bilgir O, Kebapcilar L, Bilgir F, Bozkaya G, Yildiz Y, Pinar P, et al. Decreased Serum Fetuin-A Levels are Associated with Coronary Artery Diseases. *Journal of Inflammation*. 2010;49(13):1281-5.
97. Ix JH, Katz R, De Boer IH, Kestenbaum BR, Peralta CA, Jenny NS, et al. Fetuin-A Is Inversely Associated with Coronary Artery Calcification in Community-Living Persons: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Diabetes Care*. 2012;58(5):887-95.
98. Laughlin GA, Cummins KM, Wassel CL, Daniels LB, Ix JH. The Association of Fetuin-A With Cardiovascular Disease Mortality in Older Community-Dwelling Adults. *Diabetes Care*. 2012;59(19):1688-96.

*Capítulo II*  
*Artículo Científico*

## RESUMO

BARROS, LP; BURINI, RC. **O potencial diagnóstico da fetuina-A sérica como biomarcador para distúrbios metabólicos associados à esteatose hepática não-alcoólica.** Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2019.

Fetuina-A é uma glicoproteína multifuncional, sintetizada pelo fígado como proteína de fase aguda. Atua na inibição da cascata da insulina, e estimula a síntese de citocinas pró-inflamatórias. Assim, sugere-se que a fetuina-A esteja envolvida na patogênese da doença gordurosa hepática não-alcoólica (DGHNA), constituindo-se em um dos seus indicadores. O presente estudo tem como objetivo investigar as concentrações de fetuina-A na DGHNA e sua associação com distúrbios metabólicos, bem como, com o risco de fibrose hepática, e doença cardiovascular (DCV), mediante marcadores bioquímicos. Para tanto, foi realizado estudo transversal com mulheres ingressantes em programa para mudança do estilo de vida. Foram avaliadas 148 mulheres com idade entre 35 a 78 anos, as quais foram submetidas às avaliações clínicas, sócio-demográfica, antropométrica, de consumo alimentar e análises bioquímicas. O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ . Verificou-se DGHNA, pelo Índice de Gordura Hepática ( $IGH \geq 60$ ), em 55,4% das mulheres. Fetuina-A sérica correlacionou-se positivamente com Índice de Massa Corporal, circunferência abdominal, IGH e proteína C-reativa ultra-sensível (PCR-us). A proporção de mulheres com resistência insulínica (RI) pelo modelo homeostático de resistência à insulina (HOMA-IR) foi maior dentre os valores maiores (Tercil 3) de fetuina-A, comparativamente, aos menores valores (Tercil 1). Resultado análogo foi encontrado para a PCR-us, mas não para proteína ligadora de lipopolissacarídeo (LBP), albuminemia e fibrose hepática. Após ajustes, HOMA-IR e PCR-us elevados, constituíram fatores de risco independentes para as maiores concentrações de fetuina-A. Conclui-se, que a fetuina-A sérica pode ser considerada biomarcador para RI e processo inflamatório sistêmico associado à DGHNA, mas não a sua gravidade ou as DCVs.

**Palavras-chave:** Doença Gordurosa Hepática Não-Alcoólica; Fetuina-A; Inflamação; Fibrose Hepática; Doenças Cardiovasculares.

## ABSTRACT

BARROS, LP; BURINI, RC. **The diagnostic potential of serum fetuin-A as biomarker to metabolic disorders related to non-alcoholic hepatic steatosis.**

Thesis (Master) – Botucatu Medical School, State University of São Paulo, Botucatu, 2019.

Fetuin-A is a multifunctional glycoprotein, synthesized by the liver as a acute phase protein. It acts in insulin cascade inhibition, and stimulates pro-inflammatory cytokines. It is postulated that fetuin-A is involved in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) pathogenesis, as one of its indicators. The present study aims to investigate fetuin-A concentration in NAFLD and its association with metabolic disturbers, as well as with hepatic fibrosis risk, and cardiovascular disease (CVD), through biochemical markers. For that, a cross-sectional study was carried out with women entering a lifestyle modification program. We evaluate 148 women, with age that range from 35 to 78 years old that were submitted to clinical, sociodemographic, anthropometric, food consumption and biochemical evaluation. The statistical significance considered was  $p < 0,05$ . We verified that NAFLD, measured by Fatty Liver Index (FLI  $\geq 60$ ), was found in 55.4% of women. Serum fetuin-A was positively correlated with Body Mass Index, waist circumference, FLI and high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP). The proportion of women with insulin resistance (IR) by insulin resistance homeostatic model assessment (HOMA-IR), was higher among the higher values (Tercil 3) of fetuin-A, compared to the lowest values (Tercil 1). Analog results were found to hs-CRP, but not to lipopolysaccharide-binding protein (LBP), albuminemia and hepatic fibrosis. After adjustments, HOMA-IR and hs-CRP altered, constitute independent risk factor to higher concentrations of fetuin-A. So we conclude that serum fetuin-A is a biomarker to IR and systemic inflammatory process related to NAFLD, but not its severity or CVDs.

**Key-words:** Non-Alcoholic Fatty Liver Disease; Fetuin-A; Inflammation; Hepatic Fibrosis; Cardiovascular Diseases.

## 1. INTRODUÇÃO

Os avanços tecnológicos permitiram aumento médio de 30 anos na expectativa de vida (1). Porém, crescem as taxas de mortalidade nos últimos 50 anos por doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), principalmente as doenças cardiovasculares (DCV) que representam 44% de todas as mortes por DCNT e 31% de todas as mortes (2).

A obesidade, principalmente a obesidade abdominal, pode dobrar ou triplicar o risco de DCV (3). O indivíduo obeso apresenta hipertrofia dos adipócitos, os quais podem liberar ácidos graxos livres (AGL), com isso aumenta a quantidade de macrófagos no local, principalmente macrófagos M1, que liberam citocinas pró-inflamatórias. Além disso, o tecido adiposo é considerado órgão endócrino, que secreta adipocinas com ação inflamatória local e,conseqüentemente, ação sistêmica (4, 5).

O processo inflamatório associado à obesidade leva a resistência à insulina (RI), adicionalmente, ocorre aumento da lipólise subcutânea, que libera mais AGL na circulação sanguínea e, o desequilíbrio entre a captação de AGL, sua oxidação e exportação por lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) resulta em esteatose hepática não-alcoólica (6, 7). Esse acúmulo crônico de gordura no fígado, na ausência de consumo excessivo de álcool, drogas ou outras causas secundárias, caracteriza a Doença Gordurosa Hepática Não–Alcoólica (DGHNA) (8).

A DGHNA, também é conhecida por ser manifestação hepática da síndrome metabólica (SM) (9), que pode ser definida como conjunto de fatores de risco inter-relacionados, incluindo a dislipidemia aterogênica, a hipertensão arterial e a glicemia elevada, os quais predispõem ao diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) e DCV (10).

A DGHNA é considerada, atualmente a doença hepática mais frequente no ocidente, acomete aproximadamente 30% da população adulta (11). Cerca de 90% dos pacientes com DGHNA apresentam apenas esteatose simples e têm prognóstico relativamente benigno. Entretanto, 10% a 30% evoluem para esteatohepatite não-alcoólica (EHNA) que está associada com inflamação e lesão hepatocelular (12).

Constituem agressores inflamatórios hepáticos, além dos AGL, as toxinas bacterianas translocadas a partir da desbiose intestinal, como o lipopolissacarídeo (LPS) que pode ser detectado na circulação ligado à proteína ligadora de lipopolissacarídeo (LBP), de origem hepática (13). A LBP se liga ao LPS e melhora a

sensibilidade dos seus aceptores nas células imune, com ativação de *toll like receptors* (TLR), que induz inflamação sistêmica, por isso é considerada marcador de endotoxemia metabólica subclínica (14).

Aproximadamente 25% a 40% dos pacientes com EHNA evoluem para fibrose hepática, com péssimo prognóstico e mortalidade de 20% em 10 anos naqueles com cirrose hepática leve (15). Sendo a mortalidade cardiovascular a principal causa-*mortis* da DGHNA (12). Assim, há necessidade de método não invasivo que possa avaliar alterações metabólicas do fígado e a progressão da esteatose hepática em pacientes com DGHNA.

Estudos recentes demonstraram que proteínas de fase aguda (PFA) secretadas pelo fígado na circulação, como a PCR-us e a fetuina-A se correlacionam com a progressão da DGHNA (16-19). A proteína C-reativa ultra-sensível (PCR-us) é proteína de origem hepática de fase aguda positiva, suas concentrações aumentam em resposta a processos inflamatórios, sendo a PCR considerada o principal marcador plasmático de inflamação sistêmica (20).

A fetuina-A (*Alfa 2-Heremans Schmid Glycoprotein*) é glicoproteína multifuncional. Uma das suas funções é atuar como inibidor endógeno da tirosina quinase do receptor de insulina, podendo levar a RI. Fetuina-A foi descrita como PFA negativa, com concentração sérica inversamente correlacionada com a PCR-us (21, 22). Por outro lado, nenhuma associação foi encontrada entre os níveis de fetuina-A e PCR-us em estudo com indivíduos adultos com DGHNA (23).

Os estudos são contraditórios sobre o comportamento da fetuina-A na DGHNA (22, 24). Além de levar a RI, foi demonstrado que a fetuina-A serve como proteína adaptadora dos AGL na ativação do *toll like receptor 4* (TLR4) em macrófagos e adipócitos, aumentando a produção de citocinas pró-inflamatórias (25-27). Estes achados sugerem que alta concentração de fetuina-A pode levar a progressão da DGHNA e aumentar o risco de eventos cardiovasculares (28).

No entanto, baixas concentrações séricas de fetuina-A foram sugestivas de progressão da DGHNA para fibrose hepática, devido a ação da fetuina-A em bloquear a sinalização fibrogênica induzida por fator de crescimento transformador-beta 1 (TGF- $\beta$ 1) (29).

Assim, sabe-se que a obesidade, inflamação sistêmica e RI, podem tanto provocar a DGHNA como estarem presentes no agravamento da doença, mas ainda

é incerto se as concentrações de fetuina-A estão associadas a esses distúrbios metabólicos e com a progressão da DGHNA.

## **2. OBJETIVO**

Investigar as concentrações de fetuina-A na esteatose hepática não-alcoólica e sua associação com distúrbios metabólicos como obesidade, inflamação sistêmica e resistência insulínica, mediante marcadores bioquímicos.

### **2.1 Objetivos específicos**

Avaliar a relação entre a fetuina-A sérica e a progressão da DGHNA, por indicadores de fibrose hepática e de risco de eventos cardiovasculares.

## **3. METODOLOGIA**

### **3.1. Delineamento do Estudo**

Foi realizado estudo transversal de caráter descritivo com indivíduos participantes do programa para mudança do estilo de vida “Mexa-se Pró-Saúde”, conduzido em Botucatu-SP, desde 1991, por profissionais do Centro de Metabolismo em Exercício e Nutrição (CeMENutri), vinculado ao Departamento de Saúde Pública da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP). Os participantes procuram o programa em demanda espontânea ou por recomendação médica, com intuito de mudança do estilo de vida por meio da prática regular de exercícios físicos e de aconselhamento nutricional.

### **3.2. População do Estudo**

O período de seleção da amostra foi entre março de 2016 a novembro de 2017, todos os ingressantes no “Mexa-se Pró-Saúde” foram submetidos às avaliações iniciais para obtenção de dados demográficos, clínicos, antropométricos, padrão alimentar e bioquímicos. Participaram do estudo os indivíduos que atenderam aos critérios de inclusão, que foram: apenas mulheres, com idade a partir



de 35 anos, com todas as avaliações iniciais e coletas sanguíneas realizadas. A seleção amostral também levou em consideração os critérios de exclusão, como presença de distúrbios cardiorrespiratórios, doenças cardiovasculares prévias, doença articular, doença renal, processo infeccioso, além de causas secundárias de acúmulo de gordura hepática e etiologias coexistentes para doença hepática crônica, como as citadas na **Tabela 1**.

