



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA

Rodrigo Santos Lima

**Avaliação de biomarcadores circulantes para
monitoramento da esteato-hepatite e fibrose na
doença gordurosa hepática não alcoólica**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção
de título de Doutor em Ciências – Área
Patologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rejane M. Tommasini Grotto

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Márjorie de Assis Golim

**Botucatu
2023**

Rodrigo Santos Lima

Avaliação de biomarcadores circulantes para
monitoramento da esteato-hepatite e fibrose na
doença gordurosa hepática não alcoólica

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção
do título de Doutor em Ciências – Área
Patologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rejane M. Tommasini Grotto

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Márjorie de Assis Golim

Botucatu
2023

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Lima, Rodrigo Santos.

Avaliação de biomarcadores circulantes para monitoramento da esteato-hepatite e fibrose na doença gordurosa hepática não alcoólica / Rodrigo Santos Lima. - Botucatu, 2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Rejane Maria Tommasini Grotto

Coorientador: Márjorie de Assis Golim

Capes: 40105008

1. Cirrose hepática. 2. Hepatopatia gordurosa não alcoólica. 3. Biomarcadores. 4. Esteatose hepática.

Palavras-chave: Biomarcadores; Fibrose hepática; NAFL; NAFLD; NASH.

Dedicatória

Aos meus pais, **Vladimir Teixeira Lima** e **Sandra Cristina Ferreira Santos**, e minha irmã, **Gabriela Santos Lima**, por sempre me apoiarem durante toda esta minha trajetória profissional. Vocês sempre me inspiram a buscar o melhor para mim.

Agradecimientos

À Professora **Rejane M. Tommasini Grotto** por ter me dado a oportunidade de iniciar este estudo, tão importante para a minha formação profissional. Agradeço por toda a compreensão despendida durante esses anos, pois sempre apoiou minhas escolhas profissionais e me estimulou a aproveitar o máximo desta experiência para a minha formação. Gratidão imensurável a você.

À Professora **Márjorie de Assis Golim** por ter sido um ponto de apoio fundamental na elaboração deste projeto. Não mediu esforços para tornar viável a execução deste estudo, além de ter sido uma grande motivadora nos momentos de maior adversidade inerente a toda esta trajetória percorrida. Será sempre meu exemplo de profissional a ser seguida.

Ao Professor **Rafael Plana Simões**, profissional primordial na execução deste estudo. Meu muito obrigado por toda a capacitação técnica envolvida e por me fazer acreditar que eu seria capaz de chegar onde cheguei. Sua habilidade de trazer esperança para momentos difíceis, quando tudo aparenta falhar, jamais será esquecida.

Às colegas de profissão e de laboratório **Aline Marcia Marques Braz** e **Francielle Ramalho Rocha** por todo apoio com a coleta, discussão, organização e apoio com os experimentos de laboratório referentes aos dados deste estudo. Sem vocês, este projeto não teria sido possível. Minha eterna gratidão.

Ao Professor **Giovanni Faria Silva** por ter aceitado participar neste projeto, fornecer os dados essenciais que foram discutidos, além de contribuir com orientações imprescindíveis para o avanço do estudo.

Ao Professor **Guilherme Targino Valente** pelas valiosas considerações em relação às análises do estudo e por ter se prontificado a auxiliar sempre que necessário. Meu muito obrigado.

*Agradecimentos ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** (CNPq), processo nº 141116/2019-6, e à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP), processo nº 2017/07711-0, pelo apoio financeiro neste estudo.*

Epígrafe

“O *Conhecimento se adquire e
a virtude se exercita.”*

Aristóteles

Listas

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTÁGIOS DE PROGRESSÃO DA NAFLD⁹.....	23
FIGURE 2: ROC CURVES FROM THE ATTRIBUTES WITH AUROC ≥ 0.65.....	51
FIGURE 3: GENDER DISTRIBUTION ACCORDING TO LIVER FIBROSIS CLASSIFICATION.	52
FIGURE 4: FREQUENCY DISTRIBUTION OF BALLOONING, INFLAMMATION, STEATOSIS AND NAS ACCORDING TO THE HEPATIC FIBROSIS CLASSIFICATION.....	53
FIGURE 5: MEDIAN AND SEMI-INTERQUARTILE RANGE OF AGE (IN YEARS) OF GROUPS. MEDIANS - CONTROL: 48; STEATOSIS: 39.5; NASH GROUPS: F0 = 50; F1 = 53.5; F2 = 50; F3 = 57.5; F4 = 57.5.	54
FIGURE 6: FIB-4 AND NFS SCORES IN PREDICTING STEATOSIS AND FIBROSIS GRADES. A) FIB-4 IN THE DIFFERENT GROUPS. B) NFS SCORE IN THE DIFFERENT GROUPS (MEDIAN AND SEMI-INTERQUARTILE RANGE).....	55
FIGURE 7: APRI SCORES IN PREDICTING STEATOSIS AND FIBROSIS GRADES.	55
FIGURE 8: CHEMOKINES DISTRIBUTION IN THE STUDY GROUPS (CONTROL, STEATOSIS AND FIBROSIS GRADES).	58
FIGURE 9: DISTRIBUTION VALUE OF TIMPS IN IN THE STUDY GROUPS (CONTROL, STEATOSIS AND FIBROSIS GRADES). ..	59

LISTA DE TABELAS

TABELA 1– DESCRIÇÃO E PERFORMANCE DE ESCORES PARA A DETECÇÃO DE FIBROSE AVANÇADA NA NAFLD.²²	28
TABLE 2: CHARACTERIZATION OF THE STUDY GROUPS ACCORDING TO NASH AND NON-NASH.	50
TABLE 3: DISTRIBUTION OF CATEGORICAL VARIABLES IN NAFLD PATIENTS.....	52
TABLE 4: STATISTICAL ANALYSIS OF CONSOLIDATED ATTRIBUTES FOR NAFLD IN NORMALITY TEST.	56
TABLE 5: STATISTICAL ANALYSIS OF CHEMOKINES ACCORDING TO KRUSKAL-WALLIS/POST HOC DUNN FOR THE GROUPS AND MANN WHITNEY TEST FOR P=VALUE IN NORMALITY TEST.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- α -SMA – α -Actina do músculo liso – do inglês *α -Smooth Muscle Actin*
- α 2M – Alfa 2 - macroglobulina
- AH – Ácido Hialurônico
- ALT – Alanina Aminotransferase
- Apo-A1 – Apolipoproteína A-1
- APRI – Índice APRI – do inglês *AST to Platelet Ratio Index*
- AST – Aspartato Aminotransferase
- AUROC – do inglês *Area Under de ROC Curve*
- CCL – do inglês *Chemokine (C-C motif) Ligand*
- CCR – do inglês *C-C Motif Chemokine Receptor*
- CHC – Carcinoma Hepatocelular
- DC – Células Dendríticas – do inglês *Dendritic Cells*
- EASD – Associação para o Estudo do Diabetes – do inglês *European Association for the Study of Diabetes*
- EASL – Associação Europeia para o Estudo do Fígado – do inglês *European Association for the Study of the Liver*
- EASO – Associação Europeia para o Estudo da Obesidade – do inglês *European Association for the Study Obesity*
- ELF – Teste Aprimorado de Fibrose Hepática – do inglês *Enhanced Liver Fibrosis*
- F0 – Ausência de fibrose
- F1 – Fibrose perisinusoidal ou periportal
- F2 – Fibrose perisinusoidal e portal/periportal
- F3 – Fibrose em ponte
- F4 – Presença de cirrose
- FIB-4 – Calculador de Fibrose-4
- FLI – Índice de Gordura Hepática – do inglês *Fatty Liver Index*
- GGT – Gama Glutamil Transferase
- HOMA-IR – do inglês *Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*
- HSCs – Células Estreladas Hepáticas – do inglês *Hepatic Stellate Cells*
- IFN – Interferon
- IL – Interleucina – do inglês *Interleukin*

IMC – Índice de Massa Corporal

IP-10 – do inglês *interferon gamma-induced protein 10*

MAFLD – Disfunção Metabólica Associada à Doença Gordurosa do inglês *Metabolic Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease*

MAIT – Células T Invariáveis Associadas à Mucosa – do inglês *Mucosal Associated Invariant T Cells*

MCP-1 – do inglês *monocyte chemoattractant protein 1*

MIG – do inglês *monokine induced by gamma interferon*

MMPs – Metaloproteinases – inglês *Matrix Metalloproteinases*

MRE – Ressonância magnética – do inglês *Magnetic Resonance Elastography*

NAFL – Doença Gordurosa Não Alcoólica – do inglês *Nonalcoholic Fat Liver*

NAFLD – Doença Gordurosa Hepática Não Alcoólica – do inglês *Nonalcoholic Fat Liver Disease*

NAS – do inglês *NAFLD Activity Score*

NASH – Esteato-hepatite Não Alcoólica – do inglês *Nonalcoholic Steatohepatitis*

NFS – Escore de Fibrose NAFLD – do inglês *NAFLD Fibrosis Score*

PDFF – do inglês *Proton Density Fat Fraction*

PDFF – Ressonância magnética por meio da mensuração da fração de gordura em densidade protônica – do inglês *Magnetic Resonance Imaging-Proton Density*

RANTES – do inglês *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*

ROC – Espécies Reativas de Oxigênio – do inglês *Reactive Oxygen Species*

SAF – Escore denominado do inglês (*Steatosis, Activity, Fibrosis*)

SWE – Elastografia de quantificação de ponto (SWE) – do inglês *Shear Wave Elastography*

TGF – Fator de Crescimento Transformador – do inglês *Transforming Growth Factor*

TIMP – Inibidor de Metalopeptidase – do inglês *Metalloproteinase Inhibitor*

TNF – Fator de Necrose Tumoral – do inglês *Tumor Necrosis Factor*

Tregs – Células T reguladoras – do inglês *Regulatory T Cells*

US – Ultrassonografia

VCTE – Elastografia transitória controlada por vibração – do inglês *Vibration-controlled transient elastography*

Sumário

SUMÁRIO

Sumário

Resumo.....	19
Abstract	20
Capítulo I.....	21
Revisão de Literatura.....	21
1. Introdução	19
2. Fisiopatologia	21
3. Epidemiologia	23
4. Biópsia Hepática no Estadiamento de Fibrose Hepática, Esteatose e NASH.....	25
5. Método Não Invasivos para o Estadiamento de Fibrose Hepática	26
6. Citocinas, Quimiocinas e TIMPs	29
7. Células do Sistema Imune no Contexto da NAFLD	33
8. Conclusão	36
9. Referências	38
Capítulo II Artigo.....	42
Abstract.....	45
1. Introduction	46
2. Methods	47
3. Results	49
4. Discussion.....	59
5. Conclusion	63
6. References.....	64
7. ANEXOS	66
A) Parecer Consubstanciado do CEP	66
B) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	71

Resumo

Neste trabalho foi descrito um panorama acerca da Doença Gordurosa Hepática (NAFLD). O conteúdo deste estudo foi subdividido em Capítulos I e II. O Capítulo I versa sobre uma revisão da literatura no que diz respeito à temas como apresentação da doença, fisiopatologia, epidemiologia atual, a relevância da biópsia hepática para o estadiamento de lesões inerentes à progressão da doença, a utilização de métodos não invasivos para avaliação de fibrose hepática e a participação de citocinas, quimiocinas, TIMPs e células do sistema imune no contexto inflamatório que deflagra as lesões progressivas da doença. No Capítulo II foi apresentado o estudo decorrente das pesquisas realizadas para esta tese, o qual avaliou o potencial de biomarcadores circulantes para o monitoramento de esteato-hepatite e fibrose hepática na NAFLD. Nestas análises foi possível observar a relevância de moléculas como TIMP-1, IL-8, MIG, IP-10, MCP-1 e RANTES para o acompanhamento de pacientes diagnosticados com a NAFLD, resultados estes que poderiam propiciar o desenvolvimento de novos algoritmos para o acompanhamento clínico de pacientes com NAFLD.

Abstract

In this work it was described an overview regarding Fatty Liver Disease (NAFLD). The content of this study was subdivided into Chapters I and II. Chapter I presents a literature review related to topics such as disease presentation, pathophysiology, current epidemiology, the relevance of liver biopsy for staging lesions inherent to disease progression, the use of non-invasive methods for assessing hepatic fibrosis and the participation of cytokines, chemokines, TIMPs and cells of the immune system in the inflammatory context that triggers the progressive lesions of the disease. In Chapter II, it was presented the study resulting from this research, which evaluated the potential of circulating biomarkers for monitoring steatohepatitis and liver fibrosis in NAFLD. In these analyses, it was possible to observe the relevance of molecules such as TIMP-1, IL-8, MIG, IP-10, MCP-1 and RANTES for the follow-up of patients diagnosed with NAFLD, results that could provide the development of new algorithms for the clinical follow-up of patients with NAFLD.

Capítulo I

Revisão de Literatura

*Doença Hepática Gordurosa Não
Alcoólica (NAFLD)*

1. Introdução

A doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) é caracterizada pelo acúmulo de gordura em hepatócitos, sendo sua etiologia independente de fatores tais como etilismo e causas secundárias de esteatose hepática como infecção pelo vírus causador da hepatite C, utilização de drogas e toxinas, hipotireoidismo, doenças associadas à gestação e doenças intestinais^{1,2}. Esta enfermidade encontra-se em elevada prevalência principalmente em indivíduos acometidos pela obesidade e síndrome metabólica. A NAFLD abrange duas variações dentro de seu espectro: incluindo a doença hepática gordurosa (NAFL) e a esteato-hepatite não alcoólica (NASH)¹. Salienta-se sobre a proposta de mudança de nomenclatura de NAFLD para disfunção metabólica associada à doença gordurosa (MAFLD), a qual foi recomendada por especialistas. Além disso, destaca-se que a nova nomenclatura também contempla novos critérios de definição da doença, uma vez que a MAFLD tem é proposta como uma nova definição para a doença hepática gordurosa³. Contudo, salienta-se que esta terminologia ainda carece de um consenso para sua utilização segundo especialistas⁴ e também requer um maior esclarecimento a respeito das bases moleculares desta nova definição⁵.

Destaca-se que, enquanto a NAFL é definida pela presença de esteatose hepática não-inflamatória, a NASH difere-se por incluir tanto a esteatose como a presença de inflamação, sendo esta última indistinguível histologicamente da esteato-hepatite alcoólica¹.

Comparando-se os conceitos definidores da NAFLD e MAFLD, observa-se que a NAFLD se baseia em critérios de exclusão tais como: consumo de álcool ≥ 30 gramas/dia para homens e 20 gramas/dia para mulheres, diagnóstico de infecção por hepatites virais e outras causas relacionadas com doenças hepáticas crônicas. Por outro lado, a MAFLD foi proposta através de critérios de inclusão como: presença de sobrepeso/obesidade, diabetes mellitus do tipo 2 e disfunção metabólica. Adicionalmente, enfatiza-se que o diagnóstico de NASH requer a realização de biópsia hepática, enquanto que o diagnóstico da MAFLD independe do consumo de álcool e não requer a execução de biópsia hepática³. Dado ao foco deste estudo ter sido direcionado para a NAFLD e suas variações, as considerações a seguir serão destinadas para esta definição.

Ressalta-se que até o presente momento a NAFLD é considerada a primeira

causa de doença crônica hepática no mundo⁶. A NAFLD é caracterizada pelo acúmulo de gordura hepática, independentemente da presença ou não de inflamação. Por outro lado, a NAFL apresenta potencial de evoluir para NASH, sendo esta última associada com a presença de lesão hepatocitária, denominada “balonização” dos hepatócitos, além de apresentar inflamação e nível variado de fibrose hepática, cuja lesão eleva significativamente a probabilidade de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (CHC)⁶. Adicionalmente, denota-se que, no contexto da NAFLD, o risco de desenvolvimento de CHC independe da presença de cirrose estabelecida, fato este que difere de outras causas conhecidas de CHC, como hepatites virais, as quais apresentam risco elevado de desenvolvimento de CHC após o desenvolvimento da fibrose hepática avançada⁷.

A NAFLD apresenta como principais fatores de risco reversíveis a predisposição genética, os hábitos alimentares não saudáveis e a baixa frequência de atividades físicas. Neste contexto e considerando à ausência de tratamentos farmacológicos específicos para NAFLD, organizações como a Associação Europeia para o Estudo do Fígado (EASL), a Associação para o Estudo do Diabetes (EASD) e a Associação Europeia para o Estudo da Obesidade (EASO), recomendam que alterações de hábitos de vida sejam adotadas no sentido de promover a prevenção e a regressão da NAFLD. Segundo estas entidades, a promoção de um déficit calórico de 500-1000 kcal estaria relacionado com a perda de peso de 7-10% quando associado com dietas de baixo índice de gorduras, dietas cetogênicas e dietas com elevado percentual de proteínas associadas a exercícios aeróbicos, juntamente com exercícios físicos de resistência⁸.

2. Fisiopatologia

Progressivos avanços têm sido conquistados nos últimos tempos no que tange a uma melhor compreensão dos mecanismos de desenvolvimento da NAFLD. Em 1998, as primeiras hipóteses relacionadas aos fatores desencadeadores da NAFLD foram levantadas, sendo a presença de esteatose hepática considerada como o primeiro fator agressor e, a inflamação subsequente, a segunda causa, a qual poderá agravar o quadro de lesão para NASH⁹.