Todas as participantes foram informadas sobre os procedimentos a serem realizados e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido conforme a Resolução 466 de 12 de outubro de 2012 do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de Botucatu. O presente estudo foi aprovado por esse CEP em 20 de março de 2018, sob nº 2.588.670 (**Anexo 1**).

**Tabela 1.** Causas secundárias de Doença Hepática, segundo a *Practice Guidance From the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD)* (30).

---

**Causas Secundárias de Doença Hepática**

---

Consumo de álcool >14 bebidas padrão por semana (196 g/sem ou 28g/d)

Hepatite viral crônica

Doença de Wilson

Lipodistrofia

Medicamentos

(lomitapide, amiodarona, metotrexato, tamoxifeno, corticosteróides, estatina)

Nutrição parenteral

Hemocromatose

Doença Hepática auto-imune

Deficiência de alfa-1 antitripsina

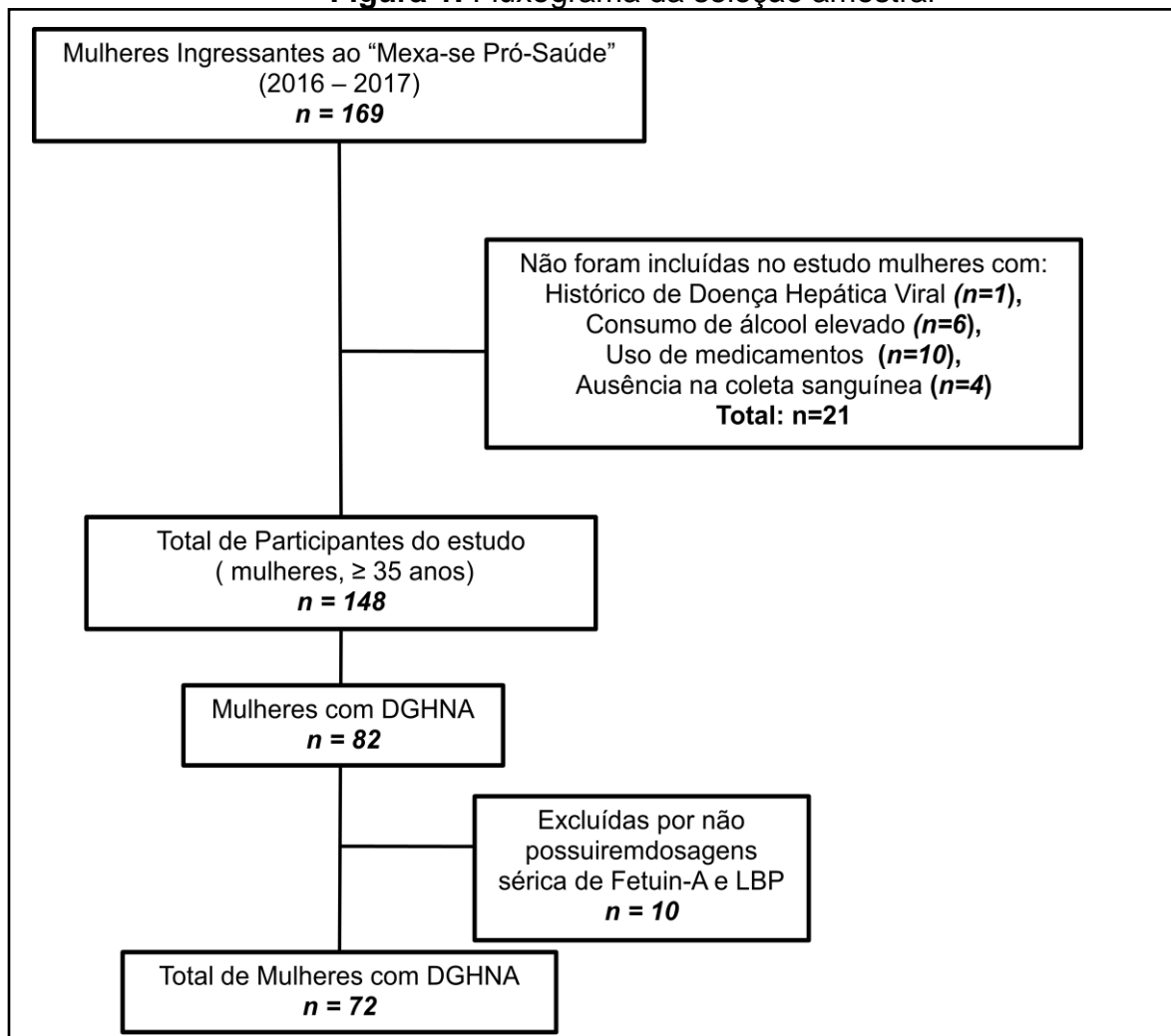
---

g/sem: gramas por semana; g/d: gramas por dia.

Dentre as mulheres que completaram as avaliações iniciais, 148 preencheram os critérios de inclusão do estudo. Para diagnosticar as mulheres com DGHNA foi aplicado o Índice de Gordura Hepática (IGH), calculado e classificado de acordo com Bedogni *et al.* (2006) (31).

Totalizaram no estudo 82 mulheres com DGHNA, desse grupo foram excluídas 10 participantes que não possuíam avaliações laboratoriais específicas de dosagens séricas de fetuina-A e LBP. Como ilustrado no fluxograma representado na **Figura 1**.

Figura 1. Fluxograma da seleção amostral



### 3.3. Avaliação Clínica

As participantes foram submetidas à avaliação médica, na qual foi avaliado o histórico pessoal e familiar para doenças crônicas (obesidade, diabetes, hipertensão, neoplasias, e afecções cardíacas) e etiologias secundárias de esteatose hepática por meio de anamnese clínica, com intuito de identificar possíveis condições patológicas. Também foram questionadas em relação ao uso de medicações e hábito de tabagismo.

A aferição da pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) foi por método auscultatório. Foram realizadas três medidas com intervalo de um minuto entre elas, descartou-se a primeira medida e foi considerado o valor médio das duas últimas aferições, como recomendado pela VII Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial (32).

### 3.4. Caracterização Demográfica, Socioeconômica e Nível de Atividade Física

As características demográficas e socioeconômicas (idade, sexo, estado civil, renda familiar e escolaridade), bem como o autorrelato do estado de saúde e o nível de atividade física (NAF) foram obtidos por meio do Questionário Internacional de Atividade Física versão 8-forma longa (IPAQ) (33). O questionário é utilizado para identificação dos diferentes domínios de atividade física, os quais permitem estimar o tempo gasto em caminhadas e atividades físicas de intensidade moderada a vigorosa, realizadas no trabalho, transporte, tarefas domésticas e de lazer em uma semana usual ou nos últimos sete dias. A quantidade de atividade física por domínio e total (minutos por semana) foi calculada multiplicando a frequência semanal pela duração de cada uma das atividades realizadas (31). O NAF recomendado para adultos, de acordo com a Organização Mundial da Saúde, é de pelo menos 150 minutos por semana de atividade física aeróbia moderada, ou 75 minutos de atividade física aeróbia vigorosa semanalmente (34).

### 3.5. Avaliação Antropométrica

O peso corporal foi mensurado em balança digital tipo plataforma (Filizola®, Brasil), graduada a cada 100 gramas, capacidade de 150 kg e precisão de 0,1kg. A estatura foi determinada em estadiômetro (SECA®) com precisão de 0,1cm. Posteriormente, foi calculado o Índice de Massa Corporal (IMC) por meio do quociente  $\text{peso(kg)}/\text{estatura}^2(\text{m}^2)$ . O IMC foi classificado em baixo peso,  $\text{IMC} < 18,5 \text{kg/m}^2$ ; eutrofia,  $\text{IMC}$  entre  $18,5 \text{kg/m}^2$  e  $24,5 \text{kg/m}^2$ ; sobrepeso,  $\text{IMC}$  entre  $25 \text{kg/m}^2$  e  $29,9 \text{kg/m}^2$  e obesidade,  $\text{IMC} \geq 30 \text{kg/m}^2$ , conforme a *World Health Organization* (2002) (35).

A circunferência abdominal (CA) foi mensurada com auxílio de fita milimétrica inextensível e inelástica de dois metros de extensão e precisão de 0,1cm, determinada no ponto médio entre o último arco costal e a crista ilíaca (36), possibilitando a estimativa da adiposidade abdominal. Para classificação da CA alterada quanto à síndrome metabólica e à obesidade abdominal foi considerado valor de CA maior ou igual que 88 cm (37).

### 3.6. Avaliação da Ingestão Alimentar

A avaliação do padrão alimentar foi realizada por registro alimentar pelas participantes, as quais foram devidamente instruídas a documentarem os alimentos e bebidas ingeridos ao longo de dois dias de semana não consecutivos e um dia de final de semana (38). Os registros foram analisados e documentados por profissionais capacitados e a quantidade de alimentos foi convertida em gramas e mililitros com o auxílio da tabela para avaliação do consumo alimentar em medidas caseiras (39). Os registros foram analisados e calculados pelo programa de análise nutricional *Nutwin* (*Nutwin®*, *Support Program for Nutrition*, ver 1.5, UNIFESP, 2002).

A qualidade da dieta foi avaliada pelo Índice de Alimentação Saudável adaptado (IAS-ad) com base na Pirâmide Alimentar Brasileira (40). O IAS-ad foi modificado pela equipe de nutricionistas do CeMENutri, a partir do Índice de Alimentação Saudável americano, utilizando as porções de acordo com o conteúdo energético e grupo alimentar estabelecidos pela pirâmide alimentar brasileira. O IAS-ad foi considerado como inadequado quando abaixo de 100 pontos (41).

### 3.7. Avaliação Bioquímica

Foram coletadas amostras sanguíneas por meio de punção venosa padrão a vácuo. As participantes foram orientadas a comparecerem no dia da coleta em jejum de 8 horas, a não realizarem exercícios físicos vigorosos 24 horas e não ingerir álcool 72 horas antes da coleta (42). As coletas sanguíneas foram realizadas em sala de coleta do Centro de Metabolismo em Exercício e Nutrição (CeMENutri) por profissional capacitado. Foram utilizados tubos secos (VACUETTE®) (sem anticoagulante) para obtenção de soro e tubos contendo etileno diamino tetra acetato de potássio (K<sub>3</sub>EDTA) como anticoagulante, para obtenção do plasma e sangue total. Após centrifugação de 10 minutos a 4000 rpm, as amostras de soro e plasma foram separadas. Em seguida (2 a 4 horas após), as amostras de soro foram utilizadas para as dosagens de albumina, gama-glutamiltanspeptidase ( $\gamma$ -GT), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), glicose, colesterol total (CT), lipoproteína de alta densidade-colesterol (HDL-colesterol) e

triacilglicerol (TG), segundo método de química seca em analisador automático *System Vitros Chemistry 950 Xrl (Johnson & Johnson)*.

A lipoproteína de baixa densidade (LDL-colesterol) foi determinada por meio de cálculo, a partir da fórmula de Friedewald *et al.* (1972):  $LDL-c = CT - HDL - (TG/5)$ , para valores de triacilglicerol abaixo de 400mg/dL (43). A concentração lipídica do sangue foi considerada alterada quando as concentrações de TG  $\geq 150$ mg/dL, o nível de HDL-C  $< 50$ mg/dL e concentrações de CT  $\geq 200$ mg/dL. A concentração de glicose sanguínea (de jejum) foi considerada alterada quando  $\geq 100$ mg/dL (37).

De acordo com as recomendações do Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, os valores de normalidade para mulheres de albumina,  $\gamma$ -GT, AST e ALT foram identificados entre 3,5 a 5,5g/dL, 12 a 43U/L, 14 a 36U/L e 9 a 52U/L, respectivamente.

A contagem total de plaquetas foi realizada em contador automático de células (ABX Pentra XL80®, Horiba, Kyoto, Japão), seguindo os valores normais, de referência do Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu ( $140$  a  $440 \times 10^3/mm^3$ ).

As concentrações séricas de insulina de jejum foram mensuradas pelo método de quimioluminescência (Immulite 2000 XPI®, Siemens Healthcare Diagnostic, Marburg, Alemanha).

Alíquotas de 2 mL de soro e 2 mL de plasma foram armazenadas em freezer, temperatura de  $-80^\circ C$ , para posterior dosagens dos demais parâmetros bioquímicos (PCR-us, LBP e fetuina-A).

### 3.7.1. Estresse Inflamatório

As concentrações plasmáticas de proteína C-reativa ultra-sensível (PCR-us) foram quantificadas por meio de ensaio ultra-sensível imuno-nefelométrico (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Alemanha). Foram adotadas concentrações acima ou igual a 0,3 mg/dL como valor de referência para o estresse inflamatório (20).

### 3.7.2. Proteína Ligadora de Lipopolissacarídeo

As concentrações da Proteína Ligadora de Lipopolissacarídeo (LBP) foram quantificadas a partir de alíquotas de soro, pelo método de ensaio imunoenzimático (ELISA) disponível comercialmente (*Duoset, R&D System, Minneapolis, USA*). Todo procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram diluídas 250 vezes e os níveis detectáveis, mínimo e máximo, foram 0,78 ng/mL e 50 ng/mL, respectivamente. Para melhor análise, os valores séricos encontrados da LBP foram divididos em tercil, sendo o menor tercil (tercil 1) com valores de 1,44 a 5,02 µg/mL; tercil 2 com valores de 5,07 a 6,79 µg/mL e o maior tercil (tercil 3) com valores de 6,91 a 9,83 µg/mL.

### 3.7.3. Fetuina-A

As concentrações de Fetuina-A humana foram quantificadas a partir de alíquotas de soro, por meio de ensaio imunoenzimático disponível comercialmente (*RayBio® Human Fetuin-A ELISA Kit*). Todo procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram diluídas 50.000 vezes e a dose mínima detectável de Fetuina-A determinada foi de 0,2 ng/mL. Para melhor análise, os valores séricos encontrados da Fetuina-A foram divididos em tercil, sendo o menor tercil (tercil 1) com valores de 696,1 a 1601 µg/mL, tercil 2 com valores de 1611,6 a 1962,6 µg/mL e o maior tercil (tercil 3) com valores de 1962,7 a 2757,3 µg/mL.

## 3.8. Diagnóstico da Síndrome Metabólica

O diagnóstico de SM foi feito de acordo com os critérios estabelecidos pelo *National Cholesterol Program's Adult Treatment Panel III* (NCEP-ATPIII) (10), atualizados pela *American Heart Association* (AHA) e pelo *National Heart, Lung and Blood Institute* (NHLBI) e descritos por Grundy *et al.* (2005) (37), no qual a presença da SM é estabelecida quando três ou mais dos cinco componentes da SM, descritos na **Tabela 2**, estão alterados.

**Tabela 2.** Componentes da Síndrome Metabólica segundo o *National Cholesterol Program's Adult Treatment Panel III* (NCEP-ATP III) e a atualização descrita por Grundy *et al.*(2005) (37).

Componentes	Valores de Referência de alteração
<b>Circunferência Abdominal</b>	
Homens	≥ 102 cm
Mulheres	≥ 88 cm
<b>Triacilglicerol</b>	≥ 150 mg/dL
<b>HDL-colesterol</b>	
Homens	< 40 mg/dL
Mulheres	< 50 mg/dL
<b>Pressão Arterial</b>	PAS ≥ 130 mmHg e/ou PAD ≥ 85mmHg
<b>Glicemia de jejum</b>	≥ 100 mg/dL

HDL: Lipoproteína de Alta Densidade; PAS: Pressão Arterial Sistólica; PAD: Pressão Arterial Diastólica.

### 3.9. Resistência Insulínica e Diagnóstico de Diabetes *Mellitus* Tipo 2

A partir da concentração sérica de glicose e de insulina de jejum foi determinada a resistência insulínica por meio de Modelo de Avaliação de Homeostase da Resistência Insulínica (HOMA-IR: Homeostasis Model Assessment-Insulin Resistance) (44). O valor de HOMA-IR maior ou igual a 2,71 foi considerado como indicador de resistência insulínica (45). A presença de DM2 foi considerada quando as concentrações de glicose de jejum eram maiores ou igual a 126 mg/dL, seguindo os critérios de diagnóstico de diabetes da *American Diabetes Association* (2018) (46).

### 3.10. Índice de Gordura Hepática

O Índice de Gordura Hepática (IGH) foi utilizado para classificação a respeito do acúmulo de gordura hepática, o algoritmo é baseado nas seguintes variáveis: IMC (kg/m<sup>2</sup>), circunferência abdominal (cm), triacilglicerol (mg/dL) e gama-glutamiltanspeptidase (U/L) (**Figura 2**). Apresenta 87% de sensibilidade e 86% de especificidade (31).

**Figura 2.** Algoritmo para o cálculo do IGH

$$\text{IGH} = \frac{e^{0,953 \cdot \log_e(\text{TG}) + 0,139 \cdot \text{IMC} + 0,718 \cdot \log_e(\gamma\text{-GT}) + 0,053 \cdot \text{CA} - 15,745}}{(1 + e^{0,953 \cdot \log_e(\text{TG}) + 0,139 \cdot \text{IMC} + 0,718 \cdot \log_e(\gamma\text{-GT}) + 0,053 \cdot \text{CA} - 15,745}) \cdot 100}$$

IGH: Índice de Gordura Hepática; TG: Triacilglicerol; IMC: índice de Massa Corporal;  $\gamma$ -GT: Gama-Glutamiltanspeptidase; CA: Circunferência Abdominal. **Fonte:** Adaptado de Bedogniet *al.* (2006) (31).

A pontuação total de IGH varia de 0 a 100 pontos, na qual os valores de IGH <60 indicam ausência ou teor tolerável de gordura hepática e IGH  $\geq 60$  indicam teor de gordura hepática que representa risco ou presença de doença hepática gordurosa não-alcoólica (31). No presente estudo todas as mulheres com IGH  $\geq 60$  foram consideradas com DGHNA.

### 3.11. Escore de Fibrose Hepática

Foi aplicado o Escore de Fibrose Hepática, *NAFLD Fibrosis Score* (NFS) que indica ausência ou presença de fibrose em indivíduos com DGHNA. Para o cálculo são utilizadas as seguintes variáveis: Idade (anos), Índice de Massa Corporal ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ), presença de Diabetes Mellitus Tipo 2 (sim/não), razão aspartato aminotransferase/alanina aminotransferase (AST/ALT), contagem de plaquetas ( $\times 10^9/\text{L}$ ) e albumina ( $\text{mg}/\text{dL}$ ) (**Figura 3**). O valor preditivo negativo é de 88% e o valor preditivo positivo é de 82%, validado em grupos de pacientes com confirmação por biópsia (47).

**Figura 3.** Equação para o cálculo de *NAFLD Fibrosis Score*

$$\text{NAFLD fibrosis score} = -1,675 + 0,037 \times \text{Idade (anos)} + 0,094 \times \text{IMC (kg/m}^2) + 1,13 \times \text{presença de diabetes (sim = 1, não = 0)} + 0,99 \times \text{AST/ALT razão} - 0,013 \times \text{plaquetas (x10}^9/\text{L)} - 0,66 \times \text{albumina (g/dL)}$$

NAFLD fibrosis score: Escore de Fibrose na Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica; IMC: Índice de Massa Corporal; AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase. **Fonte:** Ângulo *et al.* (2017) (47).

Os valores de NFS abaixo de -1,455 indicam ausência de fibrose hepática, valores entre -1,455 e 0,676 indicam teor tolerável de fibrose e valores acima de 0,676 indicam presença de fibrose hepática (47).

### 3.12. Índice Aterogênico Plasmático

Foi calculado o Índice Aterogênico Plasmático (IAP) pelo cálculo do logaritmo de TG dividido por HDL-c:  $\log(\text{TG}/\text{HDL-c})$ . O IAP é utilizado para prever o risco de doenças cardiovasculares (48). Classificado como baixo risco (<0,11), risco moderado (0,11 a 0,24) e alto risco (> 0,24) (49).



### 3.13. Escore de *Framingham*

Foi aplicado o Escore de Framingham (EF) para o cálculo preditivo de risco para doenças cardiovasculares (DCV), tais como: morte coronária, infarto do miocárdio, insuficiência coronariana, angina, acidente vascular cerebral isquêmico e hemorrágico, acidente isquêmico transitório, doença arterial periférica, insuficiência cardíaca, nos próximos 10 anos (50). O EF utiliza as seguintes variáveis para pontuação: idade (anos), gênero (masculino/feminino), tabagismo (sim/não), colesterol total (mg/dL), HDL-colesterol (mg/dL), Diabetes *Mellitus* tipo 2 (sim/não), pressão arterial sistólica (alterado >140mmHg) ou uso de medicamentos para hipertensão arterial (sim/não). Tal algoritmo foi desenvolvido em indivíduos com 30 a 74 anos, sem histórico de DCV no momento inicial do estudo (50).

Os riscos foram classificados de acordo com as pontuações obtidas: pontuação <10% indica baixo risco, pontuação de 10 a 20% indica risco moderado e pontuação >20% indica alto risco de eventos cardiovasculares nos próximos 10 anos (51).

### 3.14. Análise Estatística

Os dados obtidos foram computados em software Microsoft Excel. Foi realizado teste de Shapiro-Wilk para verificar a distribuição (paramétrico/não paramétrico) dos dados analisados. Dados categóricos foram representados em número (quantidade) e porcentagem, enquanto que dados contínuos expressos por mediana (mínimo-máximo). Para comparações múltiplas entre grupos independentes (>2 grupos: tercis da Fetuina-A) foi realizado teste de análise de variância de Kruskal-Wallis, seguido de post hoc de Dunn. Foi realizado teste de Correlação de Spearman para verificar associações das variáveis: IGH, fetuina-A, escore de fibrose com as variáveis antropométricas e indicadores de inflamação. Para comparar variáveis categóricas foi realizado teste de qui-quadrado ( $X^2$ ) com comparações dois-a-dois. Foi realizada Análise de Regressão logística multivariada. As análises foram realizadas em software STATISTICA ver.12.0. O nível de significância considerado foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Caracterização da Amostra

As 148 mulheres selecionadas tinham idade entre 35 e 78 anos (mediana=53,5). A maioria era casada, com ensino médio completo, com renda familiar de até cinco salários mínimos, 62,2% relataram o estado de saúde como bom e 90,6% apresentaram nível de atividade física dentro da recomendação ( $\geq 150$  min/sem). No entanto, 94% apresentaram padrão alimentar inadequado ( $< 100$  pontos) (**Tabela 3**). O excesso de peso foi prevalente em 81,8% desta amostra (53,4% obesas e 28,4% com sobrepeso), e a obesidade abdominal (CA  $\geq 88$  cm) em 78,4% das mulheres.

Mais que a metade das participantes apresentou DGHNA (IGH  $\geq 60$ ) (55,4%) e 1,3% apresentaram fibrose hepática. A presença de SM foi de 41,9% e a de DM2 foi diagnosticada em 7,4% da amostra. O risco elevado de DCV foi de 15,5% para a aterosclerose (IAP) e de 1,3% pelo EF (**Tabela 3**).

**Tabela 3.** Caracterização das participantes do estudo, quanto às variáveis demográfica, socioeconômica, de qualidade da alimentação, de nível de atividade física, antropométrica e de prevalência de SM, DGHNA, DM2 e risco de DCV.