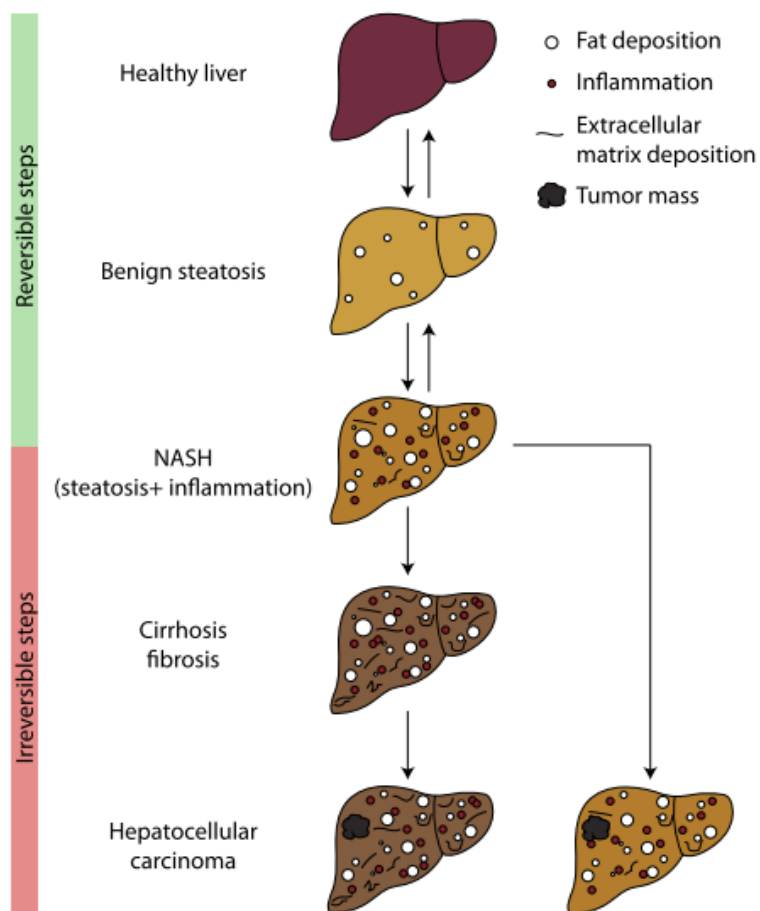
Sendo a diabetes mellitus tipo 2 uma comorbidade comum dentro do contexto da NAFLD, a sensibilidade à insulina passou a ser avaliada nos primeiros estudos deste agravo. Diante disto, a avaliação da dinâmica da resistência insulínica começou a ser estudada para fins de melhor compreensão de seu papel na NAFLD. Observou-se dois possíveis mecanismos que contribuem ao início da esteatose hepática. O primeiro foi relacionado ao processo de lipogênese hepática *de novo* e, o segundo, referente ao armazenamento ectópico de lipídios decorrente de dislipidemia sistêmica estabelecida pelo processo de lipólise no tecido adiposo. Uma vez atingido o limiar máximo de estocagem lipídica nos hepatócitos, gera-se um ambiente de lipotoxicidade, que por sua vez contribuirá para um desfecho de estresse hepatocelular e apoptose, posteriormente. Ainda ao nível celular, é notada que a sobrecarga de lipídios e a resistência insulínica afetam diretamente o retículo endoplasmático pelo estresse gerado, fato este que se relaciona com o processo conhecido como “não desdobramento de proteína” por esta organela. Assim sendo, a proteína de ligação X-box 1 (XBP1) atua no sentido de retomar a função normal da organela e promover a sobrevivência da célula. No entanto, na NAFLD este processo é falho e, conseqüentemente, gera-se estresse hepatocelular, inflamação, perda de sensibilidade insulínica e, por fim, apoptose⁹.

A evolução de esteatose hepática para NASH decorre-se principalmente do processo anteriormente citado, sendo os macrófagos residentes considerados os mediadores desta resposta inflamatória. Uma vez iniciada, estes mesmos macrófagos procederão com o recrutamento de outras células imunes da circulação sanguínea, com destaque também para monócitos circulantes que se diferenciarão em macrófagos no tecido hepático e, conseqüentemente, contribuirão para a amplificação da resposta inflamatória. Devido à permanência deste ciclo de propagação inflamatória de caráter crônico, inicia-se também a resposta de regeneração das

lesões hepáticas pelos macrófagos. Contudo, apesar desta resposta resolutive ser considerada positiva em quadros clínicos de inflamação aguda, em caso de cenário inflamatório crônico, o desfecho torna-se desfavorável, pois o tecido passa a ser preenchido em demasia por deposições de colágeno. Por fim, esse excessivo acúmulo de colágeno no fígado será o fator chave no desenvolvimento de fibrose nos estágios mais tardios de inflamação da NASH, podendo progredir para disfunção completa do órgão hepático⁹. Salienta-se que esta dinâmica ocorre devido à deposição de matriz extracelular no fígado que se baseia no equilíbrio entre a produção matriz extracelular e sua degradação. As células estreladas hepáticas (HSCs) diferenciam-se em miofibroblastos proliferativos e fibrogênicos, quando sob condições de inflamação crônica no fígado. No entanto, destaca-se que outras células também participam deste processo fibrogênico, tais como as células endoteliais e mesenquimais¹⁰.

Além do papel de células sentinelas exercido pelos macrófagos no tecido hepático, estes também são responsáveis por processos imunes efetores, os quais relacionam-se com a secreção de citocinas e quimiocinas, assunto este que será abordado mais a frente no que diz respeito às principais funções destas moléculas neste respectivo contexto⁹.

Figura 1 – Estágios de progressão da NAFLD⁹.



Fonte: Thibaut et al. (2022)

3. Epidemiologia

Estima-se que a NAFLD esteja presente em 31% da população da América Latina, com estudos de prevalências para países como o Brasil, Chile, México e Colômbia e percentuais de 35,2%, 23%, 17% e 26%, respectivamente. Os elevados percentuais de NAFLD reportados na região justificam-se pelos elevados índices de obesidade e diabetes mellitus tipo 2. De forma complementar, somam-se a estes fatores a baixa conscientização sobre a doença, bem como as elevadas desigualdades sociais e dificuldades dentro os sistemas de saúde destes países⁴. Adicionalmente, salienta-se que a presença de fibrose hepática está diretamente associada com complicações clínicas em pacientes acometidos pela NAFLD e, por consequência, relacionada ao pior prognóstico desta doença, cuja prevalência mundial é de aproximadamente 25%¹¹.

Estudo prévio reportou prevalência da NAFLD de 13% na África e 42% no sudeste asiático. Quanto à NASH, estima-se um aumento de até 56% entre 2016 e 2030 em países como China, França, Alemanha, Itália, Japão, Espanha, Reino Unido e Estados Unidos. Paralelamente, salienta-se o percentual de 0,5%-2,6% para CHC relacionado à NAFLD em pacientes que desenvolveram cirrose causada por NASH⁵. A prevalência global de NASH é estimada entre 3-5%. Deste percentual, aproximadamente 20% dos indivíduos desenvolvem cirrose e/ou CHC¹². Em obesos a prevalência de NASH já foi reportada entre 25-36%¹³. Estima-se que a sobrevida de 15 anos dos pacientes diagnosticados com fibrose avançada é de aproximadamente 51% para aqueles classificados com fibrose F3 e 28,4% para fibrose F4, classificações essas que serão discutidas posteriormente¹². Das comorbidades relacionadas à NASH, estudo prévio reportou percentuais para diabetes mellitus tipo 2 e hiperlipidemia de 34-75% e 20-80%, respectivamente¹³.

A NAFLD e a sua variação, NASH, atualmente encontram-se em taxas crescentes que caminham junto com o agravamento pandêmico da obesidade, com o diabetes mellitus tipo 2 e CHC. Relato prévio demonstrou que a prevalência da obesidade em indivíduos do sexo masculino adultos aumentou de 3,2% em 1975 para 10,8% em 2014. Este mesmo crescimento foi relatado para mulheres no mesmo período com um aumento de 6,4% para 14,9%. Caso este perfil de crescimento se mantenha, projeta-se que para homens este percentual atinja valores de 18% e, para mulheres, de até 21% até 2025. A população pediátrica encontra-se em situação de maior preocupação, uma vez que a prevalência de obesidade também foi elevada. Em 1975, observava-se um percentual de 0,7% de aumento da prevalência deste agravo em meninas, valor este que se elevou para 5,6% em 2016. Já o cenário entre meninos para o mesmo período demonstrou uma elevação de 0,9% para 7,8%. Neste contexto, destaca-se que a presença de esteatose hepática em crianças apresenta potencial de evoluir para NASH de forma mais rápida e severa do que em adultos. Por consequência, a presença do agravo na população infantil ainda aumenta o risco de desenvolvimento de cirrose e CHC durante a idade adulta¹⁴.

Em estudo anterior¹⁵, foi descrita a prevalência da NAFLD na população dos Estados Unidos entre diferentes grupos raciais e étnicos. A população hispânica foi reportada com a prevalência mais elevada para NAFLD e, subsequentemente, as populações brancas e pretas. Ressalta-se que estudos de prevalência de NAFLD apresentam resultados variados de acordo com o tipo de avaliação realizada no

paciente, podendo esta ser executada por métodos invasivos e não invasivos.

4. Biópsia Hepática no Estadiamento de Fibrose Hepática, Esteatose e NASH.

Em 2016, em comum consenso entre a EASL, EASD e EASO, foram publicadas as “Diretrizes de Práticas Clínicas para o acompanhamento da doença hepática não alcoólica”. A necessidade de execução da biópsia hepática para o diagnóstico da NASH é destacada como imprescindível, uma vez que, até o presente momento, apenas este exame é capaz de diferenciar a NAFL de NASH. Todavia, é lembrado sobre uma das limitações deste exame, como por exemplo a variabilidade amostral¹⁶. Por ser o procedimento considerado como padrão-ouro para a avaliação de fibrose hepática na NAFLD, especialistas consideram-no como o único método capaz de fornecer uma visualização direta da fibrose, uma vez que a obtenção de fragmento histológico não pode ser obtida através das demais metodologias. Além disso, foi descrito que apenas a biópsia hepática pode fornecer uma visão dinâmica da NASH e diferenciar estágios brandos de fibrose e atividade necro-inflamatória, sendo esta última altamente associada com a progressão da doença. Por outro lado, afirma-se que esta avaliação deve ser reservada para um grupo seletivo de pacientes, o qual necessita da realização do método padrão-ouro de forma imprescindível. Somado a este fato, destaca-se que demais metodologias definidoras do estadiamento de fibrose, incluindo as não-invasivas que serão abordadas a seguir, também partilham de um índice significativo de variabilidade de resultados, pois pesquisa anterior detectou que a biópsia hepática apresentou uma taxa de concordância com o exame não-invasivo de ressonância magnética de aproximadamente 90%¹⁷.

No estudo conduzido por Kleiner et al. (2005)¹⁸, foi proposto a classificação histológica das lesões da NAFLD em um escore denominado *NAFLD Activity Score* (NAS) baseado nas características da doença, tais como: presença de esteatose (0-3 pontos), inflamação lobular (0-3 pontos) e balonização (0-2 pontos). Pontuações do escore de 0-2 descartam NASH, 3-4 indicam alta probabilidade de acometimento pela NASH e valores maiores do que 5 indicam doença estabelecida. Em relação a classificação de fibrose, essa foi estabelecida no mesmo estudo citado anteriormente¹⁸, o qual caracteriza o nível das lesões de fibrose em uma escala de 0-4 (considerando os níveis mais leves de fibrose até a evolução para cirrose). O estágio

0 de fibrose é caracterizado por ausência de fibrose (F0), o estágio 1 por fibrose perisinusoidal ou periportal (F1), estágio 2 por fibrose perisinusoidal e portal/periportal (F2), estágio 3 por fibrose em ponte (F3) e estágio 4 por presença de cirrose (F4).

Ainda em relação à classificação histológica de NASH, Bedossa et al. (2014) descreveram em estudo mais recente¹⁹ a proposta de utilização do escore SAF (esteatose, atividade, fibrose) para obesos mórbidos, no qual através de diferentes pontuações para avaliação de cada característica das lesões, tornou-se possível reduzir a variabilidade de resultados entre observadores distintos no exame de biópsia hepática.

5. Método Não Invasivos para o Estadiamento de Fibrose Hepática

Paralelamente à biópsia hepática, há possibilidade de avaliação da NAFLD por metodologias não invasivas, úteis para identificação do risco de NAFLD entre indivíduos com risco metabólico elevado em serviços de saúde de atenção primária, como também para a identificação de pacientes com risco de evolução da doença em serviços de saúde de atenção secundária e terciária, de modo a reduzir a necessidade de execução da biópsia hepática¹⁶.

Dentre as metodologias de imagem não invasivas para a avaliação das intercorrências associadas à NAFLD, destacam-se o uso da ultrassonografia (US) para avaliação da esteatose hepática, metodologia considerada de baixo custo e que pode substituir a ressonância magnética, considerada padrão-ouro entre os exames não invasivos de imagem, mas que apresenta elevado custo para sua aplicação. Há também a possibilidade de utilização de elastografia transitória, cuja capacidade de detecção de fibrose avançada é elevada, porém esta apresenta reduzida performance em indivíduos com elevado índice de massa corporal¹⁶. Tamaki et al. (2022) demonstrou que a utilização de exames de ressonância magnética por meio da mensuração da fração de gordura em densidade protônica (PDFF) pode fornecer informações precisas sobre a regressão da fibrose hepática. Uma redução $\geq 30\%$ dos valores de PDFF estiveram associados com a melhora e regressão de fibrose em pacientes com NAFLD²⁰. Em outro estudo²¹, observou-se que exames de ressonância magnética e de elastografia de quantificação de ponto (SWE) apresentaram ao menos 80% de sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de fibrose avançada na NAFL, confirmando-se uma relevante acurácia diagnóstica dessas metodologias para

esta finalidade. Estudo similar²², descreveu as performances de metodologias de diagnóstico por imagem para detecção de fibrose avançada, sendo demonstrada *Area Under The ROC Curve* (AUROC) de 0,79 para identificação superior a fibrose F2 e AUROC de 0,93 para classificação de fibrose F4, quando utilizada a metodologia de elastografia transitória controlada por vibração (VCTE). Neste mesmo contexto, observou-se que a SWE apresentou AUROC de 0,9 para classificação de fibrose F4, enquanto que a elastografia por ressonância magnética (MRE) foi reportada com valores de performance de 0,92 para classificações de fibrose superiores a F3 e de 0,94 para a classificação de F4²².

Por outro lado, há também as metodologias baseadas em marcadores séricos que, além de serem mais aplicáveis para estudos de triagem de populações maiores, também já foram validadas em indivíduos obesos e saudáveis. Das metodologias já validadas para avaliação de esteatose hepática incluem-se: o Índice de Gordura Hepática (FLI), SteatoTest[®], e o escore de gordura hepática NAFLD. Destacam-se que tais metodologias se baseiam na avaliação da resistência insulínica dos pacientes e apresentam elevada capacidade de detecção da presença de esteatose, porém não de sua gravidade. Atualmente, não há metodologias não invasivas baseadas em marcadores séricos capazes de diferenciar a NASH da NAFL¹⁶.

No que tange à avaliação da fibrose hepática na NAFLD, destaca-se a necessidade de uma investigação clínica mais detalhada, visto que este desfecho clínico está diretamente associado com maior taxa de mortalidade. O uso de marcadores séricos não invasivos tem sido utilizado como ferramenta útil para avaliação de fibrose hepática na NAFLD, incluindo o Escore de Fibrose NAFLD (NFS), o calculador de fibrose 4 (FIB-4), o Teste Aprimorado de Fibrose Hepática (ELF) e FibroTest[®]. Salienta-se que tais testes são mais eficientes para distinguir fibrose avançada de fibrose leve. Desta forma, as “Diretrizes de Práticas Clínicas para o acompanhamento da doença hepática não alcoólica” são enfáticas em recomendar a utilização combinada das metodologias não invasivas, séricas e de imagem para fins de elevação da acurácia diagnóstica¹⁶.

Adicionalmente, destacam-se características de outras metodologias somadas às citadas anteriormente para a detecção de fibrose hepática na NAFLD que incluem: o índice *AST to Platelet Ratio Index* - APRI (exame que utiliza variáveis como aspartato aminotransferase (AST) e contagem de plaquetas, apresentando performance para detecção de fibrose avançada de AUROC de 0,70-0,79), o FIB-4

(que utiliza AST, alanina aminotransferase (ALT), contagem de plaquetas e idade, tendo AUROC para identificação de fibrose avançada de 0,80-0,85), o NFS (composto por variáveis como idade, índice de massa corporal (IMC), razão de glicemia de jejum prejudicada/diabetes, AST, ALT, plaquetas e albumina, com AUROC de 0,80-0,85 para identificação de fibrose avançada), *Escore Hepamet fibrosis* (composto pelas variáveis: idade, sexo, diabetes, glicemia, o índice “*Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*” (HOMA-IR), AST, albumina, plaquetas, sendo a AUROC para fibrose avançada de 0,78-0,92), FibroTest® (composto pelas variáveis: idade, sexo, bilirrubina, gama glutamil transferase (GGT), alfa 2-macroglobulina (α 2M), haptoglobina, apolipoproteína A-1 (Apo-A1) com AUROC para fibrose avançada variando de 0,80-0,85), Hepascore (elaborado com as variáveis: idade, sexo, bilirrubina, GGT, α 2M e ácido hialurônico (AH), com AUROC para fibrose avançada de 0,85-0,89), Fibrospect (delineado com as variáveis: α 2M, AH e inibidor 1 da metalopeptidase (TIMP-1) e AUROC para fibrose avançada de 0,85-0,89), FibroMeter (validado com as variáveis: idade, sexo, peso, plaquetas, ALT, AST, ferritina e glicose, com AUROC para fibrose avançada de 0,75-0,79) e *Enhanced liver fibrosis score* (composto pelas variáveis HA, TIMP-1 e nucleosídeo fosforilase 3 (PNPIII), com AUROC para fibrose avançada de 0,85-0,99), conforme demonstrado na Tabela 1²². Nota-se, portanto, que essas metodologias ainda necessitam ser aperfeiçoadas no sentido de se tornarem capazes de também avaliar outros níveis de fibrose, além do nível avançado.

Tabela 1– Descrição e performance de escores para a detecção de fibrose avançada na NAFLD.²²

<i>APRI</i>	AST, ALT e contagem de plaquetas	0,70-0,79
<i>FIB-4</i>	AST, ALT, idade e contagem de plaquetas	0,80-0,85
<i>NFS</i>	IMC, razão glicemia de jejum prejudicada/diabtes, AST, ALT, plaquetas e albumina	0,80-0,85
<i>Hepamet Fibrosis</i>	idade, sexo, diabetes, glicemia, HOMA-IR, AST, albumina e plaquetas	0,78-0,92
<i>Fibrotest®</i>	idade, sexo, bilirrubina, GGT, α 2M, haptoglobina, Apo-1	0,80-0,85
<i>Hepascore</i>	idade, sexo, bilirrubina, GGT, α 2M e ácido hialurônico	0,85-89
<i>Fibrospect</i>	α 2M, ácido hialurônico e TIMP-1	0,85-0,89

<i>Fibrometer</i>	idade, sexo, peso, plaquetas, ALT, AST, ferritina e glicose	0,75-0,79
<i>Enhanced liver fibrosis Score</i>	ácido hialurônico, TIMP-1 e PNPIII	0,85-0,99

A aplicação e avaliação de técnicas por *machine learning* têm sido uma estratégia aplicada por diversos estudos no contexto da NAFLD²³⁻²⁵. Esta abordagem tem sido utilizada tanto para a avaliação da exclusão de NAFLD em paciente em geral, como também para prever o nível de fibrose decorrente deste agravo^{23,24}. Chang et al. (2022) demonstraram que abordagens baseadas nesta metodologia apresentam performance superior à outras metodologias como elastografia, FIB-4 e NFS, sugerindo que essas podem ser eficazmente utilizadas na clínica para avaliação de fibrose avançada e cirrose em paciente com NAFLD²⁵.

6. Citocinas, Quimiocinas e TIMPs

Entre as estratégias para a expansão do conhecimento em relação à NAFLD, destaca-se o estudo da inflamação crônica relacionada a este agravo²⁶. Neste aspecto, o sistema imune configura-se como fator relevante na patogênese tanto da NAFL como da NASH. Por mais que este processo não tenha sido completamente esclarecido, reconhece-se na literatura a influência de citocinas séricas, cujo desequilíbrio pode implicar diretamente no prognóstico destas enfermidades¹. O estudo referente ao papel das citocinas e quimiocinas solúveis, moléculas essas que fazem parte da regulação inflamatória celular, apresenta elevado potencial de contribuir para novas descobertas em relação à NAFLD. Essas proteínas solúveis, que promovem comunicação intercelular, são produzidas por diferentes células, estando essas também presentes no tecido hepático. As citocinas são subdivididas em subfamílias que incluem os interferons, interleucinas, fator de necrose tumoral (TNF), fatores de crescimento transformador (TGF), fatores estimuladores de colônia e quimiocinas. Denota-se que em condições fisiológicas, a produção de citocinas no fígado é encontrada em baixos níveis ou pode estar ausente. No entanto, o acúmulo de gordura hepática promove estímulos às células teciduais, que por sua vez, iniciam a produção destes mediadores inflamatórios. Consequentemente, este estímulo crônico poderá favorecer a danos teciduais como necrose, apoptose e/ou desenvolvimento de fibrose hepática. Por outro lado, estas moléculas também são

consideradas essenciais para o início da resposta regenerativa hepática²⁶.

Diante do papel de destaque desempenhado pelas quimiocinas na NAFLD, ressalta-se que essas são responsáveis não somente pelo recrutamento de células imune durante o processo inflamatório, também atuam na atração de células imunes pertencentes à imunidade inata durante a homeostasia, como também são capazes de modular a função de outras células que não fazem parte do sistema imune, como por exemplo, as HSCs²⁷. Além disso, aponta-se que essas moléculas também desempenham papéis pró-oxidativos relevantes para o processo patogênico da NAFLD²⁸.

Dentre as principais citocinas, destacam-se TNF- α , TGF- β , interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10) e quimiocinas como CCL2/MCP-1 (do inglês *chemokine (C-C motif) ligand 2 - monocyte chemoattractant protein 1*), CCL5/RANTES (do inglês *chemokine (C-C motif) ligand 5 - regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*), CXCL8/IL-8 (do inglês *chemokine (C-X-C motif ligand 8 - interleukin 8)*), CXCL9/MIG (do inglês *chemokine (C-X-C motif) ligand 9 - monokine induced by gamma interferon*), CXCL10/IP-10 (do inglês *C-X-C motif chemokine ligand 10 - interferon gamma-induced protein 10*), entre outras ^{26,27}.

O TNF- α consiste em um mediador inflamatório secretado por células como monócitos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos T. No fígado, é produzido diretamente pelos hepatócitos e pelas células de Kupffer ou também de forma indireta pelo tecido gorduroso abdominal. Um dos efeitos do TNF- α associa-se com a indução de inflamação e desenvolvimento de resistência insulínica. Além disto, níveis elevados estão diretamente envolvidos com lesões mais avançadas de fibrose hepática em paciente com NASH²⁶.

A TGF- β é uma citocina/fator de crescimento anti-inflamatório e que apresenta propriedades pró-fibróticas. No tecido hepático é secretada por células do sistema imune, HSCs e células epiteliais. Uma vez produzida por células de Kupffer e HSCs, esta molécula induz a diferenciação das HSCs em miofibroblastos. Têm sido reportados níveis mais elevados de TGF- β em pacientes com NASH quando comparados aos pacientes com apenas NAFL²⁶.

No que diz respeito à IL-6, esta citocina é capaz de ativar diferentes tipos celulares tais como células imunes, hepatócitos, células-tronco hematopoiéticas e osteoclastos e exercer diferentes funções, dada sua característica pleiotrópica.

Destaca-se o papel fundamental durante a resposta inflamatória de fase aguda. Além disso, essa citocina tem ação hepatoprotetora, pois reduz o estresse oxidativo no fígado. Neste cenário, a IL-6 mostrou-se capaz de ampliar a regeneração hepática, mas também tem sido associada com atividades deletérias como promover o estímulo de apoptose nos hepatócitos, induzir à resistência insulínica e também exercer papel chave no desenvolvimento da NASH²⁶.

A IL-10 é classificada como uma interleucina anti-inflamatória, responsável pela regulação do nível de inflamação em diferentes órgãos e tecidos, seja em condições fisiológicas ou patológicas. Sua atividade é capaz de inibir a atividade de linfócitos T, monócitos e macrófagos. No fígado, já foi encontrada em células como hepatócitos e HSCs. Correlações inversamente proporcionais entre os níveis dessa citocina já foram descritos em relação à síndrome metabólica em mulheres obesas, o que corroborou para a descrição da IL-10 como citocina protetora para paciente com este tipo de síndrome e que são afetados pela NAFLD²⁶.

Entre as funções atribuídas às quimiocinas no contexto da NAFLD destaca-se a CCL2/MCP-1, molécula quimioatraente secretada por macrófagos, células endoteliais, células musculares lisas e HSCs. Um dos alvos principais desta quimiocina são os macrófagos, os quais tornam-se ativados através de seus receptores CCR2. Relatos prévios demonstram redução do armazenamento de gordura hepática em ratos alimentados com dietas ricas em gordura e que não apresentavam os genes CCL2 e CCR2. Além disso, foi reportado altos níveis de CCL2 nestes animais. Deste modo, estudos que visam a inibição da CCL2 têm sido realizados no sentido de promover o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que possam reduzir a obesidade, a NAFLD e a inflamação no tecido gorduroso. Estudos realizados em humanos também correlacionaram positivamente elevados níveis de CCL2 com o acúmulo de gordura hepática em paciente acometidos pela NAFLD²⁶. Em outra pesquisa²⁸ realizada com pacientes diagnosticados com NAFLD, observou-se que níveis elevados de CCL2 estiveram associados com disfunções metabólicas durante o desenvolvimento de NASH, bem como contribuiu para o acúmulo de lipídios nos hepatócitos. A hipótese deste processo foi atribuída ao fato de que CCL2 e seus receptores estariam presentes em níveis elevados no fígado e, deste modo, acarretariam em acúmulo de macrófagos tanto no fígado como no tecido adiposo, favorecendo ao desenvolvimento de esteatose, hepatite e fibrose.

A CCL5/RANTES consiste em uma quimiocina presente em diversas doenças

crônico-inflamatórias como aterosclerose, infarto agudo do miocárdio, miocardite, artrite reumatóide e esclerose múltipla. Esta molécula é secretada por células endoteliais, células musculares lisas, macrófagos e HSCs. Sua função atribui-se principalmente à migração de linfócitos T, monócitos, neutrófilos e células dendríticas, sendo CCR1, CCR3 e CCR5 seus receptores ligantes. Este último receptor já foi identificado principalmente em HSCs, sendo estas células um dos principais alvos da CCL5/RANTES. No contexto da NAFLD, esta citocina é elevada principalmente pela presença de acúmulo de gordura e também está relacionada com a progressão da fibrose hepática, segundo pesquisa anterior realizada tanto com ratos com humanos^{29,30}. Estudos experimentais têm demonstrado o potencial da inibição da atividade desta citocina para fins de redução da fibrose hepática na NAFLD²⁶.

Outra quimiocina com papel de destaque no contexto fisiopatológico da NAFLD é a CXCL8/IL-8, produzida por células inflamatórias e endoteliais. Sua função relaciona-se principalmente em promover o recrutamento de neutrófilos em tecidos com presença de inflamação. Estudos demonstraram níveis mais elevados de CXCL8 em indivíduos com NASH quando comparados com pacientes diagnosticados somente com esteatose hepática ou indivíduos saudáveis. Adicionalmente, esta quimiocina já foi reportada com níveis mais elevados em pacientes obesos em comparação a não obesos²⁶. A CXCL8 também tem sido associada com propriedades tumorigênicas e angiogênicas em relação ao câncer. Níveis elevados desta quimiocina já foram associados com progressões mais rápidas de CHC³¹.

Demais quimiocinas como CXCL9/MIG e CXL10/IP-10 partilham o receptor CXCR3 como alvo. Este receptor está presente em níveis elevados em células *natural killer* (NK), bem como em linfócitos T, sendo estas células quimioatraídas pela ação de CXCL9/MIG e CXL10/IP-10. Ademais, CXCL9/MIG já foi identificada em elevados níveis em pacientes acometidos por NASH²⁶. Níveis elevados de CXCR3 já foram observados em tecidos hepáticos de pacientes com NAFLD, sendo que o bloqueio deste receptor foi capaz reverter a esteato-hepatite instalada³¹.

De maneira em geral, pouco se conhece acerca do papel de citocinas e quimiocinas no contexto NAFLD. Ainda que estratégias terapêuticas tenham sido abordadas em relação à inibição de alguma destas moléculas, mais estudos se fazem necessários para que estas abordagens se tornem aprovadas para uso clínico²⁶.

As metaloproteinases de matriz (MMPs) consistem em moléculas pertencentes à família das endopeptidases e apresentam importante papel no que tange à

remodelação da matriz extracelular. Por outro lado, os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) também atuam de forma importante junto às MMPs no contexto patofisiológico do desenvolvimento de fibrose hepática e cirrose¹³. Diante disto, a participação destas moléculas na fibrogênese decorrente de NASH ocorre principalmente devido ao desequilíbrio entre a degradação de matriz extracelular pelas MMPs e a inibição das atividades destas, resultando em um acúmulo das fibras de colágeno no fígado¹⁰. A produção destas moléculas provém de HSCs, células endoteliais sinusoidais e células de Kupffer³².

Estudos pregressos demonstraram que indivíduos acometidos pela NAFLD apresentaram alterações em biomarcadores relacionados à fibrose hepática e à remodelação da matriz extracelular. Foram reportados níveis elevados de TIMP-1 em pacientes com fibrose hepática significativa, porém foi exposto que este marcador não foi capaz de distinguir NAFL de NASH, sugerindo que a quantificação de TIMP-1 poderia contribuir para a predição da progressão da fibrose hepática. Assim sendo, estratégias que visem TIMP-1 como alvo terapêutico podem se tornar relevantes para o avanço do tratamento de lesões hepáticas relacionadas à fibrose³³. A TIMP-2 juntamente com a MMP-2 também já foram associadas com atividade fibrótica, tendo sido correlacionadas com baixa atividade fibrogênica quando encontradas em níveis normais³².

7. Células do Sistema Imune no Contexto da NAFLD

As células dendríticas (DCs) já foram descritas como atuantes no processo de desenvolvimento de fibrose hepática na NAFLD. Elas são estimuladas pelo acúmulo de lipídios que, subsequentemente, ativa a produção de citocinas pró-inflamatórias. As DCs do fígado representam uma população heterogênea de células sinusoidais hepáticas apresentadoras de antígeno. Localizam-se no espaço periportal e pericentral do órgão, constituindo aproximadamente 1% das células não parenquimatosas. São conhecidas pela sua capacidade de produzir citocinas, além de serem capazes de migrar, característica essa que as distingue das células de Kupffer, outras importantes apresentadoras de antígenos no órgão³⁴.

As DCs hepáticas são caracterizadas por expressarem o marcador CD45 juntamente com elevada expressão do complexo principal de histocompatibilidade classe II. Podem ser classificadas em subgrupos que incluem principalmente: as

células dendríticas mieloides e plasmocitoides. Enquanto as DCs mieloides localizam-se na região periportal e em veias centrais, as plasmocitoides estão inseridas no parênquima hepático. Destaca-se que as DCs se tornam ativadas após a liberação de citocinas pelas células NKT e então migram de tecidos periféricos para os órgãos linfóides. As DCs então apresentam antígenos para os linfócitos T através de diferentes complexos principais de histocompatibilidade, passando a ativar linfócitos T *helper* CD4⁺ e T citotóxicos CD8⁺³⁴.

A participação das DCs no contexto da NAFLD tem sido associada à regulação da quantidade de células envolvidas no desenvolvimento da fibrose hepática (ex: linfócitos T CD8⁺ e células *natural killer*), bem como com a atividade destas células. Além disso, tem-se atribuído a participação das DCs no processo de remodelação da matriz extracelular, pois as células responsáveis por este processo também apresentam uma relação ontogenênica com as DCs. Enquanto mantidas em estado normal, as DCs são classificadas como imaturas e tolerogênicas. No entanto, após a exposição à inflamação crônica, estas células amadurecem para um perfil de células pró-inflamatórias, o que contribui para o recrutamento de monócitos e a ativação das HSCs. Em suma, as DCs desempenham relevante papel no contexto da NAFLD, pois relatos demonstraram que a redução quantitativa destas células reduz a agressividade da NASH, conferindo-lhes, portanto, um perfil regulador na NASH³⁴.

Além das DCs, destaca-se que a imunidade hepática está envolvida tanto com a imunidade inata como com adaptativa. Além das células citadas, também reconhece-se no contexto da NAFLD a participação de outras células como as T reguladoras (Tregs), T invariáveis associadas à mucosa (MAIT) e células T $\gamma\delta$ ^{35,36}.

Em relação às células imunes envolvidas na imunidade hepática na NAFLD, destaca-se o papel dos linfócitos T CD4⁺ no que diz respeito à desregulação do metabolismo lipídico. Estudo anterior demonstrou que dietas ricas em calorias e gorduras causaram proliferação de linfócitos T CD4⁺ e células T de memória em ratos imunodeficientes que receberam enxerto de células humanas, fato este que esteve associado com elevação significativa de citocinas pró-inflamatórias como IL-17A e IFN- γ ³⁵. Diante disto, ressalta-se a função moduladora dos linfócitos T CD4⁺, podendo estes se polarizem em subgrupos distintos como Th1, Th2 e Th17. Estas células também são consideradas suscetíveis à lipotoxicidade proveniente do acúmulo de gordura no tecido hepático, que por sua vez faz com que estas passem a produzir espécies reativas de oxigênio (ROS), propiciando também à perda de células CD4⁺

intra-hepáticas, conhecidas como células Treg especiais. Salienta-se também que, quando se diferenciam em perfil Th1, estas células contribuem para a promoção da resistência insulínica e inflamação do tecido adiposo. Por outro lado, quando se polarizam para o perfil Th2, esses desfechos clínicos previamente citados podem ser atenuados. Por fim, ressalta-se que em pacientes com NAFLD e escore NAS elevado foi encontrado aumento de células de memória e redução de células *naive* na circulação periférica³⁷.

Já os linfócitos T CD8+ foram observados em níveis mais elevados em pacientes com NASH e cirrose e, paralelamente, notou-se que este achado esteve correlacionado positivamente com a ativação de HSCs, devido à maior expressão da proteína α -actina do músculo liso (α -SMA). Em contrapartida, a redução de células T CD8+ no fígado esteve correlacionada com a redução da inflamação hepática, bem como a diminuição da ativação de HSCs³⁵.

O papel das células NK na NAFLD é descrito pela contribuição destas com a produção de citocinas pró-inflamatórias como interferon- γ e TNF, sendo que no fígado estas células compreendem mais de 30% do total de linfócitos. Essas células são capazes de eliminar HSCs, contribuindo para reduzir o processo de desenvolvimento de fibrose hepática³⁶. Adicionalmente, as células NK têm sido observadas em quantidade reduzida em pacientes com NAFLD quando comparado com pacientes controles³⁷.

Células CD3+ intra-hepáticas foram correlacionadas positivamente com o nível de fibrose aferido por elastografia, sugerindo a participação efetiva de células T na regulação do processo de fibrose hepática. Todavia, estudo anterior não identificou associação do quantitativo destas células entre o ambiente intra-hepático e a circulação³⁶.

Demais células do sistema imune como monócitos e granulócitos também apresentam participação na NASH. Destacam-se os neutrófilos como as células mais abundantes que se encontram presentes em amostras de biópsia hepática com característica inflamatória. Dentre os monócitos, aqueles classificados como clássicos são os mais preponderantes na corrente sanguínea, podendo migrar e infiltrar em diferentes tecidos e diferenciando-se em macrófagos. Além destes, outras duas subpopulações estão presentes no sangue, os monócitos não clássicos e intermediários. Relata-se que já foram encontrados níveis elevados de monócitos periféricos no sangue de pacientes com NAFLD. Estas células podem se tornar

ativadas por endotoxinas presentes no intestino e por hepatócitos lipoapoptóticos, aos quais elevam a inflamação e o dano hepático presente durante a progressão da NASH. Adicionalmente, já foi descrito que alterações em monócitos periféricos podem estar associadas com desequilíbrios metabólicos e imunes que ocorrem na progressão da NASH. Exemplo deste fato foi descrito em estudo chinês, onde a diferenciação de monócitos para o perfil intermediário ou não clássico esteve correlacionada com o nível de esteatose hepática, com a relação cintura-quadril e glicemia de jejum³⁷.

8. Conclusão

A NAFLD e suas variações, como NAFL e NASH, têm sido objetivo-alvo de pesquisa no campo da hepatologia. Apesar do novo conceito da doença estar sendo transferido para MAFLD, esta definição ainda exigirá mais dados de pesquisa para que seja amplamente difundida nos meios científicos. Por outro lado, os dados referentes à NAFLD têm se mostrado alarmantes, uma vez que o cenário epidemiológico de prevalência do agravo já corresponde a 25% da população, aproximadamente. Para fins de reversão deste cenário, as medidas não farmacológicas como a promoção de hábitos alimentares saudáveis, bem como a prática de exercícios físicos têm se colocado como estratégias mais efetivas até o presente momento, pois ainda não foram aprovados medicamentos específicos para NAFLD, apesar do avanço das pesquisas científicas.