Variáveis	Total (n=148)	
	n (%) ou mediana (mín.-máx.)	
<b>Idade (anos)</b>	53,5 (35-78)	
<b>Estado Civil</b>		
Casado	91 (61,5)	
Não casado	57 (38,5)	
<b>Nível de Escolaridade</b>		
Fundamental Incompleto	47 (31,7)	
Fundamental Completo	13 (8,8)	
Médio Completo	66 (44,6)	
Superior Completo	22 (14,9)	
<b>Renda familiar (salário mínimo)</b>		
<2 salário mínimo	31 (21)	
2-5 salário mínimo	117 (79)	
<b>Estado de Saúde</b>		
Ruim	8 (5,4)	
Regular	48 (32,4)	
Bom	92 (62,2)	
<b>IAS-ad Inadequado (&lt;100 pontos)</b>	139 (94)	
<b>NAF Abaixo da recomendação (&lt;150 min/sem)</b>	14 (9,4)	
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>		
Eutrofia ( $\leq 24,9$ )	27 (18,2)	
Sobrepeso (25 a 29,9)	42 (28,4)	
Obesidade ( $\geq 30$ )	79 (53,4)	
<b>CA alterada (<math>\geq 88</math>cm)</b>	116 (78,4)	
<b>Síndrome Metabólica</b>	62 (41,9)	
<b>DGHNA (IGH<math>\geq 60</math>)</b>	82 (55,4)	
<b>Diabetes Mellitus tipo 2</b>	11 (7,4)	
<b>Fibrose hepática (NFS)</b>		
Ausência (< -1,455)	102 (69,0)	
Teor tolerável (-1,455 a 0,676)	44 (29,7)	
Presença (>0,676)	2 (1,3)	
<b>Risco de DCV - IAP</b>		
Baixo risco (<0,11)	102 (69)	
Moderado risco (0,11 a 0,24)	23 (15,5)	
Elevado risco (>0,24)	23 (15,5)	
<b>Risco de DCV - EF</b>		
Baixo risco (<10%)	127 (85,8)	
Moderado risco (10%-20%)	19 (12,9)	
Elevado risco (>20%)	2 (1,3)	

Idade expressa em mediana (mínimo-máximo). As demais variáveis expressas em quantidade (porcentagem). n: número de indivíduos; IAS-ad: Índice de Alimentação Saudável-adaptado; NAF: Nível de Atividade Física; IMC: Índice de Massa Corporal; CA: Circunferência Abdominal; DGHNA: Doença Gordurosa Hepática Não-Alcoólica; IGH: Índice de Gordura Hepática; NFS: *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Fibrosis Score*; IAP: Índice Aterogênico Plasmático; DCV: Doenças Cardiovasculares; EF: Escore de *Framingham*.

## 4.2. Caracterização das Mulheres com DGHNA

As 72 mulheres com DGHNA (IGH $\geq$ 60) apresentavam, em maioria, obesidade (86,1%) e SM (61,1%), com prevalência de DM2 de 11,1% e de fibrose hepática de 2,8%. O risco elevado de DCV foi de 27,8% para aterosclerose (IAP), e 2,8% pelo EF (**Tabela 4**).

**Tabela 4.** Caracterização das mulheres com DGHNA, quanto às variáveis demográfica, socioeconômica e de prevalência de SM, DM2 e risco de DCV.

Variáveis	Total (n=72)
	n (%) ou mediana (mín-máx)
<b>Idade (anos)</b>	54 (35-74)
<b>Estado Civil</b>	
Casado	49 (68)
Não casado	23 (32)
<b>Nível de Escolaridade</b>	
Fundamental Incompleto	28 (38,9)
Fundamental Completo	5 (6,9)
Médio Completo	36 (50)
Superior Completo	3 (4,2)
<b>Renda Familiar (salário mínimo)</b>	
< 2 salário mínimo	17 (23,6)
2-5 salário mínimo	55 (76,4)
<b>Estado de Saúde</b>	
Ruim	7 (9,7)
Regular	27 (37,5)
Bom	38 (52,8)
<b>Obesidade (IMC<math>\geq</math>30)</b>	62 (86,1)
<b>Síndrome Metabólica</b>	44 (61,1)
<b>Diabetes Mellitus Tipo 2</b>	8 (11,1)
<b>Fibrose hepática (NFS)</b>	
Ausência (<-1,455)	35 (48,6)
Teor tolerável (-1,455 a 0,676)	35 (48,6)
Presença (> 0,676)	2 (2,8)
<b>Risco de DCV - IAP</b>	
Baixo risco (<0,11)	38 (52,8)
Moderado risco (0,11-0,24)	14 (19,4)
Elevado risco (>0,24)	20 (27,8)
<b>Risco de DCV - EF</b>	
Baixo risco (<10%)	58 (80,5)
Moderado risco (10%-20%)	12 (16,7)
Elevado risco (>20%)	2 (2,8)

Idade expressa em mediana (mínimo-máximo). As demais variáveis expressas em quantidade (porcentagem). n: número de indivíduos; IGH: índice de Gordura Hepática; IMC: Índice de Massa Corporal; NFS: *Non Alcoholic Fatty Liver Disease Fibrosis Score*; IAP: Índice Aterogênico Plasmático; DCV: Doenças Cardiovasculares; EF: Escore de *Framingham*.

A DGHNA (IGH $\geq$  60) correlacionou-se positivamente com as proteínas PCR-us (r=0,37), LBP (r=0,44), fetuina-A (r=0,45) e com o escore de fibrose hepática (r=0,42) e, negativamente, com a albumina (r= -0,24) (**Tabela 5**).

O escore de fibrose além de correlacionar-se positivamente com o IGH (r=0,42), também o fez, com PCR-us (r=0,23) e LBP (r= 0,27) e com risco de DCV (r=0,35) (**Tabela 6**).

**Tabela 5.** Correlações entre as variáveis bioquímicas e escore de fibrose com a DGHNA(IGH  $\geq$  60).

Variáveis	DGHNA (IGH $\geq$ 60)	
	r	p
PCR-us(mg/dL)	<b>0,37</b>	<b>0,0012</b>
Albumina(g/dL)	<b>-0,24</b>	<b>0,043</b>
LBP( $\mu$ g/mL)	<b>0,44</b>	<b>&lt;0,0001</b>
Fetuina-A( $\mu$ g/mL)	<b>0,45</b>	<b>&lt;0,0001</b>
Escore de Fibrose	<b>0,42</b>	<b>0,0002</b>
Risco de DCV (EF)	0,14	0,230

r: Coeficiente de Correlação; IGH: Índice de Gordura Hepática; PCR-us: Proteína C-Reativa Ultra-sensível; LBP: Proteína Ligadora de Lipopolissacarídeo; DCV: Doenças Cardiovasculares; EF: Escore de *Framingham*. p < 0,05.

**Tabela 6.** Correlações entre as variáveis bioquímicas e IGH com o Escore de Fibrose.

Variáveis	Escore de Fibrose	
	r	p
PCR-us (mg/dL)	<b>0,23</b>	<b>0,043</b>
LBP( $\mu$ g/mL)	<b>0,27</b>	<b>0,023</b>
IGH	<b>0,42</b>	<b>0,0002</b>
Fetuina-A ( $\mu$ g/mL)	0,17	0,147
Risco de DCV (EF)	<b>0,35</b>	<b>0,002</b>

r: Coeficiente de Correlação; PCR-us: Proteína C-Reativa ultra-sensível; LBP: Proteína Ligadora de Lipopolissacarídeo; IGH: Índice de Gordura Hepática; DCV: Doenças Cardiovasculares; EF: Escore de *Framingham*. p < 0,05.

Além dos indicadores de adiposidade IMC ( $r = 0,31$ ), CA ( $r = 0,32$ ), e IGH ( $r = 0,45$ ), a fetuina-A sérica correlacionou-se positivamente também com a PCR-us ( $r = 0,32$ ) (**Tabela 7**).

**Tabela 7.** Correlações entre as variáveis antropométricas, bioquímicas, IGH e escore de fibrose com as concentrações de Fetuina-A ( $\mu\text{g/mL}$ )

Variáveis	Fetuina-A ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	r	p
IMC( $\text{kg/m}^2$ )	<b>0,31</b>	<b>0,007</b>
CA(cm)	<b>0,32</b>	<b>0,005</b>
HOMA-IR	0,21	0,076
PCR-us( $\text{mg/dL}$ )	<b>0,32</b>	<b>0,007</b>
Albumina( $\text{g/dL}$ )	-0,02	0,854
LBP( $\mu\text{g/mL}$ )	0,19	0,1083
IGH	<b>0,45</b>	<b>&lt;0,0001</b>
Escore de fibrose	0,17	0,147
Risco de DCV - IAP	0,11	0,350
Risco de DCV - EF	0,07	0,544

r: Coeficiente de Correlação; IMC: Índice de Massa Corporal; CA: Circunferência Abdominal; PCR-us: Proteína C-Reativa Ultra-sensível; LBP: Proteína Ligadora de Lipopolissacarídeo; IGH: Índice de Gordura Hepática; DCV: Doenças Cardiovasculares; IAP: Índice Aterogênico Plasmático; EF: Escore de *Framingham*.  $p < 0,05$ .

Em relação ao menor tercil, o tercil superior (Tercil 3) da fetuina-A conteve o maior número de mulheres com maiores valores do IGH (80-100), comparativamente aos menores valores (60-80), HOMA-IR alterado ( $\geq 2,71$ ), assim como o maior número de mulheres com PCR-us alterada ( $\geq 0,3 \text{ mg/dL}$ ). Entretanto, não houve significância estatística dentre os tercis de fetuina-A, para os parâmetros LBP, escore de fibrose e risco de DCVs (**Tabela 8**).

**Tabela 8.** Prevalência de indicadores de estresse Inflamatório e distúrbios metabólicos de acordo com a distribuição em tercís das concentrações séricas de Fetuina-A ( $\mu\text{g/mL}$ ).

	Fetuina-A ( $\mu\text{g/mL}$ )			Valor de p		
	Tercil 1 (n=24) (696,1 - 1601,0)	Tercil 2 (n=24) (1611,6 - 1962,6)	Tercil 3 (n=24) (>1962,7)	T1 x T2	T1 x T3	T2 x T3
	n(%)	n(%)	n (%)			
<b>HOMA-IR</b>						
Normal <2,71	16 (53,3)	9 (30,0)	5 (16,7) <sup>a</sup>	0,12	<b>0,01</b>	0,36
Alterado $\geq 2,71$	8 (19,1)	15 (35,7)	19 (45,2) <sup>a</sup>	0,14	<b>0,02</b>	0,50
<b>PCR-us</b>						
Normal <0,3 mg/Dl	20 (44,5)	15 (33,3)	10 (22,2) <sup>a</sup>	0,39	<b>0,04</b>	0,35
Alterado $\geq 0,3$ mg/dL	4 (14,8)	9 (33,3)	14 (51,9) <sup>a</sup>	0,20	<b>0,01</b>	0,27
<b>LBP (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>						
Tercil 1 (1,44 a 5,02)	8 (33,3)	8 (33,3)	8 (33,3)	1,00	1,00	1,00
Tercil 2 (5,07 a 6,79)	10 (41,7)	9 (37,5)	5 (20,8)	1,00	0,21	0,34
Tercil 3 (6,91 a 9,83)	6 (25,0)	7 (29,2)	11 (45,8)	0,74	0,23	0,37
<b>IGH</b>						
$\geq 60 < 80$	15 (55,6)	7 (25,9)	5 (18,5) <sup>a</sup>	0,05	<b>0,01</b>	0,74
$\geq 80 \leq 100$	9 (20,0)	17 (37,8)	19 (42,2) <sup>a</sup>	0,10	<b>0,04</b>	0,83
<b>Escore de Fibrose</b>						
Ausente (< -1,455)	13 (37,1)	13 (37,1)	9 (25,7)	1,00	0,44	0,44
Tolerante (-1,455 a 0,676)	11 (31,4)	11 (31,4)	13 (37,1)	1,00	0,80	0,80
Presença (>0,676)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (100,0)	-	0,32	0,32
<b>IAP</b>						
baixo (0,11)	5 (62,5)	1 (12,5)	2 (25,0)	0,12	0,31	1,00
Moderado (0,11-0,24)	5 (71,4)	1 (14,3)	1 (14,3)	0,11	0,11	1,00
elevado (>0,24)	14 (24,6)	22 (38,6)	21 (36,8)	0,16	0,22	1,00
<b>Risco de DCV</b>						
Baixo risco (<10%)	19 (32,8)	20 (34,4)	19 (32,8)	1,00	1,00	1,00
Moderado risco (10-20%)	5 (41,7)	2 (16,6)	5 (41,7)	0,37	1,00	0,37
Elevado risco (>20%)	0 (0,0)	2 (100,0)	0 (0,0)	0,32	-	0,32

HOMA-IR: Modelo de Avaliação da Homeostase de Resistência à Insulina; PCR-us: Proteína C-Reativa Ultra-sensível; LBP: Proteína Ligadora de Lipopolissacarídeo; IGH: Índice de gordura hepática; IAP: Índice Aterogênico Plasmático; DCV: Doenças Cardiovasculares; %: Percentual; mg: Miligrama; dL: Decilitro; mL: Mililitro; g: Grama;  $\mu\text{g}$ : Micrograma. T1: Tercil 1; T2: Tercil 2; T3: Tercil 3. Diferença estatística quando  $p < 0,05$ . Letra (a) indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grupo: tercil 1.