O exame de biópsia hepática continua sendo considerado a avaliação padrão-ouro na investigação de NASH, porém seu elevado custo e as desvantagens aqui citadas implicam na necessidade de desenvolvimento de novas ferramentas de avaliação das lesões hepáticas inerentes do avanço da NAFLD e que possam, desde que validadas, reduzir a necessidade de realização deste exame invasivo e ampliar as opções não invasivas aplicáveis ao monitoramento da doença. Dentre as alternativas citadas destacam-se as metodologias não invasivas baseadas em diagnóstico por imagem e em biomarcadores séricos, bem como em atributos tais como idade e sexo, por exemplo. Grandes avanços foram conquistados com o desenvolvimento de novos algoritmos e fórmulas que possam prever lesões associadas à NAFLD. Contudo, a utilização destes na prática clínica continua sendo

um desafio, visto as dificuldades destas técnicas em ter o mesmo poder discriminatório das lesões hepáticas que já se tem com a realização da biópsia hepática.

Diante disto, cada vez mais estudos têm avaliado variáveis associadas à fisiopatologia da NAFLD no sentido de caracterizar novos marcadores que possam auxiliar na classificação das lesões hepáticas. Dentre estas variáveis em constante estudo, destacam-se pelo papel biológico exercido por citocinas, quimiocinas e diferentes células do sistema imune. De forma suplementar, abordagens inovadoras utilizando técnicas de *machine learning* têm sido empregadas com o intuito de alavancar a performance destas metodologias não invasivas, aumentando o poder preditivo.

Assim sendo, conclui-se que o avanço no desenvolvimento de novas ferramentas não invasivas para avaliação de lesões hepáticas decorrentes da NAFLD se faz essencial para que pacientes possam ser avaliados de maneira cada vez mais otimizada, de forma a reduzir a necessidade de execução do exame de avaliação invasivo, porém sem reduzir a eficácia desta avaliação tão importante para o diagnóstico preciso e para a decisão terapêutica personalizada direcionada aos indivíduos acometidos por este agravo.

Neste sentido, o Capítulo II deste trabalho que será apresentado a seguir apresenta como proposta a publicação de um artigo científico, cujos dados refletem em novas perspectivas no que tange à avaliação de biomarcadores circulantes para o monitoramento da esteato-hepatite e fibrose hepática na NAFLD. Os achados do referido trabalho utilizam como referência o estado da arte mencionado nesta revisão literária no que tange ao atual contexto em que a NAFLD se encontra. Através de análises de biomarcadores circulantes aqui citados, como células do sistema imune, enzimas hepáticas, quimiocinas, TIMPs e avaliação de algoritmos preditores de lesão hepática, buscou-se fornecer novos conhecimentos sobre estas variáveis, de modo a ampliar o conhecimento já adquirido para doença, como também corroborar com o desenvolvimento de novas metodologias diagnósticas para as lesões hepáticas inerentes da NAFLD.

9. Referências

1. Hadinia A, Doustimotlagh AH, Goodarzi HR, et al. Circulating levels of pro-inflammatory cytokines in patients with nonalcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Iran J Immunol* 2019; 16: 327–333.
2. Liebe R, Esposito I, Bock HH, et al. Diagnosis and management of secondary causes of steatohepatitis. *J Hepatol* 2021; 74: 1455–1471.
3. Kawaguchi T, Tsutsumi T, Nakano D, et al. MAFLD: Renovation of clinical practice and disease awareness of fatty liver. *Hepatol Res* 2022; 52: 422–432.
4. Arab JP, Díaz LA, Dirchwolf M, et al. NAFLD: Challenges and opportunities to address the public health problem in Latin America. *Ann Hepatol* 2021; 24: 100359.
5. Huang DQ, El-Serag HB, Loomba R. Global epidemiology of NAFLD-related HCC: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2021; 18: 223–238.
6. Lambrecht J, Tacke F. Controversies and Opportunities in the Use of Inflammatory Markers for Diagnosis or Risk Prediction in Fatty Liver Disease. *Front Immunol* 2021; 11: 1–10.
7. Bengtsson B, Stål P, Wahlin S, et al. Characteristics and outcome of hepatocellular carcinoma in patients with NAFLD without cirrhosis. *Liver Int* 2019; 39: 1098–1108.
8. El-Agroudy NN, Kurzbach A, Rodionov RN, et al. Are Lifestyle Therapies Effective for NAFLD Treatment? *Trends Endocrinol Metab* 2019; 30: 701–709.
9. Thibaut R, Gage MC, Pineda-Torra I, et al. Liver macrophages and inflammation in physiology and physiopathology of non-alcoholic fatty liver disease. *FEBS J* 2022; 289: 3024–3057.
10. Okazaki I, Noro T, Tsutsui N, et al. Fibrogenesis and Carcinogenesis in Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH): Involvement of Matrix Metalloproteinases (MMPs) and

- Tissue Inhibitors of Metalloproteinase (TIMPs). *Cancers (Basel)* 2014; 6: 1220–1255.
11. Barros BSV, Monteiro FC, Terra C, et al. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and its associated factors in individuals with type 1 diabetes: a cross-sectional study in a tertiary care center in Brazil. *Diabetol Metab Syndr* 2021; 13: 33.
 12. Povsic M, Wong OY, Perry R, et al. A Structured Literature Review of the Epidemiology and Disease Burden of Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH). *Adv Ther* 2019; 36: 1574–1594.
 13. Akyol T, Tanoglu A, Yazgan Y, et al. Serum Matrix Metalloproteinase-9 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Expression in Patients with Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Dis Mol Med* 2015; 3: 11.
 14. Araújo AR, Rosso N, Bedogni G, et al. Global epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: What we need in the future. *Liver Int* 2018; 38: 47–51.
 15. Yip TC, Vilar-Gomez E, Petta S, et al. Geographical similarity and differences in the burden and genetic predisposition of <scp>NAFLD</scp>. *Hepatology* 2022; 1–15.
 16. Marchesini G, Day CP, Dufour JF, et al. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2016; 64: 1388–1402.
 17. Berger D, Desai V, Janardhan S. Con: Liver Biopsy Remains the Gold Standard to Evaluate Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Liver Dis* 2019; 13: 114–116.
 18. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 41: 1313–1321.
 19. Bedossa P, Burt AA, Gouw AHA, et al. Utility and appropriateness of the fatty liver inhibition of progression (FLIP) algorithm and steatosis, activity, and fibrosis (SAF)

- score in the evaluation of biopsies of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2014; 60: 565–575.
20. Tamaki N, Ajmera V, Loomba R. Non-invasive methods for imaging hepatic steatosis and their clinical importance in NAFLD. *Nat Rev Endocrinol* 2022; 18: 55–66.
 21. Selvaraj EA, Mózes FE, Jayaswal ANA, et al. Diagnostic accuracy of elastography and magnetic resonance imaging in patients with NAFLD: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* 2021; 75: 770–785.
 22. Lonardo A, Arab JP, Arrese M. Perspectives on Precision Medicine Approaches to NAFLD Diagnosis and Management. *Adv Ther* 2021; 38: 2130–2158.
 23. Feng G, Zheng KI, Li YY, et al. Machine learning algorithm outperforms fibrosis markers in predicting significant fibrosis in biopsy-confirmed NAFLD. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2021; 28: 593–603.
 24. Yip TCF, Ma AJ, Wong VW-S, et al. Laboratory parameter-based machine learning model for excluding non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in the general population. *Aliment Pharmacol Ther* 2017; 46: 447–456.
 25. Chang D, Truong E, Mena EA, et al. Machine learning models are superior to noninvasive tests in identifying clinically significant stages of <scp>NAFLD</scp> and <scp>NAFLD</scp>-related cirrhosis. *Hepatology* 2022; 1–12.
 26. Brauersreuther V, Viviani GL, Mach F, et al. Role of cytokines and chemokines in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 727–735.
 27. Nagata N, Chen G, Xu L, et al. An Update on the Chemokine System in the Development of NAFLD. *Med* 2022; 58: 1–10.
 28. Pan X, Chiwanda Kaminga A, Liu A, et al. Chemokines in Non-alcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Front Immunol* 2020; 11: 1–11.

29. Desai MS, Mariscalco MM, Tawil A, et al. Atherogenic diet-induced hepatitis is partially dependent on murine TLR4. *J Leukoc Biol* 2008; 83: 1336–1344.
30. Wu H, Ghosh S, Perrard XD, et al. T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity. *Circulation* 2007; 115: 1029–1038.
31. Chen W, Zhang J, Fan H-N, et al. Function and therapeutic advances of chemokine and its receptor in nonalcoholic fatty liver disease. *Therap Adv Gastroenterol* 2018; 11: 175628481881518.
32. Trojanek JB, Michałkiewicz J, Grzywa-Czuba R, et al. Expression of Matrix Metalloproteinases and Their Tissue Inhibitors in Peripheral Blood Leukocytes and Plasma of Children with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Mediators Inflamm* 2020; 2020: 1–14.
33. Yilmaz Y, Eren F. Serum biomarkers of fibrosis and extracellular matrix remodeling in patients with nonalcoholic fatty liver disease: association with liver histology. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2019; 31: 43–46.
34. Almeda-Valdes P, Aguilar Olivos NE, Barranco-Fragoso B, et al. The role of dendritic cells in fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver disease. *Biomed Res Int*; 2015. Epub ahead of print 2015. DOI: 10.1155/2015/768071.
35. Zhang C, Yang M. Targeting T Cell Subtypes for NAFLD and NAFLD-Related HCC Treatment: An Opinion. *Front Med* 2021; 8: 1–7.
36. Diedrich T, Kummer S, Galante A, et al. Characterization of the immune cell landscape of patients with NAFLD. *PLoS One* 2020; 15: e0230307.
37. Lin S-Z, Fan J-G. Peripheral immune cells in NAFLD patients: A spyhole to disease progression. *eBioMedicine* 2022; 75: 103768.

Capítulo II

Artigo

Evaluation of circulating biomarkers for monitoring steatohepatitis and fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease

Revista Sugerida: Clinical and Experimental Medicine

Fator de impacto: 5.057 (Qualis A2 – Medicina II)

Evaluation of circulating biomarkers for monitoring steatohepatitis and fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease

Rodrigo Santos Lima^{1;5*}, Aline Márcia Marques Braz^{2;5}, Francielle Ramalho Rocha^{2;5}, Rafael Plana Simões^{3,4}, Guilherme Targino Valente⁶, Guilherme Batista dos Santos⁵, Giovanni Faria Silva^{1,4;5*}, Márcjorie de Assis Golim^{2;4;5**}, Rejane Maria Tommasini Grotto^{1;3;4**}

1 Graduate Program in Pathology, Department of Pathology, Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo State, Brazil

2 Flow Cytometry Laboratory, Applied Biotechnology Laboratory - LBA, Clinical Hospital of Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo State, Brazil

3 Department of Biotechnology and Bioprocess Engineering, Faculty of Agronomic Sciences, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil.

4 Graduate Program in Research and Development (Medical Biotechnology), Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo State, Brazil.

5 Clinical Hospital of Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo State, Brazil

6 Max Planck Institute, Department of Bioinformatics, Bad Nauheim, Germany.

*Corresponding author

Rodrigo Santos Lima - ORCID: 0000-0002-7733-7424

Flow Cytometry Laboratory, Applied Biotechnology Laboratory, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil.
Address: Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro, s/n - UNESP - Botucatu, SP - Brasil E-mail: rodrigo.s.lima@unesp.br Phone: +5518981290156.

** These authors also contributed to the intellectual mentoring of this study.

Declarations

Funding: Grant FAPESP 2017/07711-0 São Paulo Research Foundation (FAPESP). Funding also provided by the National Council for Science and Technology (CNPq), process number 141116/2019-6.

Conflicts of interest/Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Ethics approval: This study was approved by the Research Ethics Committee of Botucatu Medical

School, UNESP (protocol nº 52621921.0.0000.5411).

Consent to participate: All the included patients signed the informed consent form.

Consent for publication: Not applicable.

Availability of data and material: The data here presented are available to consult with the corresponding author.

Code availability: Not applicable.

Acknowledgments: We would like to thank the Brazilian agencies FAPESP and CNPq for the funding in this research.

Authors' contributions

Conceptualization: Rodrigo Santos Lima, Rejane Maria Tommasini Grotto, Márjorie de Assis Golim, Aline Márcia Marques Braz and Giovanni Faria Silva.

Data curation: Rodrigo Santos Lima, Rejane Maria Tommasini Grotto, Márjorie de Assis Golim, Aline Márcia Marques Braz, Francielle Ramalho Rocha, Rafael Plana Simões, Guilherme Targino Valente and Guilherme Batista dos Santos.

Formal analysis: Rodrigo Santos Lima, Rejane Maria Tommasini Grotto, Márjorie de Assis Golim and Aline Márcia Marques Braz.

Investigation: Rodrigo Santos Lima, Rejane Maria Tommasini Grotto, Márjorie de Assis Golim, Aline Márcia Marques Braz and Giovanni Faria Silva.

Methodology: Rodrigo Santos Lima, Rejane Maria Tommasini Grotto, Márjorie de Assis Golim, Aline Márcia Marques Braz, Rafael Plana Simões and Guilherme Targino Valente.

Supervision: Rejane Maria Tommasini Grotto and Márjorie de Assis Golim.

Writing – original draft: Rodrigo Santos Lima, Rejane Maria Tommasini Grotto, Márjorie de Assis Golim and Aline Márcia Marques Braz.

Writing – review and editing: Rodrigo Santos Lima, Rejane Maria Tommasini Grotto, Márjorie de Assis Golim, Aline Márcia Marques Braz, Francielle Ramalho Rocha, Rafael Plana Simões, Guilherme Targino Valente, Giovanni Faria Silva and Guilherme Batista dos Santos.

Abstract

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is characterized by the accumulation of fat in hepatocytes and its cause is independent of alcohol abuse. NAFLD is found in high prevalence affected by obesity and metabolic syndrome. The disease encompasses two variations within its spectrum: fatty liver disease (NAFL) and non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Liver biopsy for the diagnosis of NASH is the gold standard, once this method is the only capable of differentiating NAFL from NASH. The evaluation of NAFLD lesions by non-invasive methodologies has been studied as a strategy to overcome liver biopsy limitations. The present study aimed to evaluate new variables based on blood biomarkers in order to provide new strategies to predict and/or associate with NAFLD lesions. The study included 94 analyzed patients (Groups - NASH: 79; Steatosis: 6, Control: 9). In the NASH group, patients were stratified according to the fibrosis level in a scale F0-F4 (F0:22, F1:12, F2:11, F3:18, F4:16). The following data were collected: results of biochemical tests, histopathological tests (liver biopsy) and results of imaging tests such as ultrasound. Whole blood samples were collected for the evaluation of cellular immunophenotyping and cytokine/chemokine/TIMP measurements. Chemokines such as IL-8, MCP-1, MIG, RANTES and IP-10 demonstrated important potential to be evaluated as blood biomarkers of early identification of steatosis with risk of progression to NASH.

Keywords: NAFLD, NAFL, NASH, liver biopsy, blood biomarkers, chemokines.

1. Introduction

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is characterized by the accumulation of fat in hepatocytes and its cause is independent of factors such as alcohol abuse, including other secondary causes of hepatic steatosis including infection by hepatitis C virus, use of drugs and toxins, hypothyroidism, diseases associated with pregnancy and intestinal diseases^{1,2}. This disease is found in high prevalence mainly in individuals affected by obesity and metabolic syndrome. NAFLD encompasses two variations within its spectrum: including fatty liver disease (NAFL) and non-alcoholic steatohepatitis (NASH)¹. Progressive advances have been made in recent times in terms of a better understanding of NAFLD development mechanisms. In 1998, the first hypotheses related to the triggering factors of NAFLD were raised. It was described that the presence of hepatic steatosis could be the first aggressor, while inflammation was classified as the second cause that could worsen the lesion caused by NASH³.

Currently, NAFLD is considered the leading cause of chronic liver disease. The origin of NAFLD is characterized from the accumulation of hepatic fat, regardless of the presence or absence of inflammation. NAFL presents the potential to progress to NASH, which is associated with the presence “ballooning” in the hepatocytes, inflammation, varied level of hepatic fibrosis, which significantly increases the probability of developing hepatocellular carcinoma (HCC)⁴.

The process of hepatic fibrosis originates due to the deposition of extracellular matrix in the liver, which is based on the balance between extracellular matrix production and its degradation. Hepatic stellate cells (HSCs) differentiate into proliferative and fibrogenic myofibroblasts when exposed to conditions of chronic inflammation in the liver. However, it is noteworthy that other cells also participate in this fibrogenic process, such as endothelial cells and other mesenchymal cells⁵.

The diagnosis of NAFLD consists of the histological evaluation of a liver fragment, confirming the presence of fatty deposits in the cytoplasm of more than 5% of the hepatocytes. However, the greatest challenge lies in the characterization of the presence of NASH, a diagnosis that influences the evolution of the disease and the type of treatment to be adopted. Therefore, the histological criteria are difficult to be established, depending a lot on the expertise of the observer⁶.

Liver biopsy for the diagnosis of NASH is highlighted as the gold standard, once only this test is capable of differentiating NAFL from NASH. However, limitations of this procedure should be considered, such as sample variability, high cost, risk of clinical complications, the analytical capacity of the specialized professional and the availability of this exam restricted to reference centers^{4,7}. In parallel with liver biopsy, there is also the possibility of evaluating NAFLD by non-invasive methodologies, which are useful for identifying the risk of NAFLD among individuals at high metabolic risk in primary care health services, as well as for identifying patients at risk of progression of the disease in secondary and tertiary care health services. There are methodologies based on serological markers that have already been validated in obese and healthy individuals. These methodologies were designed to assess both liver fat and fibrosis⁷.

According to Oliveira and Stefano study⁶, the use of circulating biomarkers is relevant in the identification of NAFLD forms, which can be classified as direct (related to the synthesis and degradation of the extracellular matrix such as collagens, metalloproteinases, hyaluronic acid, cytokeratin 18 - CK -

18) and indirect (biochemical markers such as liver enzymes, albumin dosage, blood glucose, platelet count). In addition, there are mixed tests that involve combinations of the two types of biomarkers.

However, non-invasive scores such as Fibrosis-4 (FIB-4) and NAFLD Fibrosis Score (NFS) are not able to perform with accuracy in an indeterminate area, called “gray zone”, which divides mild from advanced fibrosis⁸. Moreover, it should be highlighted that, currently, there are no non-invasive methodologies based on serological markers capable of differentiating NASH from NAFL⁷.

Despite having new advances regarding the development of non-invasive methodologies to evaluate NAFLD lesions, many of the current validated algorithms or blood markers still struggle with diagnostic accuracy, which could reduce the need of diagnostic liver biopsies⁷. In this way, the present study aimed to evaluate new variables based on blood biomarkers in order to provide new strategies to predict and/or associate with NAFLD forms.

2. Methods

Subjects

This study was elaborated in a prospective form and performed in the Ambulatory of Fat Liver Disease located at Botucatu Medical School (UNESP), which included patients with NAFLD (n = 111) and healthy subjects (control group – n = 09) in the period from 12/11/2021 to 15/07/2022. The control group was composed by healthy patients with no records regarding metabolic syndrome or blood hypertension. The study was submitted and approved by the Research Ethics Committee of Botucatu Medical School (process number: 52621921.0.0000.5411). All the patients included in this study signed an informed consent form.

Clinical and demographic data were collected through the patient's electronic medical record. For the analyses, samples of peripheral blood were collected in EDTA K₃ tubes spray dried with 1.8 mg anhydrous EDTA per 1 ml blood and in serum clot activator tubes (5 mL). Serum aliquots were frozen at -80°C for further processing of chemokine/TIMPs. These tests were performed at the Flow Cytometry Laboratory, Applied Biotechnology Laboratory - LBA, Clinical Hospital of Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP).

Patients were stratified into groups according to the degree of liver fibrosis and/or by NAFLD Activity Score (NAS)⁹. In this score, the following parameters are considered in the histological analysis: percentage of hepatic steatosis, presence and intensity of lobular inflammation and ballooning.

For the presence or absence of steatohepatitis, patients were classified into as proposed by Kleiner et al. (2005)⁹:

NAS = 0 to 2 – not NASH;

NAS = 3 to 4 – probable NASH;

NAS ≥5 - NASH

Regarding the assessment of fibrosis, patients classified with NAS≥3 were stratified according to the degree of fibrosis (F0, F1, F2, F3, F4)⁹, while absence of fibrosis and ballooning were criteria for classifying non-NASH patients who had a NAS score of 3 to 4 (probable NASH).

Inclusion criteria: patients suspected or diagnosed with nonalcoholic fatty liver disease, with indication for liver biopsy and evaluated by three indirect methods NAFLD fibrosis score

(NFS), Aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index (APRI) and Fibrosis-4 (FIB-4). The following formulas were used: NFS¹⁰ - $(1.675 + 0.037 \times \text{age (years)} + 0.094 \times \text{BMI (kg/m}^2) + 1.13 \times \text{IFG/diabetes (yes=1, no=0)} + 0.99 \times \text{AST/ALT ratio} - 0.013 \times \text{platelets (x 10}^9/\text{l)} - 0.66 \times \text{albumin (g/dl)})$, APRI¹¹ - $(\text{AST/upper limit of normal} \times 100)/\text{platelet count}$ and FIB-4¹² - $(\text{age [years]} \cdot \text{AST [IU/L]})/(\text{platelet count [10}^9/\text{L]} \cdot (\text{ALT [IU/L]})^{1/2})$.

Exclusion criteria: patients with other liver or gastrointestinal diseases were excluded from the study; who had a weight reduction >10% in the 6 months before liver biopsy procedure; bariatric surgery history; alcoholics; illicit drug user; use of steatogenic medications; patients not diagnosed with nonalcoholic fat liver disease in histological analysis; patients submitted to organ transplant.

All patients who met the inclusion criteria were included during the proposed recruiting period from 12/11/2021 to 15/07/2022. The selection of patients graded with liver fibrosis F2 was a limitation of this study, once the majority of the recruited group presented liver fibrosis classified as F0 and F3. In addition, other pathological conditions such as Chron's Disease, rectocolitis and records of bariatric surgery were relevant factors that reduced the sample size of this study. It should be highlighted that the pandemic state of the COVID-19 also was a barrier to recruit patients to this study.

Serum Expression of Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) by LEGENDplex™ Immunoassay.

TIMPs were quantified using the LEGENDplex™ Human TIMP Panel (3-plex) kit (BioLegend, USA) for TIMP-1, TIMP-2, and TIMP-3. Reagents, standard curve and wash buffer solution were prepared following the instructions on the package insert, which included all the necessary reagents. Samples were diluted 1:10 (TIMP) in a 96-well plate using Assay Diluent from the kit. It was added 25 µL of the diluted sample or 25 µL of each point of the standard curve. It was also added 25 µL of the buffer solution in the sample wells, 25 µL of Assay Buffer (TIMP) and 25 µL of bead mix in each well. The plate was sealed and protected from light for incubation under gentle agitation for 2 hours at 25 °C. Subsequently, the plate was washed by centrifugation for 5 minutes at 250 g, and inverted to remove the supernatant. It was added 200 µL of buffer in each well to repeat the washing process. It was added 25 µL of detection reagent in all wells, and then the plate was sealed and protected from light for incubation under gentle agitation for 1h at 25 °C. After this period, it was added 25 µL of SA-PE to each well and the plate was sealed for incubation under gentle agitation for 30 minutes at 25 °C. The washing process was repeated, then it was added 150 µL of buffer to resuspend the samples, transferring them from the plate to FACS tubes (Becton Dickinson, USA) for reading on a FACSCalibur-BD 4-color cytometer (Becton Dickinson, USA). Data were analyzed using the LegendPlex Desktop Software® (BioLegend, USA).

Chemokine Quantification

CBA Human Chemokine Kit (Becton Dickinson, USA) IL-8, RANTES, MIG, MCP-1, IP-10 was used for the quantification of chemokines by flow cytometry, following the manufacturer's instructions. Data were analyzed using the FCAP Array® software (Becton Dickinson, USA).

Flow Cytometry Immunophenotyping

The frequencies of circulating monocyte subpopulations (CD14⁺⁺/CD16⁻; CD14⁺⁺/CD16⁺), NK cells (CD3⁻/CD16⁺/CD56⁺; CD3⁻/CD16⁺/CD56⁺⁺) and dendritic cells (plasmacytoid Cocktail/HLA-DR⁺/CD123⁺/CD11c⁻; myeloid Cocktail/HLA-DR⁺/CD123⁻/CD11c⁺) were evaluated. Aliquots of 100 µL of whole blood were placed in polystyrene tubes (12x75mm) suitable for use in a flow cytometer and incubated with monoclonal antibodies conjugated with fluorochromes for 30 minutes at 25 °C, protected from light. After labeling, red blood cells were lysed with 1 mL of FACS Lysing Solution® - BD, to optimize leukocyte acquisition. After 30 minutes of incubation, the sample was centrifuged at 200g for 10 minutes, the supernatant removed and 500 µL of PBS (0.015M pH 7.4) was added, repeating the washing process. Finally, 300 µL of PBS will be added to resuspend the cells to be read in BD FACSCalibur® (Becton Dickinson, USA).

Absolute Quantification of CD4+ and CD8+ Lymphocytes

For the determination of absolute count and percentage of T lymphocyte subpopulations it was added 20 µL of BD Multitest® (CD3, CD8, CD45 and CD4) to BD TruCOUNT® Tubes containing microspheres of fluorescent beads of known quantity. Then, the whole blood samples were homogenized by inversion and, by reverse pipetting it was added 50 µL of whole blood. The tubes were vortexed and incubated at 25 °C, in the dark, for 15 minutes. Subsequently, it was added 450 µL of FACS Lysing Solution - BD® lysis solution, and again vortexed and incubated at room temperature in the dark for 15 minutes. The samples were read using the cytometer BD FACSCalibur® (Becton Dickinson, USA) and data analyzed using the MultiSet® software (Becton Dickinson, USA).

Statistical Analysis

Categorical variables were analyzed using frequency distribution and Chi-square test. Numerical variables were initially submitted to the Shapiro-Wilk normality test. Subsequently, analyzes of variance were performed: ANOVA test was applied for those with symmetrical distribution followed by the Post Hoc Tukey test, adopting the mean and standard deviation (SEM) as a measure of central tendency. Asymmetric variables were represented by the median and interquartile half-range (p25; p75) and analyzed by the Kruskal-Wallis test, followed by Post Hoc Dunn test and Mann Whitney test to obtain the p-values between the pairs of groups identified as significant. Receiver operating characteristic curves analyzes (ROC) were performed and the area under the ROC curve (AUC) for all variables in our dataset were determined. GraphPad Prism® software version 9.3.1 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA) was used for the analysis of variance and pROC library of R Software® version 4.0.4 (R Development Core Team-2021) was used to calculate the ROC curves. For all analyses, it was considered p<0.05 as statistically significant.

3. Results

One hundred and twenty (n=120) were selected in this study according to the inclusion criteria. Twenty-six patients were excluded, following the established criteria for exclusion. The causes are: 08 - unconfirmed steatosis; 03 - history of bariatric surgery; 03 - hepatitis C; 02 - hepatitis B; 02 -

rectocolitis, 02 - Crohn's disease; 01 – kidney transplant; 01 – autoimmune hepatitis; 01 – hemochromatosis; 01 – Wilson's disease under investigation; 01 – porphyria; 01 – biopsy not performed. In total, 85 patients were evaluated.

Regarding the classification of liver fibrosis, the distribution was the following: F0:22, F1:12, F2:11, F3:18, F4:16 as shown in Table 1. Six patients with only NAFL and nine control subjects (without hypertension, diabetes and/or obesity) were included.

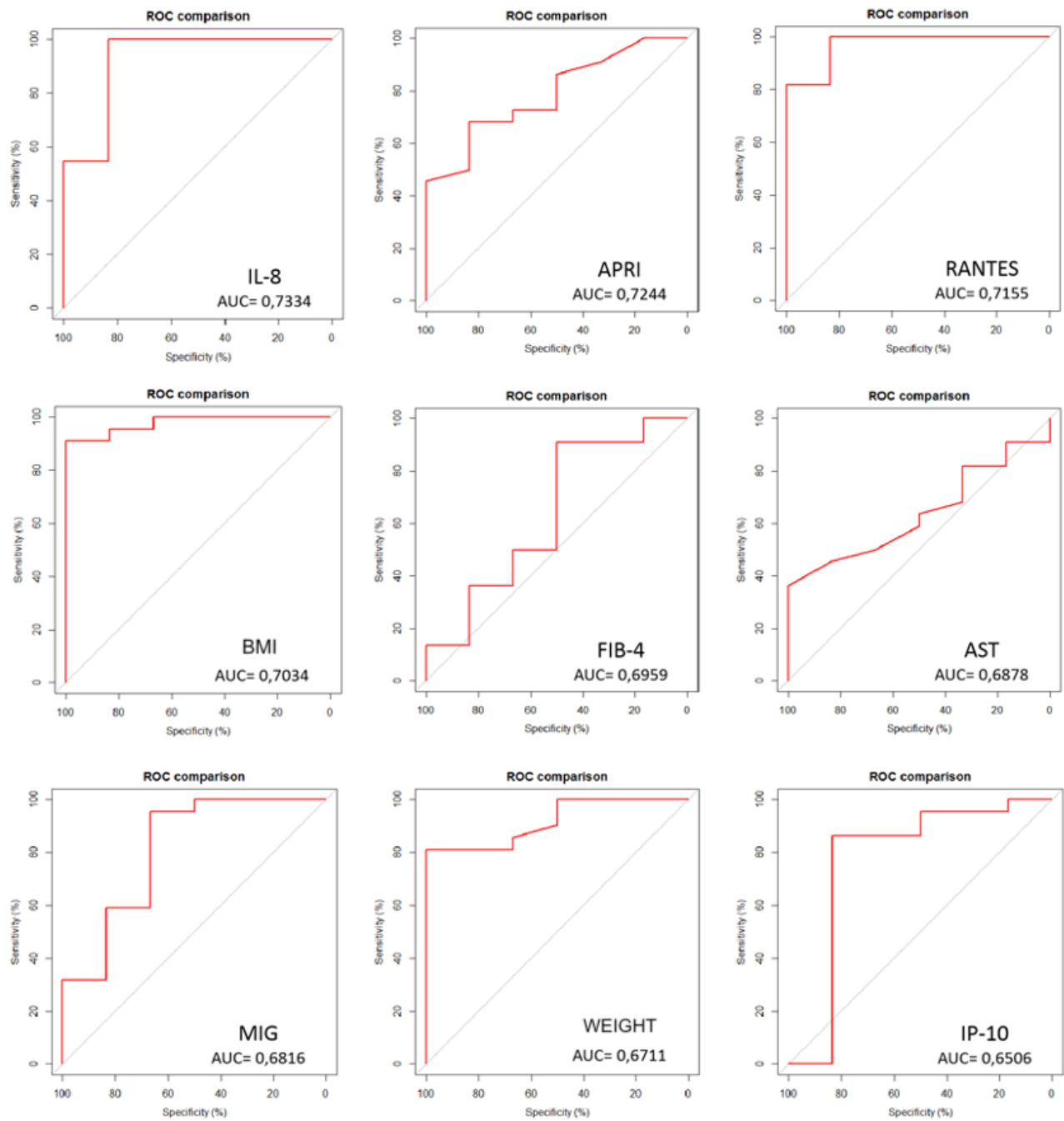
Table 2: Characterization of the study groups according to NASH and Non-NASH.

		<i>Sample Size</i>	<i>%</i>
NASH	F0	22	23,4%
	F1	12	12,8%
	F2	11	11,7%
	F3	18	19,1%
	F4	16	17,0%
Non-NASH	Steatosis	6	6,4%
	Control	9	9,6%
TOTAL		94	100,0%

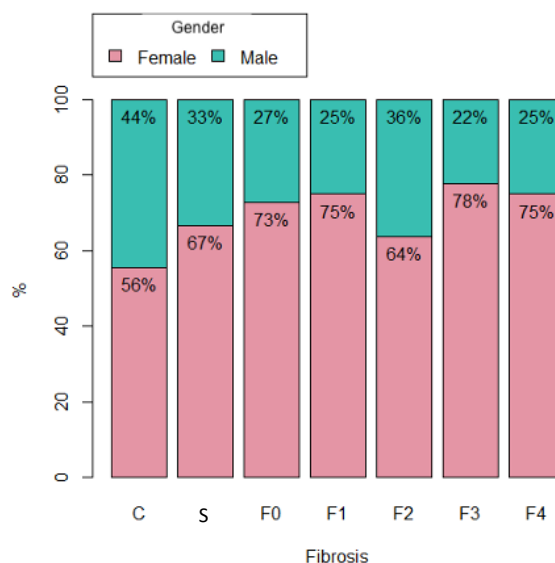
The analyzed variables were divided into demographic data, clinical data, peripheral components and serum components: a) **demographic data:** age, sex; b) **clinical and laboratorial data:** weigh, height, body mass index (BMI), platelets, AST/ALT, albumin, glucose, glycated hemoglobin, FIB-4, NAFLD Score and APRI; c) **peripheral components:** T lymphocytes, NK cells, monocytes and dendritic cells; d) **serum components:** IP-10, MCP-1, MIG, RANTES, IL-8, TIMP-1, TIMP-2 and TIMP-3.

In order to assess the association of variables, as well as their predictive potential for the degree of fibrosis, we performed analysis of ROC curves excluding the control group. Figure 1 presents the ROC curves with the most significant AUCs obtained. ROC curve analyzes showed that cytokines are associated with the degree of fibrosis, with IL-8 having the highest AUC, followed by APRI, RANTES, BMI, FIB-4, AST, MIG, weight and IP-10.

Figure 2: ROC curves from the attributes with AUROC ≥ 0.65



The analyzes showed that the female gender was predominant among the study participants (71%), however, this predominance was similarly observed in all groups (Figure 2), with no significant difference among the groups ($p=0,9154$).

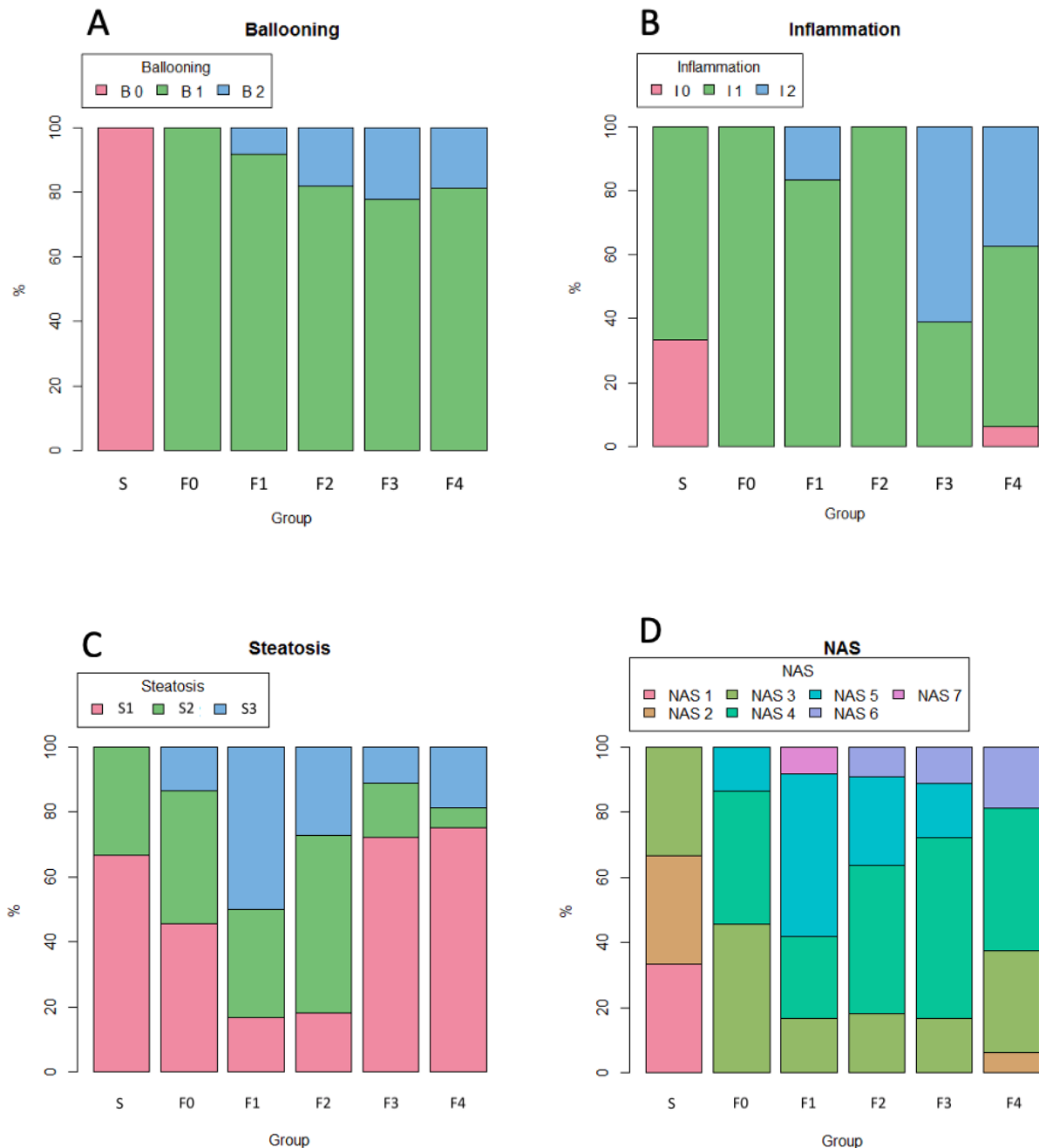
Figure 3: Gender distribution according to liver fibrosis classification.