PCR-us e HOMA-IR alterados apresentam maior chance de apresentar concentrações elevadas de fetuina-A, todos persistindo após ajustes por idade, IMC e CA (**Tabela 9**).

**Tabela 9.** Modelos de regressão logística, ajustada para idade, IMC e CA, para consequências metabólicas em função das elevadas concentrações séricas de fetuina-A (tercil 3).

Co-Variáveis	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3	Modelo 4
HOMA-IR (alterado vs normal)	3,14(1,10-8,98)	3,16(1,10-9,08)	3,28(1,12-9,61)	3,93(1,29-11,96)
PCR-us (alterado vs normal)	4,87(1,66-14,25)	4,89(1,67-14,32)	5,11(1,69-15,38)	7,46(2,21-25,19)

Modelo 1: sem ajuste; Modelo 2: ajustado para idade; Modelo 3: modelo 2 mais Índice de massa corporal; Modelo 4: modelo 3 mais circunferência abdominal. HOMA-IR: Modelo de Avaliação de Homeostase da Resistência Insulínica; PCR-us: Proteína C-Reativa ultra-sensível; IGH: índice de Gordura Hepática.  $p < 0,05$ .

## 5. DISCUSSÃO

No geral, a fetuina-A associou-se à hiperadiposidade corporal (IMC e CA) e hepática (IGH), à inflamação sistêmica (PCR-us, mas não LBP) e à resistência insulínica, mas não significativamente aos indicadores da gravidade da DGHNA (hipoalbuminemia e fibrose hepática) e DCV (IAP e DAC).

O IGH utilizado como método para estimar a presença de DGHNA (31) possui validação com ultrassonografia em pacientes com e sem suspeita de DGHNA em estudos ocidentais e orientais, de coortes e longitudinais (52-54). Apresenta 87% de sensibilidade e 86% de especificidade (31), portanto, considerado excelente algoritmo clínico para diagnóstico de DGHNA.

A literatura é clara quanto à associação de DGHNA com a obesidade. Mundialmente, a obesidade permanece como fator de risco mais importante e mais bem descrito para DGHNA (30, 55). Os resultados de vários estudos transversais e estudos de caso-controle mostraram que pessoas com DGHNA têm maior circunferência abdominal ou IMC do que aquelas sem DGHNA (56, 57). Em estudo populacional com mais de três mil pacientes com DGHNA, com 20 anos de acompanhamento, o aumento do diagnóstico de DGHNA acompanhou o aumento da mediana do IMC e as taxas de obesidade na população geral (58).



Em acordo com a literatura, nossos dados demonstraram que a maioria das mulheres com DGHNA eram obesas (86,1%). Além da alta prevalência de obesidade, houve maior prevalência de SM (61,1%).

A DGHNA e a SM compartilham vias fisiopatológicas e fatores de risco em comum, incluindo obesidade central, hipertensão, dislipidemia e hiperglicemia (59), que estão significativamente associadas à inflamação hepática e sistêmica de baixo grau (60-62). Assim, a DGHNA pode ser considerada tanto causa como consequência da SM (59), cerca de um terço dos pacientes com DGHNA apresentam SM e, aproximadamente 90% dos pacientes com DGHNA têm pelo menos um dos componentes da SM (63). Estudos prospectivos de coorte mostraram que a DGHNA é fator de risco independente para SM em populações chinesas e coreanas (64, 65).

Estudo realizado com participantes do *Framingham Heart Study* demonstrou relações bidirecionais entre fígado gorduroso e fatores de risco (inflamação, hipertensão, RI e DM2) para DCV (66). Em estudo de meta-análise, com estudos longitudinais, observaram que a DGHNA está significativamente associada ao risco aumentado de morte e evento não-fatal de DCV, e que esse risco é provavelmente maior na doença hepática mais grave (EHNA e fibrose hepática) (67). No entanto, nossos dados não mostraram correlação entre DGHNA e risco aumentado de DCV (IAP e EF). Por outro lado, a gravidade da doença, fibrose hepática (NFS), correlacionou-se positivamente com risco de eventos cardiovasculares nos próximos 10 anos (EF) ( $r=0,35$ ).

Devido à progressão da DGHNA estar relacionada com maior risco de mortalidade, principalmente por DCV (68), vários estudos foram realizados com intuito de investigar marcadores que possam estar relacionados ao prognóstico da doença (69-73). Polimeni *et al.* (2015) avaliaram a inflamação na DGHNA e relataram maior grau de inflamação com pior prognóstico da doença (69).

No presente estudo, o IGH e a gravidade da doença pelo Escore de Fibrose (NFS), correlacionaram-se positivamente com marcadores inflamatórios, como PCR-us ( $r = 0,37$ ) e LBP ( $r = 0,44$ ). Sugere-se, que a PCR-us e a LBP são fatores críticos no desenvolvimento da doença relacionada ao estado inflamatório.

A avaliação da inflamação sistêmica pela PCR-us sérica está associada positivamente ao Índice de Gordura Hepático (74). Além disso, as concentrações de

PCR-us são maiores em pacientes com DGHNA mais grave (por ultrassonografia) e com EHNA, histologicamente comprovada, em comparação com esteatose hepática simples (16, 17). Isso pode ser tomado como norteador, de que as concentrações de PCR-us se correlacionam com a progressão da DGHNA.

Em relação ao marcador LBP, os nossos resultados estão de acordo com outros estudos, em que foi observado que indivíduos com DGHNA possuem concentrações aumentadas de LBP (75, 76), devido ao comprometimento da barreira epitelial intestinal, que leva a alterações metabólicas prejudiciais ao fígado. O fígado por receber seu principal suprimento sanguíneo do intestino, pela veia Porta, está exposto às substâncias potencialmente nocivas, como os lipopolissacarídeos (LPS), que circulam associados à LBP e, na membrana celular, se ligam ao TLR-4, induzindo inflamação (62).

Em estudo com obesos mórbidos e com DGHNA, os autores observaram, além de altas concentrações de PCR, baixas concentrações de albumina e após serem submetidos à cirurgia bariátrica, a diminuição significativa do acúmulo de gordura hepática levou à melhora das concentrações de albumina e PCR ( $p < 0,01$ ) (77). Semelhantemente, na nossa amostra de mulheres, maioria com obesidade, o IGH correlacionou-se negativamente com a albumina ( $r = - 0,24$ ).

A inflamação sistêmica, característica da obesidade e da DGHNA, está associada a queda acentuada na síntese de proteínas de fase aguda negativa como a albumina e fetuina-A, processo que é mediado por citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- $\alpha$ ) (78).

Quanto à fetuina-A, muitos estudos avaliaram a sua relação de forma separada com o acúmulo de gordura no fígado (79), e fibrose hepática (80), bem como sua associação com risco de DCV (81).

Estudos anteriores demonstraram que as concentrações de fetuina-A sérica são maiores em indivíduos com esteatose hepática, comparados com aqueles sem a doença (18, 80). Em análise transversal realizada em mais de 5 mil adultos chineses, as concentrações séricas de fetuina-A foram significativamente associadas a níveis elevados de IGH, ALT e AST, indicadores da DGHNA (19). Estudo prospectivo demonstrou que altas concentrações de fetuina-A estão independentemente associados à DGHNA (82), e a diminuição na gordura do fígado foi acompanhada por uma diminuição na concentração sérica de fetuina-A (18).

A fetuina-A também foi associada à obesidade em estudos anteriores, que mostraram que as concentrações séricas de fetuina-A foram significativamente maiores em obesos (crianças e adultos) em relação aos controles (83, 84). Concentrações de fetuina-A diminuiu após a perda de peso (85), demonstrando a reversibilidade das concentrações aumentadas de fetuina-A em humanos, e apontando para níveis elevados de fetuina-A como consequência, em vez de causar obesidade.

Em consistência com os resultados acima mencionados, nossos dados mostraram que a fetuina-A correlacionou-se positivamente com a hiperadiposidade corporal (IMC e CA) e com a DGHNA ( $IGH \geq 60$ ), e ainda em relação ao menor tercil de fetuina-A (tercil1), o tercil superior (tercil 3) apresentou maior número de mulheres com maiores valores do IGH (80-100), comparado aos menores valores (60-80).

A obesidade, particularmente obesidade abdominal, leva ao aumento de ácidos graxos livres e citocinas pró-inflamatórias e a diminuição de adiponectina na corrente sanguínea (84, 86, 87). Os ácidos graxos livres aumentam diretamente a secreção de fetuina-A pelo fígado, através de fator nuclear kappa B (NF-kB) (88).

O aumento da secreção de fetuina-A causa resistência à insulina no músculo esquelético e no fígado. Ao mesmo tempo, o aumento da fetuina-A promove a disfunção dos adipócitos diminuindo os níveis de adiponectina, uma adipocina sensibilizadora de insulina (18). Vários estudos demonstraram associação positiva entre RI e concentrações de fetuina-A (18, 21, 26).

Coerentemente, nossos dados mostraram que em relação ao menor tercil, o tercil superior (Tercil 3) da fetuina-A conteve o maior número de mulheres com resistência insulínica, bem como o maior número de mulheres com PCR-us alterada. Após ajustes, HOMA-IR e PCR-us alterados constituíram fatores de risco independentes para as maiores concentrações de fetuina-A, indicando que as mulheres em presença de DGHNA com altas concentrações de fetuina-A além de RI, apresentavam inflamação sistêmica.

Em discordância com a literatura, nossos dados mostraram que a concentração sérica de fetuina-A correlacionou-se positivamente com a PCR-us ( $r = 0,32$ ). A fetuina-A é considerada uma proteína de fase aguda negativa, portanto, inversamente correlacionado com a concentração sérica de PCR (21, 22). No

entanto, esses achados, em maioria, foram encontrados em estudos onde avaliaram a fetuina-A em doenças auto-imunes e infecciosas (89-91).

Em estudo prévio com adultos com DGHNA, a fetuina-A não apresentou correlação com marcadores inflamatórios sistêmicos, como PCR, IL-6 e TNF- $\alpha$  (23). No entanto, indivíduos com DGHNA apresentaram valores significativamente mais altos de fetuina-A e PCR-us do que os indivíduos sem DGHNA (93). Esses achados sugerem que o comportamento da fetuina-A em relação à inflamação depende de uma série de fatores, bem como o comprometimento hepático e metabólico do indivíduo.

Foi demonstrando que a fetuina-A serve como proteína adaptadora que liga diretamente os AGL à ativação do *toll like receptor-4* (TLR4) em macrófagos e adipócitos (25). Assim, por meio de ativação do NF-kB há aumento de produção de citocinas pró-inflamatórias por adipócitos e macrófagos e, portanto, a fetuina-A atua como um biomarcador de doenças inflamatórias crônicas (26, 27).