The categorical parameters evaluated in the histological analysis of liver biopsies are represented in the Table 5 as seen with the relative frequency (%) of the total number of patients included. Significant differences ($p < 0.001$) were observed in the frequencies of ballooning levels, inflammation, steatosis and NAS values between the groups.

Table 3: Distribution of categorical variables in NAFLD patients.

Groups	Classification Level	Patients	%
Steatosis	S1	43	50.59%
	S2	25	29.41%
	S3	17	20%
Ballooning	B0	6	7.06%
	B1	69	81.18%
	B2	10	11.76%
Inflammation	I0	3	3.53%
	I1	63	74.12%
	I2	19	22.35%
NAS Score	NAS 1	2	2.35%
	NAS 2	3	3.53%
	NAS 3	24	28.24%
	NAS 4	34	40%
	NAS 5	15	17.65%
	NAS 6	6	7.06%
	NAS 7	1	1.18%

Figure 4: Frequency distribution of ballooning, inflammation, steatosis and NAS according to the hepatic fibrosis classification.



It was observed that all patients belonging to the F0 group presented mild ballooning (B1) and that the higher degree of fibrosis was associated with the greater the percentage of evident ballooning (B2), reaching 22% in F3 and 19% in F4.

Regarding the level of inflammation, the variation was uneven among the groups, since in the steatosis group, 33% had no inflammation and 67% had mild inflammation (I1). In groups F0 and F2, all patients presented moderate inflammation (I2), while in the other groups these percentages varied, with a predominance of mild inflammation in F1 and F4 and moderate in F3. No patient had severe inflammation (I3).

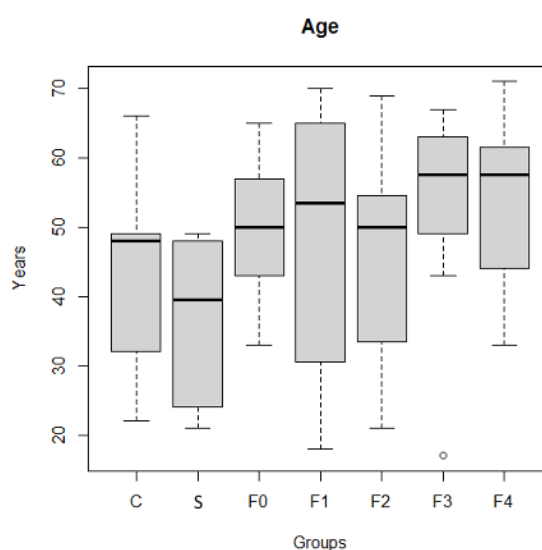
In order to perform the histological diagnosis of NAFLD using the NAS score, steatosis is a

mandatory finding and must be classified according to the percentage of steatotic hepatocytes at four levels: 0= <5%; 1=5 to 33%; 2=34% to 66%; 3= > 66%. In our results, we observed in the steatosis group, only levels E1 and E2, with a higher percentage of E1 (67%). There was also a predominance of the E1 level in the F0, F3 and F4 groups, while in the F1 group it was observed that 50% of the patients were classified as E3, 33% in E2 and only 17% in E1. In the F2 group, the predominance was E2 (55%).

According to the variation found in the intensity of steatosis, inflammation and ballooning, the distribution of the NAS score was also heterogeneous. While in the steatosis group the percentages were similar among NAS 1, 2 and 3, in the F0 group there was a predominance of NAS 3 (45%) and in the F1 group the highest percentage of patients (50%) presented NAS 5. In the other groups (F2, F3 and F4) the most frequent was NAS 4 (45%, 56% and 44%).

Age (median) was significantly different among some groups, as follows: steatosis x F0 ($p=0.0332$); steatosis x F3 (0.0062); steatosis x F4 (0.0202), and control group x F4 (0.0474). Figure 4 shows that the age in the steatosis group was the lowest, followed by the control group, with the highest ages of patients in more advanced stages of fibrosis.

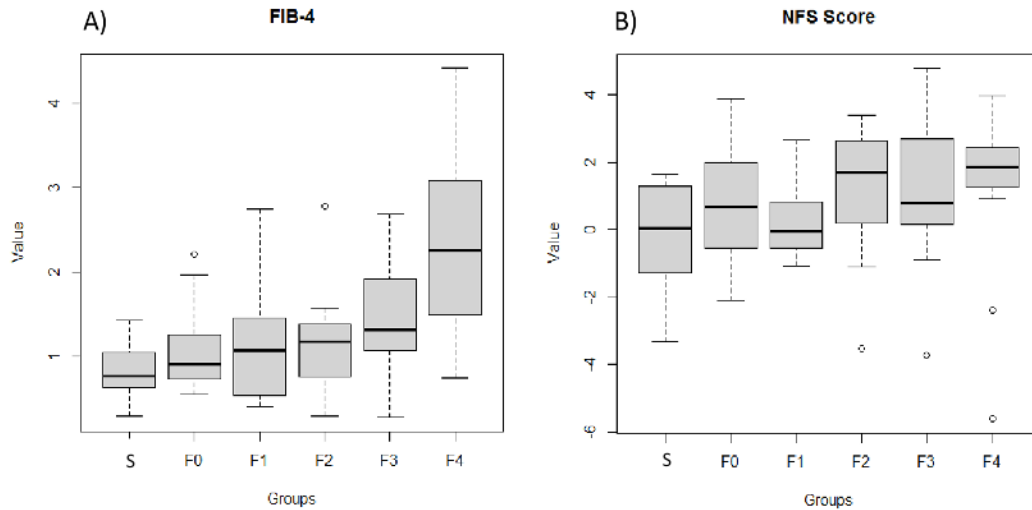
Figure 5: Median and semi-interquartile range of age (in years) of groups. Medians - Control: 48; Steatosis: 39.5; NASH groups: F0 = 50; F1 = 53.5; F2 = 50; F3 = 57.5; F4 = 57.5.



When we evaluated the two scores recommended as non-invasive tests for NASH assessment, we observed that FIB-4 was able to distinguish patients with simple steatosis from those with NASH/F4 ($p=0.003$). It also differentiated NASH/F0 from NASH/F4 ($p=0.002$), as well as NASH/F1 from NASH/F4 ($p=0.003$), which reflects its ability related to predicting the presence or absence of fibrosis and differentiating mild or advanced fibrosis. However, it was not evidenced the ability to distinguish changes from nearby fibrosis grades (F0 to F1, F1 to F2, F2 to F3, and F3 to F4).

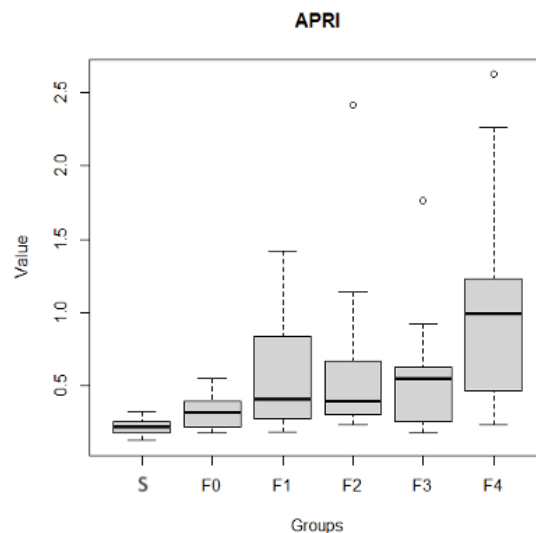
On the other hand, the NFS score showed no significant difference among the evaluated groups ($p=0.1115$) (Figure 5).

Figure 6: FIB-4 and NFS scores in predicting steatosis and fibrosis grades. A) FIB-4 in the different groups. B) NFS score in the different groups (median and semi-interquartile range).



APRI is another score used for non-invasive evaluation of liver fibrosis of other etiologies, such as hepatitis C¹¹. We observed that this non-invasive marker was significantly different only in the comparison between NASH/F4 with steatosis (0.003) and NASH/F4 with NASH/F0 (0.0016), where F4 was the highest median (Figure 6).

Figure 7: APRI scores in predicting steatosis and fibrosis grades.



As expected, the analysis of the attributes already consolidated for NAFLD showed a significant difference among the groups. Table 6 shows the variables weight, BMI, glucose, ALT and AST and the respective differences found (p -value) in the comparison among the groups.

Table 4: Statistical analysis of consolidated attributes for NAFLD in normality test.

	Groups	p= <i>value</i>
BMI	F0 x Steatosis	<0.0001
	F0 x Control	0.0022
	F1 x Steatosis	0.0034
	F2 x Steatosis	0.0006
	F3 x Steatosis	0.0012
	F4 x Steatosis	0.0058
Weight	F0 x Steatosis	0.0135
Glucose	F0 x F4	0.0209
	F1 x F3	0.0263
	F1 x F4	0.0169
	F2 x F4	0.0429
ALT	F0 x F2	0.049
	F0 x F3	0.0455
	F0 x F4	0.0051
	F4 x Steatosis	0.0141
AST	F0 x F4	0.0005

No differences were found in the variables: albumin, height, glycated hemoglobin, platelet count, CD3+ Absolute lymphocytes, CD3+(%), CD4+ Absolute, CD4+(%), CD8+ Absolute, CD8+(%), CD45+ Absolute, CD4+/CD8+ ratio, dendritic cells mDC, pDC, total monocytes, total NK cells, NK^{Bright} and NK^{Dim}.

Circulating immune cells (total dendritic, classical monocytes and non-classical monocytes) showed a difference between the control group compared to NASH/F4 ($p=0.0001$; 0.0025 ; 0.0025 , respectively), not differing among the fibrosis degrees of NASH patients, nor between NASH and non-NASH (steatosis). However, the subpopulations of classical monocytes differed between the control group and NASH/F0 ($p=0.0033$), as well as non-classical monocytes ($p=0.0033$), with an increase in pro-inflammatory monocytes in NASH.

For the chemokine analysis (Table 4), the presence of steatosis induced a significant increase in the serum levels of MCP-1 ($p=0.0028$), IL-8 ($p=0.0004$), IP-10 ($p=0.036$) and MIG ($p=0.0016$), when compared to the levels observed in the control group.

Among individuals with NASH, from the perspective of fibrosis progression, MCP-1 is increased in all fibrosis classifications when comparing the level of this chemokine with the control group, however, there was no difference in terms of changes of degrees of fibrosis (Table 7 and Figure 7).

Circulating IL-8 was present in low concentrations in healthy individuals, showing a significant increase ($p=0.0004$) in the presence of steatosis. However, with the establishment of fibrosis, these levels are suppressed, rising again in cirrhosis to levels similar to those observed in steatosis (Table 7 and Figure 7).

IP-10 may be an important biomarker for the identification of steatosis, as it increased

significantly in this clinical condition and remains high after the establishment of hepatic fibrosis. However, serum levels did not differ among degrees of fibrosis and may not be useful to assess the change in fibrosis grading (Table 7 and Figure 7).

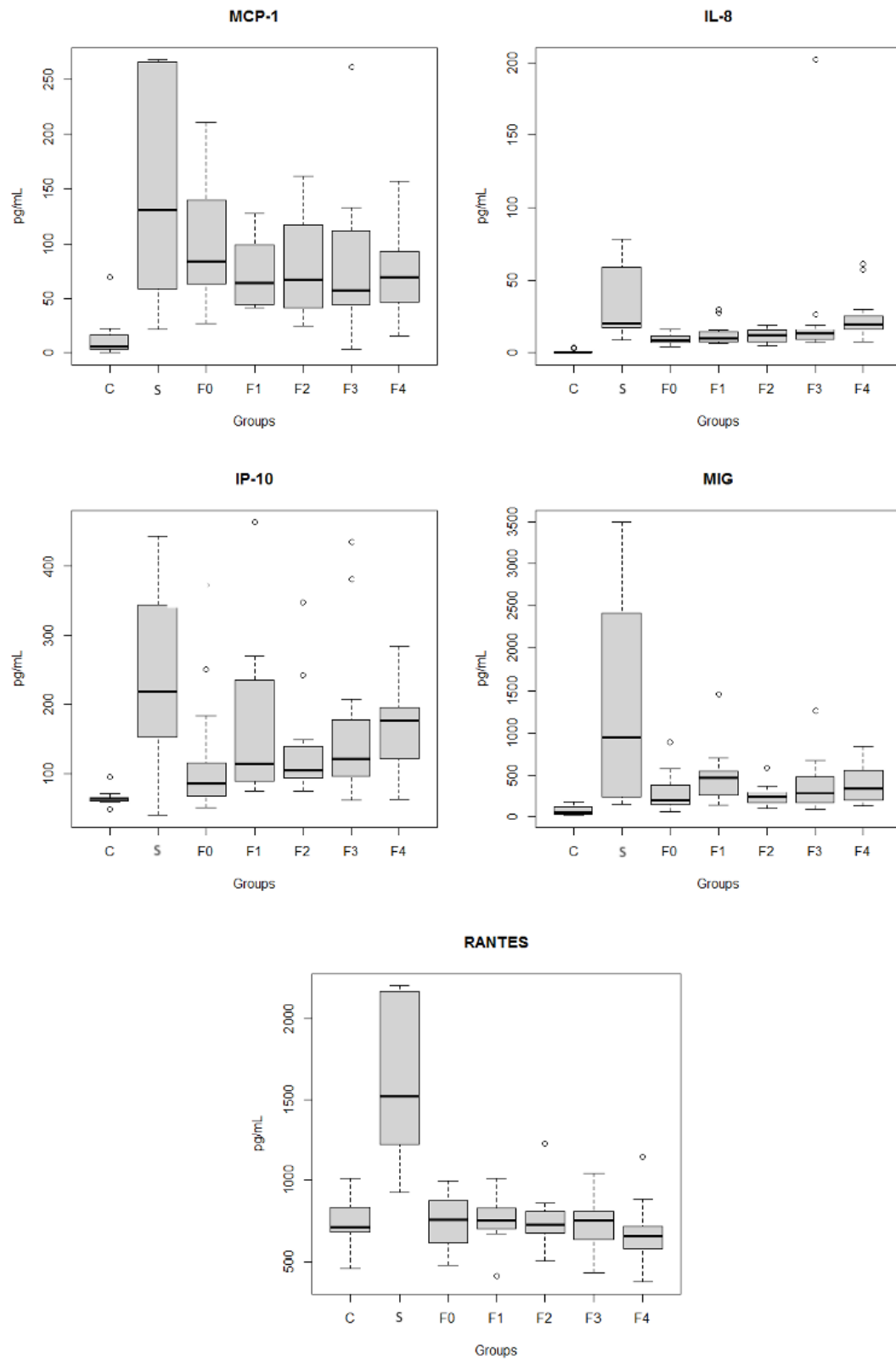
RANTES proved to be a relevant parameter to distinguish steatosis, as there is a marked release of this soluble circulating protein. Similar to other evaluated chemokines, with the establishment of fibrosis, there is a reduction in serum levels, becoming similar to the levels of healthy individuals (Table 4 and Figure 7).

Table 5: Statistical analysis of chemokines according to Kruskal-Wallis/Post Hoc Dunn for the groups and Mann Whitney Test for p=value in normality test.