Associação entre a fetuina-A sérica com a gravidade da doença hepática tem sido relatada. Kahraman *et al.* (2013), demonstraram em pacientes adultos obesos, que os níveis de mRNA de fetuina-A estavam significativamente aumentados no tecido hepático de indivíduos com DGHNA em comparação com controles saudáveis e a expressão foi mais pronunciada em pacientes com EHNA, diagnosticados por biópsia (94). Também foi demonstrada uma correlação entre a fetuina-A sérica e a fibrose hepática em pacientes adultos com DGHNA (29, 80), sugerindo que essa glicoproteína poderia ser um marcador de progressão do comprometimento hepático em pacientes com DGHNA.

No presente estudo foi utilizado o Escore de Fibrose “*NAFLD fibrosis score*” (NFS), que é o biomarcador não invasivo mais comum e recomendado para identificar fibrose hepática, com alto valor preditivo negativo (88%) e positivo (82%) (30, 47, 95). Em desacordo com os resultados encontrados nos estudos citados anteriormente, não encontramos correlação entre as concentrações séricas de fetuina-A e o escore de fibrose hepática, pode ser atribuído ao pequeno número de mulheres com fibrose hepática no presente estudo. Em concordância com os nossos dados, estudos com pacientes com DGHNA diagnosticados por biópsia (método padrão ouro), a concentração sérica de fetuina-A não apresentou relação com estágio de fibrose hepática (94, 96).

Dada a conhecida associação entre a resistência à insulina e o estágio de fibrose em pacientes com DGHNA (97), pode-se esperar que a fetuina-A, como marcador de resistência à insulina, aumente paralelamente ao grau de fibrose hepática. No entanto, a fetuina-A é inibidor extracelular do fator de crescimento transformador-beta1 (TGF- $\beta$ 1) (98), o principal estímulo pró-fibrogênico na doença hepática crônica (99). Consequentemente, a fetuina-A elevada poderia representar mecanismo de proteção contra o desenvolvimento de fibrose hepática (100). Atualmente, não há conclusões definidas sobre o papel da fetuina-A na fibrogênese hepática na DGHNA.

A fetuina-A demonstrou associações complexas e divergentes com desfechos cardiovasculares, com relatos de aumento do risco de eventos cardiovasculares subclínicos para concentrações altas e baixas da proteína (22, 24, 81, 101-103).

Na nossa amostra de mulheres com DGHNA, que não apresentavam eventos cardiovasculares prévios, observamos que a fetuina-A correlacionou-se positivamente com biomarcadores de risco cardiovascular (PCR-us, HOMA-IR). Em contraste com os estudos anteriores, não observamos uma associação significativa entre as concentrações de fetuina-A e risco de eventos cardiovasculares (EF e IAP).

Em estudo com pessoas idosas, com e sem DM2, os autores mostraram que altas concentrações de fetuina-A foram associados à morte por DCV naqueles com DM2 e foi inversamente associada na ausência de DM2 (104). Em indivíduos com DGHNA, pela primeira vez, Dogru *et al.* (2013) mostraram associação positiva entre fetuina-A circulante e disfunção endotelial, e aterosclerose subclínica (105).

Menor concentração de fetuina-A circulante foi associada à calcificação vascular e à mortalidade cardiovascular em modelo animal e humano (101-103, 106). Por outro lado, altas concentrações de fetuina-A foram associadas ao espessamento médio-intimal da artéria carótida (107), infarto do miocárdio (81), perfil lipídico aterogênico (108, 109) e aumento do risco de resistência à insulina (108), diabetes *mellitus* tipo 2 (110, 111) e síndrome metabólica (109).

Essas associações podem sugerir dupla função da glicoproteína fetuina-A relacionada à DCV; pela atuação indireta da glicoproteína na patogênese de aterosclerose através de uma influência nos fatores de risco (aterosclerose, RI, DM2, SM) para DCV (109), e pelo papel da fetuina-A como importante inibidor da

calcificação ectópica vascular (112). Nossos resultados, no entanto, não permitem confirmar essas hipóteses.

As inconsistências entre os achados dos estudos podem ser resultado de variações nas avaliações de risco cardiovasculares (medidas diretas e indiretas de avaliações), avaliação de eventos fatais e não-fatais e diferenças nas características da população (idade, doença crônica subjacente como RI, DM2, DGHNA e aterosclerose) (113).

Segundo Zhao *et al.* (2013), maiores concentrações séricas de fetuina-A podem contribuir para o desenvolvimento de aterosclerose em pacientes com distúrbios metabólicos, pelo papel da fetuina-A em exacerbar a doença promovendo resistência à insulina e dislipidemia (114). Porém, quando em presença de doença arterial coronariana, altas concentrações de fetuina-A têm resultados positivos, como inibidor bem descrito da calcificação vascular, a fetuina-A pode prevenir a precipitação mineral espontânea vascular, como em placas de ateroma (101, 102).

Contudo, fetuina-A parece ser uma proteína de fase aguda positiva, em que altas concentrações promovem (provocar RI e inflamação) e inibem (atenuar alterações fibróticas e calcificação vascular) a progressão de DGHNA com risco de DCV (29). No entanto, os estudos ainda são inconclusivos, e o significado da fetuina-A sérica na fibrose hepática e alterações aterogênicas em indivíduos com DGHNA permanecem desconhecido.

## 6. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstra que a concentração sérica de fetuina-A apresenta-se elevada em mulheres com DGHNA, e que a fetuina-A sérica é biomarcador para resistência à insulina (HOMA-IR) e processo inflamatório sistêmico (PCR-us) associados à DGHNA. No entanto, não foi possível observar relação entre as concentrações séricas de fetuina-A com a gravidade da DGHNA para fibrose hepática e nem com risco de eventos cardiovasculares. Mais pesquisas são necessárias, principalmente estudos prospectivos, para explorar a potencial relação da fetuina-A com a aterosclerose e progressão da doença hepática em indivíduos com DGHNA.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Olshansky SJ, Passaro DJ, Hershov RC, Layden J, Carnes BA, Brody J, et al. A Potential Decline in Life Expectancy in the United States in the 21st Century. *New England Journal of Medicine*. 2005;352(11):1138-45.
2. World Health Organization. *NCD Country Profiles*. WHO Press; 2018 p.
3. Finkelstein EA, Strobos KL. The economics of obesity. 2010;91(5):1520S-4S.
4. Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *Journal of Clinical Investigation*. 2011;121(6):2094-101.
5. Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *Journal of Clinical Investigation*. 2011;121(6):2111-7.
6. Santilli F, Guagnano MT, Vazzana N, Barba SL, Davi G. Oxidative Stress Drivers and Modulators in Obesity and Cardiovascular Disease: From Biomarkers to Therapeutic Approach. *Current Medicinal Chemistry*. 2015;22(5):582-95.
7. Mulhall BP, Ong JP, Younossi ZM. Non-alcoholic fatty liver disease: An overview. 2002;17(11):1136-43.
8. Hashimoto E, Tanai M, Tokushige K. Characteristics and diagnosis of NAFLD/NASH. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2013;28:64-70.
9. Ma H, Xu C, Xu L, Yu C, Miao M, Li Y. Independent association of HbA1c and nonalcoholic fatty liver disease in an elderly Chinese population. 2013;13(1):3.
10. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection E, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. . *Circulation*. 2002;106:3143-421.
11. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016;64(1):73-84.
12. Ekstedt M, Franzén LE, Mathiesen UL, Thorelius L, Holmqvist M, Bodemar G, et al. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. 2006;44(4):865-73.
13. Sun L, Yu Z, Ye X, Zou S, Li H, Yu D, et al. A Marker of Endotoxemia Is Associated With Obesity and Related Metabolic Disorders in Apparently Healthy Chinese. 2010;33(9):1925-32.
14. J.C. KACaB. Toll-like receptors: linking inflammation to metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2011;22:16-23.

15. Williams CD, Stengel J, Asike MI, Torres DM, Shaw J, Contreras M, et al. Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis Among a Largely Middle-Aged Population Utilizing Ultrasound and Liver Biopsy: A Prospective Study. *Gastroenterology*. 2011;140(1):124-31.
16. Vanjiappan S, Hamide A, Ananthkrishnan R, Periyasamy SG, Mehalingam V. Nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus and its association with cardiovascular disease. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 2018;12(4):479-82.
17. Yoneda M, Mawatari H, Fujita K, Iida H, Yonemitsu K, Kato S, et al. High-sensitivity C-reactive protein is an independent clinical feature of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and also of the severity of fibrosis in NASH. *Journal of Gastroenterology*. 2007;42(7):573-82.
18. Stefan N, Hennige AM, Staiger H, Machann J, Schick F, Krober SM, et al. 2-Heremans-Schmid Glycoprotein/ Fetuin-A Is Associated With Insulin Resistance and Fat Accumulation in the Liver in Humans. 2006;29(4):853-7.
19. Huang Y, Huang X, Ding L, Wang P, Peng K, Chen Y, et al. Serum Fetuin-A Associated With Fatty Liver Index, Early Indicator of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Medicine*. 2015;94(39):e1517.
20. Ridker PM. From C-Reactive Protein to Interleukin-6 to Interleukin-1. 2016;118(1):145-56.
21. Wojtysiak-Duma B, Malecha-Jędraszek A, Burska A, Duma D, Donica H. Serum fetuin-A levels in patients with type 2 diabetes mellitus 2010. 93-9 p.
22. Ketteler M, Bongartz P, Westenfeld R, Wildberger JE, Mahnken AH, Böhm R, et al. Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study. *The Lancet*. 2003;361(9360):827-33.
23. Celebi Gea. The Relationship of Circulating Fetuin-A With Liver Histology and Biomarkers of Systemic Inflammation in Nondiabetic Subjects with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Saudi J Gastroenterol*. 2015;21(3):139-45.
24. Weikert C, Stefan N, Schulze MB, Pischon T, Berger K, Joost HG, et al. Plasma Fetuin-A Levels and the Risk of Myocardial Infarction and Ischemic Stroke. 2008;118(24):2555-62.
25. Pal D, Dasgupta S, Kundu R, Maitra S, Das G, Mukhopadhyay S, et al. Fetuin—A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance 2012.



26. Mori K, Emoto M, Yokoyama H, Araki T, Teramura M, Koyama H, et al. Association of Serum Fetuin-A With Insulin Resistance in Type 2 Diabetic and Nondiabetic Subjects. *Diabetes Care*. 2006;29(2):468-.
27. Ix JH, Sharma K. Mechanisms Linking Obesity, Chronic Kidney Disease, and Fatty Liver Disease: The Roles of Fetuin-A, Adiponectin, and AMPK. 2010;21(3):406-12.
28. Dabrowska AM, Tarach JS, Wojtysiak-Duma B, Duma D. Fetuin-A (AHSG) and its usefulness in clinical practice. Review of the literature. *Biomedical papers*. 2015;159(3):352-9.
29. Sato M, Kamada Y, Takeda Y, Kida S, Ohara Y, Fujii H, et al. Fetuin-A negatively correlates with liver and vascular fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease subjects. *Liver International*. 2015;35(3):925-35.
30. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2018;67(1):328-57. Epub 2017/07/18.
31. Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, Masutti F, Passalacqua M, Castiglione A, et al. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterology*. 2006;6(1).
32. Malachias MVB, Souza WKS, Plavnik FL, Rodrigues CIS, Brandão AA, NevesMFT, et al. 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. *Arq Bras Cardiol*. 2016;107(3Supl.3):1-83.
33. Craig CL, Marshall AL, Sjostrom M, Bauman AE, Booth ML, Ainsworth BE, et al. International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. *Med Sci Sports Exerc*. 2003;35(8):1381-95. Epub 2003/08/06.
34. World Health Organization. Global recommendations on physical activity for healthy. 2010.
35. WHO. World Health Organization. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Geneva: WHO/FAO. Expert Consultation on diet, nutrition and prevention of chronic diseases, 2002.
36. Heyward V, Stolarczyk L. Avaliação da composição corporal aplicada. 1 ed. Barueri, São Paulo 2000.
37. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al. Diagnosis and Management of the Metabolic Syndrome. *Circulation*. 2005;112(17):2735-52.
38. Fisberg RM, Marchioni DML, Colucci ACA. Avaliação do consumo alimentar e da ingestão de nutrientes na prática clínica. 2009;53(5):617-24.