	Groups	p=value
MCP-1	F0 x Control	<0.0001
	F1 x Control	0.0007
	F2 x Control	0.0011
	F3 x Control	0.0013
	F4 x Control	0.0005
	Steatosis x Control	0.0028
IL-8	F0 x F4	<0.0001
	F0 x Steatosis	0.0019
	F1 x Control	0.001
	F2 x Control	0.0002
	F3 x Control	<0.0001
	F4 x Control	0.0001
IP-10	Steatosis x Control	0.0004
	F1 x Control	0.0004
	F3 x Control	0.0003
	F4 x Control	0.0002
MIG	Steatosis x Control	0.036
	F1 x Control	0.0003
	F3 x Control	0.0003
	F4 x Control	0.0002
RANTES	Steatosis x Control	0.0016
	F0 x Steatosis	0.0006
	F2 x Steatosis	0.0022
	F3 x Steatosis	0.0005
	F4 x Steatosis	0.0006

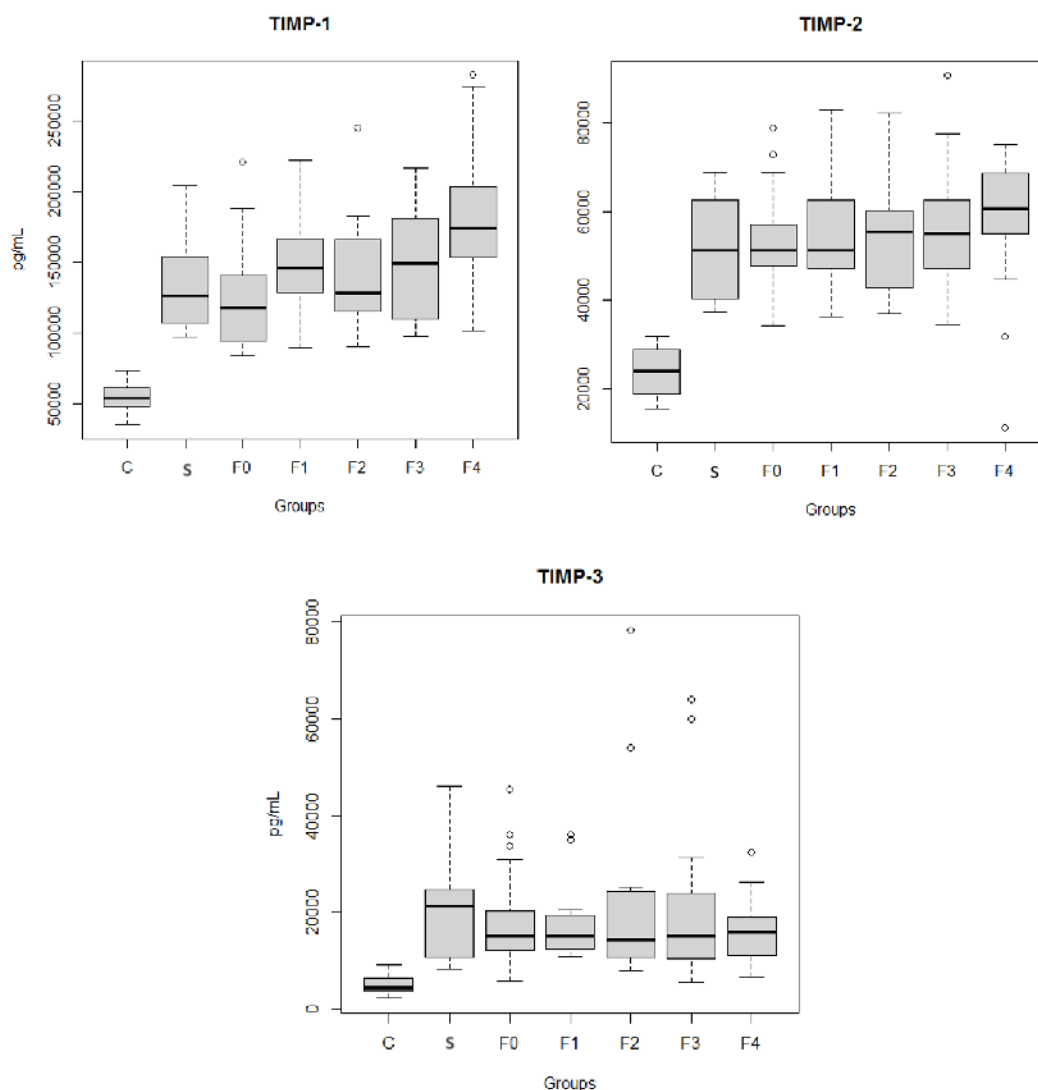
Groups: Comparison of study groups (Control, Steatosis and Liver Fibrosis Grading) with significant difference between each other according to each chemokine. Each pair of groups described in the column had its p-value calculated as shown in the third column.

Figure 8: Chemokines distribution in the study groups (Control, Steatosis and Fibrosis Grades).



TIMPs also showed a significant difference between the control group and the other groups. However, only TIMP-1 also showed a difference between F0 and F4.

Figure 9: Distribution value of TIMPs in in the study groups (control, steatosis and fibrosis grades).



4. Discussion

We observed that 23% of the individuals included in this study were classified as belonging to the F0 with NASH, while only 6% had only steatosis without NASH (steatosis group) (Table 1). This can be explained by the European Association for the Study of the Liver (EASL) guidelines⁷, which recommends that due to the high worldwide prevalence of NAFLD, not every patient diagnosed or suspected of having hepatic steatosis should undergo a biopsy. Firstly, these patients must be screened by at least two non-invasive biomarker scores such as FIB-4, NFS score and APRI. Biopsy should be indicated only when these scores suggest significant fibrosis ($\geq F2$) or provide discrepant results⁷, which decreases the incidence of biopsied patients who do not have a diagnosis of NASH. When we evaluated the scores most commonly used as screening for non-invasive assessment of advanced fibrosis in NAFLD, the results found were similar to those generally observed in scores based on biomarkers. They perform better to distinguish advanced ($\geq F3$) from non-advanced ($\leq F1$) fibrosis, but there is a “gray zone” in distinguishing from F0 to F1 and from F1 to F2^{7,13}. This fact reinforces the need to identify biomarkers capable of differentiating each degree of fibrosis, as well as distinguishing the presence or

absence of steatosis.

No significant differences were found in the variables: albumin, height, glycated hemoglobin and platelets count when evaluated separately, although some of these compose the scores mentioned above.

In the present study, the area under the ROC curve (AUROC) for FIB-4 was 0.69 (Figure 1). This score is already validated in the context of NAFLD and it has been used to evaluate liver fibrosis in these patients⁷. In addition, it is worth mentioning that FIB-4 was efficient in distinguishing patients with simple steatosis from those with NASH and liver fibrosis classified as F4 ($p=0.003$). Moreover, FIB-4 also differentiated patients with NASH and F0 from others with NASH and F4 ($p=0.002$), as well in individuals classified with NASH and fibrosis F1 from others with NASH and fibrosis F4 ($p=0.003$). These results are supported by guidelines used in clinical practice, which recommend the use of FIB-4 to exclude advanced fibrosis¹⁴. Although FIB-4 presents an efficient ability to predict the presence or absence of fibrosis and distinguishing mild or advance fibrosis, the nearby fibrosis grades was not possible to be classified by this marker. Furthermore, this analysis suggest that this score can vary its values depending on the study applied.

According to Table 3, it was observed that glucose was significantly different between mild cases of liver fibrosis and also in severe cases. It should be highlighted that this parameter was previously validated in a score called FibroMeter, which presented an AUROC of 0,75-79 for the detection of advanced liver fibrosis in patients with NAFLD¹⁵. However, it should be observed that FibroMeter is also composed by other variables such age, sex, weight, AST, ALT and ferritin, which could leverage its performance¹⁵. In the NAFLD context, the presence of fasting hyperglycemia is a common clinical finding and the metabolic syndrome is mainly caused by insulin resistance¹⁶, therefore confirming the direct influence of high glucose levels as an important pathogenic feature.

APRI has been previously described with an AUROC of 0.80-0.85 for the detection of advanced fibrosis in NAFLD patients¹⁵. An AUROC of 0.72 was found in the present study (Figure 1) for the prediction of fibrosis F0-F4, which may explain the difference between the previous work, once it encompasses more fibrosis stratifications. This consideration was observed by Kruger et al. (2011)¹¹, which confirmed APRI as relevant algorithm for ruling out advanced fibrosis. Furthermore, in this study APRI presented significantly different results only for the comparison between groups NASH/F4 against steatosis ($p=0.003$) and groups NASH/F4 against NASH/F0 ($p=0.0016$).

Previous studies have shown that individuals affected by NAFLD presented changes in biomarkers related to liver fibrosis and extracellular matrix remodeling. Elevated levels of TIMP-1 have been reported in patients with significant hepatic fibrosis, but it has been shown that this marker was unable to distinguish NAFL from NASH. From this perspective, it was proposed that TIMP-1 quantification could contribute to the prediction of hepatic fibrosis progression¹⁷. TIMP-1 has also been used for the detection of liver fibrosis in other clinical conditions such as chronic HCV infection¹⁸. Another study¹⁹ identified higher levels of TIMP-1 in NASH patients when compared to the non-NASH group.

The present analyzes demonstrated that peripheral levels of TIMP-1, 2 and 3 are significantly elevated in patients with NAFLD compared to the control group (Figure 8). However, TIMP-1 should be highlighted among the other TIMPs as it also showed a significant difference between F0 (lowest levels)

and F4 (highest levels). Although there was no difference among the other fibrosis groups, it was possible to observe in Figure 8 that the levels increase gradually. However, in the analysis of ROC curve TIMP-1 presented a median performance with AUC= 0.6495, thus suggesting that different calculation approaches can generate different outcomes and further analysis in a larger sample size with this molecule may be considered in order to establish the potential of TIMP-1 to classify fibroses stages in NAFLD.

Regarding the role of chemokines in the context of NAFLD, IL-8 presents as an important chemokine produced by inflammatory and endothelial cells. This chemokine has been previously found in higher levels in patients with NASH in comparison to individuals with only hepatic steatosis or healthy^{20,21}. It is worth mentioning that this molecule presented several associations in this study, which were statistically significant for F0 x F4, F0 x Steatosis, F1 x Steatosis, F2 x Control, F3 x Control, F4 x Control and Steatosis x Control. This data suggest that IL-8 presents a role in almost all pathological phases of NAFLD progression (Table 4). In the current research, IL-8 presented its highest level for the steatosis group (Figure 7). On the other hand, the lowest level of this molecule was detected for the control group, which confirms the role of IL-8 as an important pro-inflammatory chemokine. In this way, it could be inferred IL-8 could be a relevant parameter for monitoring the pathological phases of NAFLD.

By excluding the control group in order to prevent it from interfering with the distinction between the groups with steatosis/fibrosis, the association analysis using the ROC curve once again demonstrated the importance of IL-8, once it presented AUC= 0.7334 in the distinction of the groups (Figure 1), which is higher than that obtained in this study for some of the markers already used: APRI (AUC= 0.7244), BMI= (AUC= 0.7034), FIB-4 (AUC= 0.6959), AST (AUC = 0.6878), weight (AUC= 0.6711) and NFS score (AUC= 0.6347). Glass et al. (2018)²², evaluated patients with NASH and observed an association of serum IL-8 levels with the degree of hepatic fibrosis, where it was noted increasing levels in advanced stages of fibrosis, which is similarly to our results. The authors suggest the use of an algorithm associating levels of IL-8, MCP-1 and extracellular matrix protein, aiming to increase the predictive power of IL-8 in the identification of advanced degrees of liver injury.

The chemokine MIG has also been identified in elevated levels in patients with NASH, thus indicating a participation of this chemokine with the advance of the inflammation²⁰. A similar scenario demonstrated to IL-8 it was also observed for this chemokine in the present study. However, less associations were made as it can be seen in Table 4. The role of this chemokine stand on the recruitment of activated T cells, memory T cells and natural killer cells²¹, which highlights its participation in the inflammatory process of NAFLD. Therefore, according to the present data, MIG presents a potential to be included in the evaluation of NAFLD.

Regarding IP-10, it is worth mentioning that this pro-inflammatory chemokine can be induced by IFN- γ and it is associated with lipotoxicity, which results in the recruitment of inflammatory cells to the hepatic lesions²³. This molecule is released by monocytes, neutrophils, endothelial cells, keratinocytes, fibroblasts, dendritic cells, menschymal cells, astrocytes and hepatocytes and has been associated as an independent risk factor associated with the progress of liver lesions²⁴.

IP-10 and MIG presented differences among the control group in relation to the other groups, with the exception of F0 and F2 (Table 4). The steatosis group had the highest levels of these cytokines,

but statistical significance was also observed between the steatosis group and the control group. This can be explained by the limited sample size in the steatosis group. Perhaps with a greater number of patients composing this group, this statistical difference could also be significant in comparison to the NASH groups, since they are evidently lower, regardless of the degree of fibrosis.

Wada et al. (2017)²³ also observed that IP-10 is increased in patients with NAFLD compared to healthy individuals and it was described that this increase happens gradually among patients with steatosis and those who progress to NASH. The authors suggest that while in other liver diseases, such as chronic hepatitis C, intrahepatic levels of IP-10 are associated with necroinflammatory changes and fibrosis. On the other hand, in NAFLD, IP-10 appears to be associated with lipotoxicity.

In the present study, RANTES presented different serum concentrations in the steatosis group when compared to the other fibrosis groups, with the exception of F1 (Table 4). The ROC curve analyzes (Figure 1) demonstrated that RANTES presents a satisfactory predictive value for differentiating the studied groups (AUC= 0.7155), thus it may be an important candidate in the composition of a predictive model when combined with IL-8.

Kirovsk et al. (2010)²⁵ demonstrated in an in vitro study that the accumulation of lipids in human hepatocytes induced the production of RANTES in a dose-dependent manner. In addition, they observed in an experimental model that feeding a high-fat diet induces intrahepatic expression of RANTES even in the absence of significant inflammation and/or fibrosis. Our results corroborate these findings, as we observed high levels of RANTES in the steatosis group compared to the other groups (Figure 7). This leads us to believe that steatosis itself could induce increased production of RANTES regardless of the inflammatory infiltrate present in steatohepatitis or of hepatic stellate cells activated in fibrogenesis, as the main cellular sources of high hepatic expression of this molecule.

According to the chemokines data discussed above, it seems that these molecules reach their highest levels during the early stages of NAFLD. It was observed in Figure 3 that no inflammation was observed in the majority of patients diagnosed with only steatosis, thus indicating that histological findings are not sufficient to elucidate and identify the presence of this clinical occurrence. In this way, these findings can contribute to a better understanding regarding the dynamic role of these chemokines in the progression of NAFLD. It has been reported that some elevated cytokines in steatosis, such as RANTES, may represent an early manifestation of the natural history of NAFLD and may be involved with other cytokines in the progression to the stage of NASH and/or fibrosis²⁵, and similarly can occur with IL-8, IP-10 and MIG.

Regarding gender distribution, analyzes showed the predominance of women in this study (71%), which was similar in all groups, thus indicating that gender did not influence the intergroup analyses (Figure 3). The increased occurrence of NAFLD in women has been attributed to the reduction in hormone levels that occur in the post-menopausal period, which contributes to the increase in body fat²⁶. This increase in body fat associated with the incidence of NAFLD severity, as reported in the literature, reinforces our findings, since we also observed significant differences among the values of weight, BMI, glucose, ALT and AST among the groups, as expected, considering the relationship of these attributes to the NAFLD (Figure 2).

The median for age in the steatosis group was the lowest (Figure 4), followed by the control

group, with the highest values in the most advanced stages of fibrosis. These data corroborate the reports in the literature, as the most advanced stages of fibrosis tend to be identified at an older age, since, according to Marchesini et al. (2016), NAFLD presents a relatively slow progression, presenting an average progression from one stage of fibrosis to every 7 years in NASH, which may be faster when associated with arterial hypertension⁷.

It was observed in this study that the frequency of different degrees of inflammation, ballooning, hepatic steatosis and the NAS score varies unevenly among the fibrosis groups. However, ballooning was the only parameter that demonstrated a tendency to increase according to the severity of hepatic fibrosis (Figure 3). This observation is relevant since the NAS score is calculated by the degree of steatosis, while inflammation and ballooning in the histological analysis serves as a parameter to diagnose the presence or absence of NASH. In non-NASH conditions, a small degree of portal inflammation could also be identified, but in the confirmation of the presence of steatosis, hepatocyte ballooning is a necessary characteristic and also inflammation in order to confirm the diagnosis of NASH²⁷. These results lead us to hypothesize that biomarkers that identify and/or differentiate degrees of ballooning may also indirectly suggest different degrees of hepatic fibrosis.

It is important to highlight that levels of a considerable number of variables in the present study were increased in patients affected by NAFLD compared to healthy individuals. In this sense, we must consider that obesity within the context of the metabolic syndrome leads to a basal inflammatory condition, which could directly interfere with the production of cytokines.

Our study listed some biomarkers with the potential to differentiate healthy individuals from NASH and non-NASH patients even with a low number of individuals in the steatosis group. This is characterized as an important advance, once although it is possible to differentiate such individuals by ultrasound, steatosis is detected only when the percentage of fat in the liver tissue is $\geq 20\%$ ⁷, which could take to inconclusive or false negatives results. In addition, the availability of ultrasound devices to assess steatosis in the estimated percentage of people with NAFLD is very small. It could be inferred that positive cases of steatosis with lower percentage of intrahepatic fat could be identified earlier with the association of biomarkers, thus contributing to identify patients who may need monitoring at shorter intervals. Furthermore, if increased levels of these biomarkers are found to be related to evolution to NASH, this becomes even more relevant.

5. Conclusion

The present study demonstrated the performance of several non-invasive serological biomarkers that could expand the possibilities of monitoring NAFLD progression.

The results allowed us to suggest possible biomarkers that may compose a predictive model for distinguishing hepatic fibrosis, which may present a better performance than the scores already used. In addition, chemokines such as IL-8, MCP-1, MIG, RANTES and IP-10 exhibited an important potential to be evaluated as biomarkers of early identification of steatosis with risk of progression to NASH, which suggests that it could be used as an alternative screening test to meet the demand that this emerging pathological condition has represented.

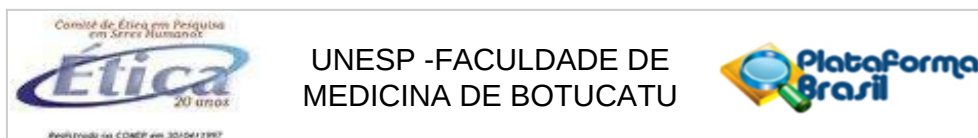
6. References

1. Hadinia A, Doustimotlagh AH, Goodarzi HR, et al. Circulating levels of pro-inflammatory cytokines in patients with nonalcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Iran J Immunol* 2019; 16: 327–333.
2. Liebe R, Esposito I, Bock HH, et al. Diagnosis and management of secondary causes of steatohepatitis. *J Hepatol* 2021; 74: 1455–1471.
3. Thibaut R, Gage MC, Pineda-Torra I, et al. Liver macrophages and inflammation in physiology and physiopathology of non-alcoholic fatty liver disease. *FEBS J* 2022; 289: 3024–3057.
4. Lambrecht J, Tacke F. Controversies and Opportunities in the Use of Inflammatory Markers for Diagnosis or Risk Prediction in Fatty Liver Disease. *Front Immunol* 2021; 11: 1–10.
5. Okazaki I, Noro T, Tsutsui N, et al. Fibrogenesis and Carcinogenesis in Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH): Involvement of Matrix Metalloproteinases (MMPs) and Tissue Inhibitors of Metalloproteinase (TIMPs). *Cancers (Basel)* 2014; 6: 1220–1255.
6. Oliveira C, Stefano J. Doença hepática gordurosa não alcoólica. In: *Temas de Atualização da SBAD 2017*. Editora Manole. Epub ahead of print 2017. DOI: 10.22288/9788520456507000016.
7. Marchesini G, Day CP, Dufour JF, et al. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2016; 64: 1388–1402.
8. Qadri S, Ahlholm N, Lønsmann I, et al. Obesity Modifies the Performance of Fibrosis Biomarkers in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2022; 107: E2008–E2020.
9. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 41: 1313–1321.
10. Angulo P, Hui JM, Marchesini G, et al. The NAFLD fibrosis score: A noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology* 2007; 45: 846–854.
11. Kruger FC, Daniels CR, Kidd M, et al. APRI: a simple bedside marker for advanced fibrosis that can avoid liver biopsy in patients with NAFLD/NASH. *S Afr Med J* 2011; 101: 477–80.
12. Tamaki N, Kurosaki M, Tanaka K, et al. Noninvasive estimation of fibrosis progression overtime using the FIB- 4 index in chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2013; 20: 72–76.
13. Guha IN, Parkes J, Roderick P, et al. Noninvasive markers of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: Validating the European Liver Fibrosis Panel and exploring simple markers. *Hepatology* 2007; 47: 455–460.
14. Lee J, Vali Y, Boursier J, et al. Prognostic accuracy of FIB-4, NAFLD fibrosis score and APRI for NAFLD-related events: A systematic review. *Liver Int* 2021; 41: 261–270.
15. Lonardo A, Arab JP, Arrese M. Perspectives on Precision Medicine Approaches to NAFLD Diagnosis and Management. *Adv Ther* 2021; 38: 2130–2158.
16. Chao H-W, Chao S-W, Lin H, et al. Homeostasis of Glucose and Lipid in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci* 2019; 20: 298.
17. Yilmaz Y, Eren F. Serum biomarkers of fibrosis and extracellular matrix remodeling in patients with nonalcoholic fatty liver disease: association with liver histology. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2019; 31: 43–46.