39. Pinheiro ABV LE, Benzecry EH, Gomes MCS, Costa VM. Tabela para avaliação do consumo alimentar em medidas caseiras. 5 ed2009.
40. Philippi ST, Latterza AR, Cruz ATR, Ribeiro LC. Pirâmide alimentar adaptada: guia para escolha dos alimentos. *Revista de Nutrição*. 1999;12(1):65-80.
41. Mota JF, Rinaldi AEM, Pereira AF, Maestá N, Scarpin MM, Burini RC. Adaptação do índice de alimentação saudável ao guia alimentar da população brasileira. *Revista de Nutrição*. 2008;21(5):545-52.
42. Andriolo A, Martins A, Franco C, Venâncio I, Mendes M, et al. *Recomendações da Sociedade Brasileira de patologia Clínica/Medicina Laboratorial para coleta de sangue venoso* 2ed. Barueri, São Paulo 2010.
43. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
44. Levy JC, Matthews DR, Hermans MP. Correct homeostasis model assessment (HOMA) evaluation uses the computer program. *Diabetes Care* 1998;21:2191-2. p.
45. Geloneze B, Repetto EM, Geloneze SR, Tambascia MA, Ermetice MN. The threshold value for insulin resistance (HOMA-IR) in an admixed population: IR in the Brazilian Metabolic Syndrome Study. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2006;72(2):219-20.
46. American Diabetes Association (ADA). *Classification and Diagnosis of Diabetes:Standards of Medical Care in Diabetes—2018*. *Diabetes Care*. 2018;41(Supplement 1):S13-S27.
47. Angulo P, Hui JM, Marchesini G, Bugianesi E, George J, Farrell GC, et al. The NAFLD fibrosis score: A noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology*. 2007;45(4):846-54.
48. Dobiášová M, Frohlich J. The plasma parameter log (TG/HDL-C) as an atherogenic index: correlation with lipoprotein particle size and esterification rate in apob-lipoprotein-depleted plasma (FERHDL). 2001;34(7):583-8.
49. Dobiášová M. AIP—Atherogenic index of plasma as a significant predictor of cardiovascular risk: From research to practice2006. 64-71 p.
50. D'Agostino RB, Vasan RS, Pencina MJ, Wolf PA, Cobain M, Massaro JM, et al. General Cardiovascular Risk Profile for Use in Primary Care. *Circulation*. 2008;117(6):743-53.
51. Wilson PWF, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of Coronary Heart Disease Using Risk Factor Categories. *Circulation*. 1998;97(18):1837-47.

52. Jiang Z-Y, Xu C-Y, Chang X-X, Li W-W, Sun L-Y, Yang X-B, et al. Fatty liver index correlates with non-alcoholic fatty liver disease, but not with newly diagnosed coronary artery atherosclerotic disease in Chinese patients. 2013;13(1):110.
53. Koehler EM, Schouten JNL, Hansen BE, Hofman A, Stricker BH, Janssen HLA. External Validation of the Fatty Liver Index for Identifying Nonalcoholic Fatty Liver Disease in a Population-based Study. 2013;11(9):1201-4.
54. Machado MV, Cortez-Pinto H. Non-invasive diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease. A critical appraisal. *Journal of Hepatology*. 2013;58(5):1007-19.
55. Lazo M, Clark JM. The Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Global Perspective. *Semin Liver Dis*. 2008;28(04):339-50.
56. Jakobsen M, Berentzen T, Sorensen T, Overvad K. Abdominal Obesity and Fatty Liver. *Epidemiologic Reviews*. 2007;29(1):77-87.
57. Pang Q, Zhang J-Y, Song S-D, Qu K, Xu X-S, Liu S-S, et al. Central obesity and nonalcoholic fatty liver disease risk after adjusting for body mass index. *World journal of gastroenterology*. 2015;21(5):1650-62. Epub 2015/02/07.
58. Allen AM, Therneau TM, Larson JJ, Coward A, Somers VK, Kamath PS. Nonalcoholic fatty liver disease incidence and impact on metabolic burden and death: A 20 year-community study. *Hepatology*. 2018;67(5):1726-36.
59. Yki-Järvinen H. Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2014;2(11):901-10.
60. Targher G, Bertolini L, Poli F, Rodella S, Scala L, Tessari R, et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Risk of Future Cardiovascular Events Among Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes*. 2005;54(12):3541-6.
61. Schindhelm RK, Dekker JM, Nijpels G, Bouter LM, Stehouwer CDA, Heine RJ, et al. Alanine aminotransferase predicts coronary heart disease events: A 10-year follow-up of the Hoorn Study. *Atherosclerosis*. 2007;191(2):391-6.
62. Byrne CD, Targher G. NAFLD: A multisystem disease. *Journal of Hepatology*. 2015;62(1):S47-S64.
63. Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Predictors of Nonalcoholic Steatohepatitis and Liver Fibrosis in the Severely Obese. 2001;121(1):91-100.
64. Feng R, Du S-S, Wang C, Li Y, Liu L-Y, Guo F-C, et al. Lean-non-alcoholic fatty liver disease increases risk for metabolic disorders in a normal weight Chinese population 2014. 17932-40 p.
65. Ryoo J-H, Choi J-M, Moon SY, Suh YJ, Shin J-Y, Shin HC, et al. The clinical availability of non alcoholic fatty liver disease as an early predictor of the metabolic

syndrome in Korean men: 5-Year's prospective cohort study. *Atherosclerosis*. 2013;227(2):398-403.

66. Ma J, Hwang S-J, Pedley A, Massaro JM, Hoffmann U, Chung RT, et al. Bi-directional analysis between fatty liver and cardiovascular disease risk factors. *Journal of Hepatology*. 2017;66(2):390-7.

67. Targher G, Byrne CD, Lonardo A, Zoppini G, Barbui C. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident cardiovascular disease: A meta-analysis. *Journal of Hepatology*. 2016;65(3):589-600.

68. Del Ben M, Baratta, F., Polimeni, L. et al. . Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular disease: epidemiological, clinical and pathophysiological evidences. *Intern Emerg Med* 2012;7:291.

69. Polimeni L, Del Ben M, Baratta F, Perri L, Albanese F, Pastori D, et al. Oxidative stress: New insights on the association of non-alcoholic fatty liver disease and atherosclerosis. *World journal of hepatology*. 2015;7(10):1325-36. Epub 2015/06/08.

70. Fraser A, Harris R, Sattar N, Ebrahim S, Smith GD, Lawlor DA. Gamma-Glutamyltransferase Is Associated With Incident Vascular Events Independently of Alcohol Intake. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2007;27(12):2729-35.

71. Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, Nagata C, Takeda J, Sarui H, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is a novel predictor of cardiovascular disease. *World journal of gastroenterology*. 2007;13(10):1579-84. Epub 2007/03/14.

72. Tsai E, Lee T-P. Diagnosis and Evaluation of Nonalcoholic Fatty Liver Disease/Nonalcoholic Steatohepatitis, Including Noninvasive Biomarkers and Transient Elastography. *Clinics in Liver Disease*. 2018;22(1):73-92.

73. Vilar-Gomez E, Chalasani N. Non-invasive assessment of non-alcoholic fatty liver disease: Clinical prediction rules and blood-based biomarkers. *Journal of Hepatology*. 2018;68(2):305-15.

74. Klisic A, Kavaric N, Jovanovic M, Soldatovic I, Gligorovic-Barhanovic N, Kotur-Stevuljevic J. Bioavailable testosterone is independently associated with Fatty Liver Index in postmenopausal women. *Archives of Medical Science*. 2017;5:1188-96.

75. Kitabatake H, Tanaka N, Fujimori N, Komatsu M, Okubo A, Kakegawa K, et al. Association between endotoxemia and histological features of nonalcoholic fatty liver disease. *World journal of gastroenterology*. 2017;23(4):712-22. Epub 2017/01/28.

76. Guerra Ruiz A, Casafont F, Crespo J, Cayón A, Mayorga M, Estebanez A, et al. Lipopolysaccharide-Binding Protein Plasma Levels and Liver TNF-Alpha Gene Expression in Obese Patients: Evidence for the Potential Role of Endotoxin in the Pathogenesis of Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Obesity Surgery*. 2007;17(10):1374.

77. Uehara D, Seki Y, Kakizaki S, Horiguchi N, Tojima H, Yamazaki Y, et al. Long-term Results of Bariatric Surgery for Non-alcoholic Fatty Liver Disease/Non-alcoholic Steatohepatitis Treatment in Morbidly Obese Japanese Patients. *Obesity Surgery*. 2018.
78. Arroyo V, García-Martínez R, Salvatella X. Human serum albumin, systemic inflammation, and cirrhosis. *Journal of Hepatology*. 2014;61(2):396-407.
79. Stefan N, Hennige AM, Staiger H, Machann J, Schick F, Krober SM, et al. 2-Heremans-Schmid Glycoprotein/ Fetuin-A Is Associated With Insulin Resistance and Fat Accumulation in the Liver in Humans. *Diabetes Care*. 2006;29(4):853-7.
80. Yilmaz Y, Yonal O, Kurt R, Ari F, Oral AY, Celikel CA, et al. Serum fetuin A/ 2HS-glycoprotein levels in patients with non-alcoholic fatty liver disease: relation with liver fibrosis. *Annals of Clinical Biochemistry*. 2010;47(6):549-53.
81. Vörös K, Gráf L, Prohászka Z, Szenthe P, Kaszás E, Böröcz Z, et al. Serum fetuin-A in metabolic and inflammatory pathways in patients with myocardial infarction 2011. 703-9 p.
82. Ballestri S, Meschiari E, Baldelli E, E Musumeci F, Romagnoli D, Trenti T, et al. Relationship of Serum Fetuin-A Levels with Coronary Atherosclerotic Burden and NAFLD in Patients Undergoing Elective Coronary Angiography 2013.
83. Ismail NA, Ragab S, Dayem SMAE, Elbaky AA, Salah N, Hamed M, et al. Fetuin-A levels in obesity: differences in relation to metabolic syndrome and correlation with clinical and laboratory variables. *Archives of Medical Science*. 2012;5:826-33.
84. Stępień M, Wlazeł RN, Paradowski M, Banach M, Rysz M, Misztal M, et al. Serum concentrations of adiponectin, leptin, resistin, ghrelin and insulin and their association with obesity indices in obese normo- and hypertensive patients - pilot study. *Archives of medical science : AMS*. 2012;8(3):431-6. Epub 2012/07/04.
85. Reinehr T, Roth CL. Fetuin-A and Its Relation to Metabolic Syndrome and Fatty Liver Disease in Obese Children Before and After Weight Loss. 2008;93(11):4479-85.
86. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006;444(7121):860-7.
87. Kahn S, Hull R, Utzschneider K, Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444, 840-846 2007. 840-6 p.
88. Dasgupta S, Bhattacharya S, Biswas A, Majumdar Subeer S, Mukhopadhyay S, Ray S, et al. NF- $\kappa$ B mediates lipid-induced fetuin-A expression in hepatocytes that impairs adipocyte function effecting insulin resistance. *Biochemical Journal*. 2010;429(3):451-62.

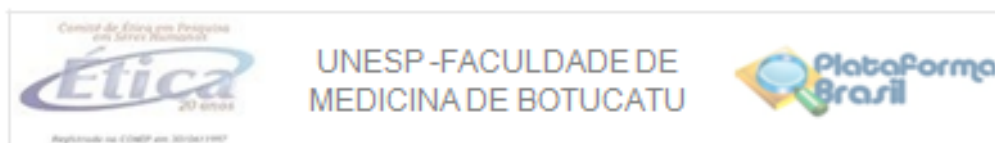
89. Wang H, Sama AE. Anti-inflammatory role of fetuin-A in injury and infection. *Current molecular medicine*. 2012;12(5):625-33.
90. Metry G SP, Qureshi AR, et al. Low serum fetuin-A concentration predicts poor outcome only in the presence of inflammation in prevalent haemodialysis patients. *Eur J Clin Invest*. 2008;38:804-11.
91. Kuśnierz-Cabala B G-DA, Panek J, et al. Serum fetuin A concentrations in patients with acute pancreatitis. *Clin Lab*. 2010;56:191-5.
92. Reinehr T, L Roth C. Fetuin-A and Its Relation to Metabolic Syndrome and Fatty Liver Disease in Obese Children Before and After Weight Loss 2008. 4479-85 p.
93. Huang Y, Huang X, Ding L, Wang P, Peng K, Chen Y, et al. Serum Fetuin-A Associated With Fatty Liver Index, Early Indicator of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Strobe-Compliant Article. *Medicine*. 2015;94(39):e1517.
94. Kahraman A, Sowa J-P, Schlattjan M, Sydor S, Pronadl M, Wree A, et al. Fetuin-A mRNA expression is elevated in NASH compared with NAFL patients. *Clinical Science*. 2013;125(8):391-400.
95. Watanabe S, Hashimoto E, Ikejima K, Uto H, Ono M, Sumida Y, et al. Evidence-based clinical practice guidelines for nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Journal of Gastroenterology*. 2015;50(4):364-77.
96. John Willy H, Tuva BD, Arne Y, Ivar PG, Else Marit L, Terese H, et al. Fetuin A in nonalcoholic fatty liver disease: in vivo and in vitro studies. *European Journal of Endocrinology*. 2012;166(3):503-10.
97. Svegliati-Baroni G, Bugianesi E, Bouserhal T, Marini F, Ridolfi F, Tarsetti F, et al. Post-load insulin resistance is an independent predictor of hepatic fibrosis in virus C chronic hepatitis and in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*. 2007;56:1296-301.
98. Swallow C, Partridge E, Macmillan J, Tajirian T, DiGuglielmo G, Hay K, et al. alpha2HS-glycoprotein, an antagonist of transforming growth factor beta in vivo, inhibits intestinal tumor progression. *Cancer Research*. 2004;64:6402-9.
99. Bataller R, Brenner D. Liver fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*. 2005;115:209-18.
100. Haukeland JW, Dahl TB, Yndestad A, Gladhaug IP, Løberg EM, Haaland T, et al. Fetuin A in nonalcoholic fatty liver disease: in vivo and in vitro studies. 2012;166(3):503.
101. Ix JH, Barrett-Connor E, Wassel CL, Cummins K, Bergstrom J, Daniels LB, et al. The Associations of Fetuin-A With Subclinical Cardiovascular Disease in Community-Dwelling Persons. 2011;58(23):2372-9.

102. Ix JH, Katz R, De Boer IH, Kestenbaum BR, Peralta CA, Jenny NS, et al. Fetuin-A Is Inversely Associated with Coronary Artery Calcification in Community-Living Persons: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Clinical Chemistry*. 2012;58(5):887-95.
103. Emoto M, Mori K, Lee E, Kawano N, Yamazaki Y, Tsuchikura S, et al. Fetuin-A and atherosclerotic calcified plaque in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism - Clinical and Experimental*. 2010;59(6):873-8.
104. Laughlin GA, Cummins KM, Wassel CL, Daniels LB, Ix JH. The Association of Fetuin-A With Cardiovascular Disease Mortality in Older Community-Dwelling Adults. 2012;59(19):1688-96.
105. Dogru T, Genc H, Tapan S, Aslan F, Ercin CN, Ors F, et al. Plasma fetuin-A is associated with endothelial dysfunction and subclinical atherosclerosis in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Clinical Endocrinology*. 2013;78(5):712-7.
106. Schäfer C, Heiss A, Schwarz A, Westenfeld R, Ketteler M, Floege J, et al. The serum protein  $\alpha$ 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *Journal of Clinical Investigation*. 2003;112(3):357-66.
107. Rittig K, Thamer C, Haupt A, Machann J, Peter A, Balletshofer B, et al. High plasma fetuin-A is associated with increased carotid intima-media thickness in a middle-aged population. *Atherosclerosis*. 2009;207(2):341-2.
108. Ishibashi A, Ikeda Y, Ohguro T, Kumon Y, Yamanaka S, Takata H, et al. Serum Fetuin-A is an Independent Marker of Insulin Resistance in Japanese Men. 2010;17(9):925-33.
109. Ix JH, Shlipak MG, Brandenburg VM, Ali S, Ketteler M, Whooley MA. Association between human fetuin-A and the metabolic syndrome: data from the Heart and Soul Study. *Circulation*. 2006;113(14):1760-7. Epub 2006/03/27.
110. Ix JH, Biggs ML, Mukamal KJ, Kizer JR, Zieman SJ, Siscovick DS, et al. Association of Fetuin-A With Incident Diabetes Mellitus in Community-Living Older Adults. *Circulation*. 2012;125(19):2316-22.
111. Ix JH. Fetuin-A and Incident Diabetes Mellitus in Older Persons. 2008;300(2):182.
112. Cai MMX, Smith ER, Holt SG. The role of fetuin-A in mineral trafficking and deposition. *BoneKEY Reports*. 2015;4:672.
113. Fiore CE, Celotta G, Politi GG, Di Pino L, Castelli Z, Mangiafico RA, et al. Association of high  $\alpha$ 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin concentration in serum and intima-media thickness in patients with atherosclerotic vascular disease and low bone mass. *Atherosclerosis*. 2007;195(1):110-5.

114. Zhao Z-W, Lin C-G, Wu L-Z, Luo Y-K, Fan L, Dong X-f, et al. Serum fetuin-A levels are associated with the presence and severity of coronary artery disease in patients with type 2 diabetes. *Biomarkers*. 2013;18(2):160-4.



## ANEXO 1



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** IMPLICAÇÕES DO ESTRESSE INFLAMATÓRIO/OXIDATIVO NA ESTEATOSE HEPÁTICA NÃO ALCOÓLICA E RISCO DE DOENÇA CORONARIANA: ESTUDO DE VARIÁVEIS LABORATORIAIS EM ADULTOS ATENDIDOS EM COORTE DINÂMICA

**Pesquisador:** LAYENE PEIXOTO BARROS

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 83435618.4.0000.5.411

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 2.588.670

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de resposta do(s) pesquisador(es) aos questionamentos do parecerista constante no parecer de 02 de março de 2018 do Projeto Intitulado "IMPLICAÇÕES DO ESTRESSE INFLAMATÓRIO/OXIDATIVO NA ESTEATOSE HEPÁTICA NÃO ALCOÓLICA E RISCO DE DOENÇA CORONARIANA: ESTUDO DE VARIÁVEIS LABORATORIAIS EM ADULTOS ATENDIDOS EM COORTE DINÂMICA", a ser desenvolvido pela pesquisadora Layene Peixoto Barros, sob orientação do Prof. Roberto Carlos Burini.

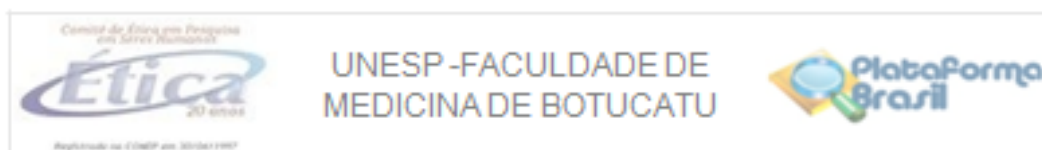
Em parecer anterior, foram solicitados esclarecimentos quanto a: 1. Consulta de dados do prontuário dos participantes; 2. Tempo de armazenamento de material biológico. Houve dúvidas em relação a esses dois pontos, considerando que as informações contidas no TCLE não eram condizentes com as informações prestadas no preenchimento da Plataforma Brasil e nos demais documentos apresentados.

Os questionamentos foram respondidos de forma clara e satisfatoriamente e o TCLE foi corrigido, não restando nenhuma pendência.

**Objetivo da Pesquisa:**

Conforme relatado em parecer anterior, o presente estudo busca avaliar o estresse inflamatório/oxidativo na esteatose hepática não alcoólica com o fator de risco para doença coronariana em adultos ingressantes em programa para mudança do estilo de vida.

Endereço: Chácara Sulignoli, s/n	Cel: 13.615-970
Bairro: Rubião Junior	
UF: SP	Município: BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1809	E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 2.555.670

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Relatados em parecer de 02 de março de 2018 por esse Colegiado.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Já relatado em parecer de 02 de março de 2018 pelo CEP.

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

Foram apresentados os seguintes documentos:

- Folha de rosto devidamente assinada;
- Termo de anuência Institucional;
- Projeto de pesquisa completo;
- Regulamento Funcional de Biorrepositório, conforme modelo fornecido por esse Colegiado;
- TCLE, em forma de convite, com as informações necessárias e com as modificações sugeridas em parecer anterior (exclusão da solicitação para consulta ao prontuário e correção do tempo de armazenamento de material biológico).

**Recomendações:**

Recomenda-se que o TCLE seja formatado de maneira que as assinaturas não permaneçam em folha separada. Sugere-se aumentar o espaçamento do texto de forma que parte dele fique na 2ª página, onde se encontra o espaço para as assinaturas.

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

Os questionamentos foram respondidos de forma clara e satisfatoriamente e o TCLE foi corrigido, não restando nenhuma pendência. Portanto, sugere-se a aprovação do presente projeto sem necessidade de envio à CONEP.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Conforme deliberação do Colegiado em reunião extraordinária do Comitê de Ética em Pesquisa da FMB/UNESP, realizada em 20 de março de 2018, o projeto encontra-se APROVADO, sem necessidade de envio à CONEP.

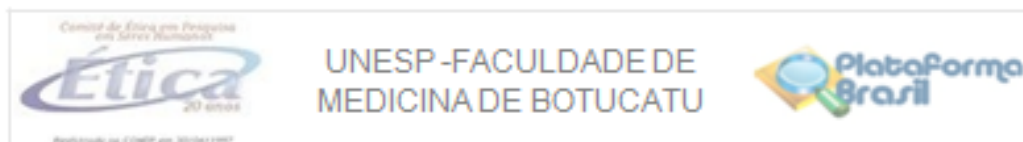
No entanto, informamos que ao final da execução da pesquisa, seja enviado o "Relatório Final de Atividades", na forma de "Notificação", via sistema Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP

Endereço: Chácara Sulgrati, s/n  
Bairro: Rubião Junior  
UF: SP Município: BOTUCATU  
Telefone: (14)3550-1809  
CEP: 13.615-970  
E-mail: cep@fmb.unesp.br

Página 2 de 03



Continuação do Parecer: 2.555.670

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	P5 INFORMACOES BASICAS DO PROJETO 1015488.pdf	13/03/2018 11:31:54		Aceito
Outros	Esclarecimento pendencia.pdf	13/03/2018 11:31:20	LAYENE PEIXOTO BARROS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE modificado.pdf	13/03/2018 11:29:57	LAYENE PEIXOTO BARROS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto Ms LAYENE.docx	26/01/2018 11:37:27	LAYENE PEIXOTO BARROS	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	biorepositorio.docx	26/01/2018 11:35:05	LAYENE PEIXOTO BARROS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE FMB.pdf	16/01/2018 11:21:32	LAYENE PEIXOTO BARROS	Aceito
Outros	TermoDeAnuencialInstitucional.pdf	16/01/2018 11:17:41	LAYENE PEIXOTO BARROS	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRostoAssinada.pdf	16/01/2018 11:16:57	LAYENE PEIXOTO BARROS	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BOTUCATU, 09 de Abril de 2018

Assinado por:  
SILVANA ANDREA MOLINA LIMA  
(Coordenador)

Endereço: Chácara Sulgroll, s/n  
Bairro: Rubião Junior  
UF: SP Município: BOTUCATU  
Telefone: (14)3250-1600  
CEP: 13.018-910  
E-mail: cep@fmb.unesp.br

Página 3 de 03