18. Abdelaziz R, Elbasel M, Esmat S, et al. Tissue inhibitors of metalloproteinase-1 and 2 and obesity related non-alcoholic fatty liver disease: Is there a relationship? *Digestion* 2015; 92: 130–137.
19. Younossi ZM, Page S, Rafiq N, et al. A Biomarker Panel for Non-alcoholic Steatohepatitis (NASH) and NASH-Related Fibrosis. *Obes Surg* 2011; 21: 431–439.
20. Braunersreuther V, Viviani GL, Mach F, et al. Role of cytokines and chemokines in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 727–735.
21. Roh YS, Seki E. Chemokines and chemokine receptors in the development of NAFLD. *Adv Exp Med Biol* 2018; 1061: 45–53.
22. Glass O, Henao R, Patel K, et al. Serum Interleukin-8, Osteopontin, and Monocyte Chemoattractant Protein 1 Are Associated With Hepatic Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatol Commun* 2018; 2: 1344–1355.
23. Wada N, Takaki A, Ikeda F, et al. Serum-inducible protein (IP)-10 is a disease progression-related marker for non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Int* 2017; 11: 115–124.
24. Chang C-C, Wu C-L, Su W-W, et al. Interferon gamma-induced protein 10 is associated with insulin resistance and incident diabetes in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Sci Rep* 2015; 5: 10096.
25. Kirovski G, Dorn C, Weiss T, et al. Hepatic steatosis induces induction of the chemokine RANTES in the absence of significant hepatic inflammation. *Z Gastroenterol* 2010; 48: 675–680.
26. DiStefano JK. NAFLD and NASH in Postmenopausal Women: Implications for Diagnosis and Treatment. *Endocrinology* 2020; 161: 1–12.
27. Bedossa P. Pathology of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2017; 37: 85–89.

7. ANEXOS

A) Parecer Consubstanciado do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de biomarcadores circulantes para monitoramento da esteato-hepatite e fibrose na doença gordurosa hepática não alcoólica.

Pesquisador: Marjorie de Assis Golim

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 52621921.0.0000.5411

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.081.414

Apresentação do Projeto:

As informações apresentadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa.

A doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) é caracterizada pelo acúmulo de gordura em células hepáticas denominadas hepatócitos, sendo sua causa independente de fatores tais como abuso de álcool, incluindo também demais causas secundárias de esteatose hepática. Esta enfermidade encontra-se em elevada prevalência principalmente em indivíduos acometidos pela obesidade e síndrome metabólica. A NAFLD abrange duas variações dentro de seu espectro: incluindo a doença hepática gordurosa (NAFL) e a esteato-hepatite não alcoólica (NASH). A necessidade de execução da biópsia hepática para o diagnóstico da NASH é destacada como imprescindível, uma vez que, apenas este exame é capaz de diferenciar a NAFL da NASH. Todavia, é lembrado sobre uma das limitações deste exame como por exemplo a variabilidade amostral. Dentre as metodologias de imagem não invasivas para a avaliação das intercorrências associadas à NAFLD, destacam-se o uso da ultrassonografia (US) para a avaliação da esteatose hepática, metodologia esta considerada de baixo custo e que pode substituir a metodologia de ressonância magnética, considerada padrão ouro, mas que apresenta um elevado custo para a sua aplicação. Por outro lado, há também as metodologias baseadas em marcadores sorológicos que, além de serem mais aplicáveis para estudos de triagem de populações maiores, também já foram validados em indivíduos obesos e saudáveis. O presente projeto apresenta como objetivo a avaliação de

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

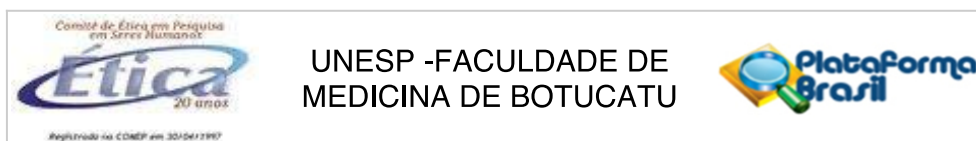
UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

CEP: 18.618-970

E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 5.081.414

diferentes parâmetros vinculados às enfermidades dentro do espectro da NAFLD para fins de identificação e caracterização de variáveis relevantes correlacionadas ao diagnóstico e progressão destas doenças. A pesquisa e testagem de variáveis circulantes tais como populações celulares, citocinas e parâmetros bioquímicos, poderão subsidiar a elaboração de novos modelos sejam eles de diagnóstico ou acompanhamento das enfermidades mencionadas, utilizando-se da aplicação de modelos estatísticos por “machine learning”.

Propõe-se para este projeto uma avaliação prospectiva de pacientes (n=200) que comparecerão ao ambulatório de Doença Gordurosa do Fígado, da disciplina de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, onde serão realizadas coletas de amostras para processamento. Serão coletados os resultados de exames referentes à avaliação de rotina de pacientes acometidos pela doença gordurosa não alcoólica, incluindo, a coleta de resultados de exames bioquímicos, de exames histopatológicos (biópsia hepática) e resultados de exames de imagem como ultrassonografia. Adicionalmente, serão coletadas amostras de sangue total (10mL) para a avaliação de imunofenotipagem celular e dosagens de citocinas/quimiocinas/TIMPs, exames esses a serem realizados no Laboratório de Citometria de Fluxo do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. Serão convidados a participar do estudo pacientes que derem entrada no referido serviço, no período de 01/11/2021 a 01/10/2025, até atingirmos n = 200 participantes. Serão incluídos pacientes em suspeita ou com diagnóstico para a doença hepática gordurosa não alcoólica, com indicação de biópsia hepática e avaliados por dois métodos indiretos (NFS - NASH Fatty Score e FIB4). Serão excluídos do estudo pacientes acometidos por outras doenças hepáticas; que tiveram redução de peso >10% nos 6 meses que antecedem a realização da biópsia e coleta de amostras; alcoólatras (Teste CAGE); uso de medicações esteatogênicas. Os pacientes serão estratificados em grupos de acordo com grau de fibrose hepática e/ou por NAFLD Activity Score (NAS – Kleiner et al., 2005). Neste escore são considerados parâmetros observados na análise histológica: percentual de esteatose hepática, presença e intensidade de inflamação lobular e de balonização. Quanto a presença ou ausência de esteatohepatite, os pacientes serão classificados em: NAS=0 a 2 – não NASH; NAS=3 a 4 – provável NASH; NAS5 – NASH. Quanto à avaliação de fibrose, pacientes classificados com NAS3 serão estratificados quanto ao grau de fibrose (F0, F1, F2, F3, F4). Dosagens da expressão sérica de inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) por ensaio multiplex com uso do kit LEGENDplex™ Human TIMP Panel (3-plex) para TIMP-1, TIMP-2, and TIMP-3. Para quantificação de quimiocinas por citometria de Fluxo será utilizado o kit CBA Human Chemokine Kit IL-8, RANTES, MIG, MCP-1, IP-10, seguindo as instruções do fabricante. Os dados foram analisados com uso do software FCAP Array®.

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

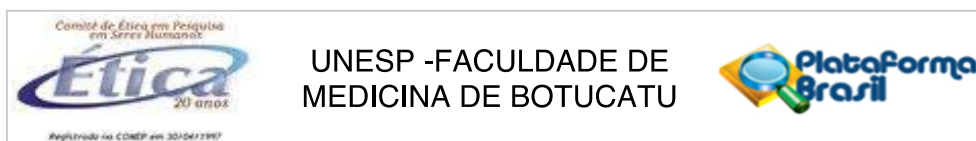
CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 5.081.414

Imunofenotipagens por citometria de fluxo. Serão avaliadas as frequências de subpopulações de monócitos circulantes, células NK, Linfócitos T e células dendríticas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Investigar biomarcadores circulantes que possam predizer o dano hepático induzido pela doença hepática gordurosa não alcoólica.

Objetivos Secundários:

- (1) Avaliar se há associação de parâmetros bioquímicos e imunológicos/inflamatórios com estadiamento da fibrose e a classificação NAS nos pacientes acometidos pela doença hepática gordurosa não alcoólica;
- (2) Aplicar modelos estatísticos baseados em metodologias de “machine learning” para fins de elaboração de algoritmos preditores do estadiamento hepático relacionado à doença hepática gordurosa não alcoólica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não há riscos aos participantes quanto aos procedimentos específicos da pesquisa. Apenas o risco eventual de formação de mancha vermelho arroxeadada na coleta de sangue, podendo haver dor local, a qual desaparecerá em um a dois dias.

Benefícios:

Este estudo não trará benefícios diretos aos participantes, no entanto, o conhecimento gerado poderá ajudar pesquisadores a entender melhor a dinâmica da doença gordurosa hepática não alcoólica e, no futuro, auxiliar no acompanhamento dos pacientes acometidos por esta doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa apresenta objetivos claros, metodologia bem descrita, avaliação de riscos e benefícios, sendo de relevância clínica, pois os achados deste estudo permitirão identificar biomarcadores que serão úteis na avaliação do dano hepático para fins de monitoramento da evolução da doença gordurosa hepática não alcoólica.

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

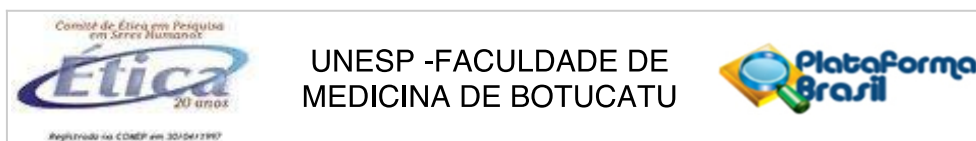
UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

CEP: 18.618-970

E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 5.081.414

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos de apresentação obrigatória:

- Folha de rosto: preenchida corretamente;
- Termo de Anuência Institucional da FMB-UNESP: anexado;
- Declaração de ciência e autorização do HC-FMB-UNESP: anexada;
- Declaração de ciência e autorização do Ambulatório de Doença Gordurosa do Fígado: anexada;
- Declaração de ciência e autorização do Laboratório de Biotecnologia Aplicada (LBA): anexada;
- Regulamento Funcional do Biorrepositório: preenchido corretamente;
- Informações básicas do projeto e projeto completo: adequados e completos;
- TCLE: elaborado na forma de convite; escrito em linguagem clara; explica os objetivos da pesquisa e os procedimentos que serão realizados; apresenta garantia do sigilo dos dados pelos pesquisadores; descreve riscos e benefícios em participar; apresenta nome, endereço, telefone e e-mails dos pesquisadores; apresenta telefones, endereço e horários de funcionamento do Comitê de Ética em Pesquisa da FMB-UNESP;
- Cronograma de execução: a coleta de dados está programada para iniciar em 11/2021.

Recomendações:

Após o término do projeto de pesquisa, enviar o Relatório Final de Atividades via Plataforma Brasil.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise em REUNIÃO ORDINÁRIA, o Colegiado deliberou APROVAÇÃO do PROJETO de Pesquisa apresentado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberação do Colegiado, em REUNIÃO ORDINÁRIA do Comitê de Ética em Pesquisa FMB/UNESP, realizada em 03/11/2021, do PROJETO de Pesquisa apresentado encontra-se APROVADO. O projeto de pesquisa deverá ter início somente após aprovação deste CEP.

Ao final da execução da pesquisa, o Pesquisador deverá enviar o Relatório Final de Atividades, na forma de Notificação, via Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Comitê de Ética em Pesquisa FMB/UNESP

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

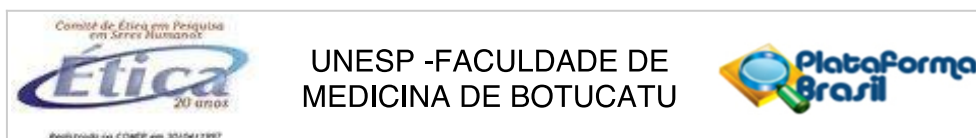
UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

CEP: 18.618-970

E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 5.081.414

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1790599.pdf	05/10/2021 13:43:06		Aceito
Outros	biorrepositorioDGF.docx	05/10/2021 13:41:23	Marjorie de Assis Golim	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	repositorioDGF.pdf	05/10/2021 10:57:59	Marjorie de Assis Golim	Aceito
Outros	AnuenciaDrGiovanni.pdf	04/10/2021 15:00:51	Marjorie de Assis Golim	Aceito
Outros	AnuenciaLBA.pdf	04/10/2021 15:00:13	Marjorie de Assis Golim	Aceito
Outros	AnuenciaHcfmbSipe3402021.pdf	04/10/2021 14:58:19	Marjorie de Assis Golim	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDGF.pdf	04/10/2021 14:57:24	Marjorie de Assis Golim	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TermoDeAnuenciaInstitucional.pdf	04/10/2021 14:55:03	Marjorie de Assis Golim	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLERodrigoCEP.pdf	04/10/2021 14:54:17	Marjorie de Assis Golim	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRostoAssinada.pdf	04/10/2021 14:53:47	Marjorie de Assis Golim	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BOTUCATU, 05 de Novembro de 2021

Assinado por:
Trajano Sardenberg
 (Coordenador(a))

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

CEP: 18.618-970

E-mail: cep@fmb.unesp.br

B) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) RESOLUÇÃO 466/2012

CONVIDO, o(a) senhor(a) _____, portador do CPF _____ para participar do Projeto de Pesquisa intitulado "*Avaliação de biomarcadores circulantes para monitoramento da esteato-hepatite e fibrose na doença gordurosa hepática não alcoólica*", que será desenvolvido por mim: Rodrigo Santos Lima, biomédico e aluno de doutorado do Programa de Pós-graduação em Patologia; orientado pela Profa. Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto, farmacêutica e docente do referido programa de pós-graduação e coorientado pela Prof. Marjorie de Assis Golim, do programa de pós-graduação em Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica.

Estou estudando como a doença gordurosa hepática não alcoólica é capaz de alterar a resposta imune e sua capacidade de modular a expressão de citocinas/quimiocinas, a fim de identificar marcadores laboratoriais não invasivos preditores de lesões hepáticas.

O sangue tem uma parte celular e outra líquida, conhecida como plasma, que possui diversos compostos entre eles proteínas como citocinas/quimiocinas e células que fazem parte do sistema imune, que ajudam na defesa do organismo. A identificação de componentes sanguíneos é de elevada importância para o entendimento da doença gordurosa hepática não alcoólica e o desfecho clínico da mesma. Desta forma, queremos entender o perfil destes componentes sanguíneos, a fim de correlacionar os mesmos com os estágios de progressão da doença. Estes marcadores poderiam compor novos exames para a avaliação não invasiva do paciente acometido pela doença gordurosa hepática não alcoólica? Novos exames com estes marcadores podem vir a substituir a necessidade de biópsia hepática no futuro? Ou ainda, a execução destes exames poderá auxiliar o acompanhamento destes pacientes?

Para que eu possa realizar este estudo preciso de uma amostra de 10mL de seu sangue, que será coletado por profissional habilitado e com material estéril de uso único, em um único momento. Após o término do estudo, não havendo dúvidas sobre os resultados, todas as amostras serão descartadas segundo as normas sanitárias. O risco com a coleta de sangue é a picada da agulha, podendo haver dor local, e eventualmente formação de mancha vermelho arroxeada, que desaparecerá em um a dois dias.

Este estudo não trará benefícios diretos para o Sr(a); no entanto, o conhecimento gerado poderá ajudar pesquisadores a entender melhor a dinâmica da doença gordurosa hepática não alcoólica e, no futuro, permitir a criação de novos exames de acompanhamento dos pacientes acometidos por esta doença. Fique ciente de que sua participação neste estudo é voluntária e que mesmo após ter dado seu consentimento para participar da pesquisa, você poderá retirá-lo a qualquer momento, sem qualquer

prejuízo para o sr (a).

Qualquer dúvida adicional você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa através dos telefones (14) 3880-1608 ou 3880-1609 que funciona de 2ª a 6ª feira das 08:00 às 11:30 e das 14:00 às 17 horas, na Chácara Butignolli s/no em Rubião Júnior – Botucatu - São Paulo. Os dados de localização dos pesquisadores estão abaixo descritos.

Após terem sido sanadas todas minhas dúvidas a respeito deste estudo, CONCORDO EM PARTICIPAR de forma voluntária, estando ciente que todos os meus dados estarão resguardados através do sigilo que os pesquisadores se comprometeram. Estou ciente que os resultados desse estudo poderão ser publicados em revistas científicas, sem no entanto, que minha identidade seja revelada.

Botucatu, ____ de _____ de _____.

(nome e assinatura do participante)

(nome e assinatura do responsável da pesquisa)

Rodrigo Santos Lima
Endereço: Av. Prof. Mario Rubens Guimaraes Montenegro, S/Nº Campus da UNESP
Laboratório de Biotecnologia Aplicada
Telefone: (014) 3811-6041 ramal 231
Email: rodrigo.s.lima@unesp.br

Nome: Profa. Dra. Márcjorie de Assis Golim
Endereço: Av. Prof. Mario Rubens Guimaraes Montenegro, S/Nº Campus da UNESP
Laboratório de Biotecnologia Aplicada
Telefone: (014) 3811-6041 ramal 227
Email: marjorie.golim@unesp.br