

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Jorge António Monteiro de Carvalho Pratas Leitão

ESTIMATIVA DA PREVALÊNCIA DA  
ESTEATOSE HEPÁTICA EM PORTUGAL E  
AVALIAÇÃO DOS FATORES DE RISCO

Tese no âmbito do doutoramento em Ciências da Saúde, ramo de  
Medicina, orientada pelo Professor Doutor Armando Simões Pereira de  
Carvalho e pela Professora Doutora Helena Maria Ramos Marques  
Coelho Cortez-Pinto, apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de Coimbra

Março de 2023



Jorge António Monteiro de Carvalho Pratas Leitão

Estimativa da Prevalência da Esteatose Hepática em  
Portugal e Avaliação dos Fatores de Risco

Março de 2023



À São  
Ao Miguel, ao Tiago e ao João

À memória do meu Pai  
À minha Mãe

À minha Família

Ao Professor Doutor Armando Carvalho  
À Professora Doutora Helena Cortez-Pinto

Aos meus Mestres  
Aos meus amigos

## **Prefácio**

Foi ainda como aluno da Faculdade de Medicina, que, a par da vocação por uma especialidade clínica, amadureceu o gosto pela descoberta científica, ambos alicerçados na vontade e necessidade que sempre sentiu de maior conhecimento, para melhor poder exercer e servir. Se a noção do ser humano como um todo o levou a escolher a Medicina Interna, o gosto pelo entendimento dos mecanismos fisiopatológicos foi decisivo para a docência na Faculdade de Medicina. Embora numa área “básica”, foi fundamental para o entendimento da fisiopatologia e da clínica diária, lembrando-lhe sempre que a complexidade dos organismos resulta da simultaneidade de múltiplos processos simples. A docência, além do regozijo de ensinar e ver crescer, obrigou-o a um rigor e aprendizagem contínuos, mantendo um espírito aberto, mas crítico. Quando surgiu o desafio do Doutoramento, encarou-o com naturalidade e como uma oportunidade de ascender a um patamar superior de conhecimento, numa área pela qual nutriu desde sempre particular interesse.

À distância, tem perfeita noção de que essas bases cresceram aquando da sua formação pós-graduada, no então Serviço de Medicina III dos Hospitais da Universidade de Coimbra, no Internato Geral e sobretudo no Internato Complementar de Medicina Interna, onde germinou, cresceu e amadureceu, o gosto pela patologia hepática. Para isso, foram decisivos os ensinamentos, a experiência e o estímulo que recebeu do convívio diário com os vários colegas e as discussões científicas a que começou por assistir e onde depois pode participar. Além da oportunidade de aprendizagem, inculcaram-lhe a noção que o conhecimento médico tem como premissas o serviço ao doente, a exigência e a procura diária de respostas aos desafios que nos são apresentados. A todos os colegas e aos doentes agradece penhoradamente.

Ao senhor Professor Doutor Armando Porto, mestre na escola médica e na clínica, agradece todos os ensinamentos, recordando a forma serena e ponderada de aplicar os conhecimentos, o conselho sábio, no tempo certo e a disponibilidade que sempre lhe dispensou. Ao senhor Professor Doutor Rui Perdigoto, primeiro Assistente Hospitalar com quem trabalhou durante o internato, agradece o empenho e estímulo permanentes, a motivação, a dedicação ao conhecimento e a orientação para os primeiros trabalhos científicos na área da Hepatologia.

A partir daí, trabalhou diretamente com o senhor Professor Doutor Armando Carvalho, ao qual se mantém ligado profissional e academicamente, até ao presente, recordando

com agrado, o primeiro contato na disciplina de Bacteriologia e Parasitologia, na licenciatura, onde foi seu docente das aulas práticas. Ao longo dos anos, foi um exemplo permanente de dedicação, bom senso, disponibilidade e procura de graus cada vez maiores de conhecimento. A ele agradece a orientação, primeiro no Internato de Medicina Interna, depois já Assistente Hospitalar, como Chefe de Serviço e por fim, a motivação, ajuda e orientação para este trabalho. Do tempo partilhado, recorda e agradece a amizade, os conselhos profissionais e não só, que sempre ouviu e tomou como referência.

Ao então Diretor de Serviço, o senhor Professor Doutor Nascimento Costa, agradece o encorajamento no começo do Doutorado, o convite para a tutorização dos alunos do 6º ano da Faculdade de Medicina, que desempenha ainda de forma voluntária, mas com total dedicação e toda a amizade que sempre lhe dispensou.

Um agradecimento especial para o senhor Professor Doutor Adriano Rodrigues, pelo honroso convite, em 1994 para a docência na Faculdade de Medicina de Coimbra, primeiro na disciplina de Química Fisiológica e depois de Bioquímica, permitindo-lhe a satisfação de poder conciliar a clínica com o desafio e o estímulo do ensino. Um reconhecimento sincero também pela amizade com que sempre o distinguiu.

Não pode deixar de mencionar duas figuras tutelares, que assumiram um papel marcante na sua formação e amadurecimento. Os senhores Drs. Eurico Almiro e Francisco Severo, seus mestres na Medicina III dos HUC, exemplos de dedicação, seriedade, exigência e competência, mas também de amizade e reconhecimento, a cujas memórias, presta sentida homenagem e um profundo agradecimento.

Teve ainda o raro privilégio de poder lecionar na Faculdade de Medicina, sob a orientação da senhora Professora Doutora Catarina Oliveira, pessoa ímpar, da qual recorda entre outros, o exemplo humano e o elevado nível científico e de exigência e a quem agradece o estímulo e o apoio para o Doutorado, além da amizade que sempre lhe dispensou.

A relevância crescente da doença hepática metabólica, em especial da esteatose hepática e da esteatohepatite, desde cedo lhe suscitaram grande atenção, potenciado pela ligação ao ensino da Bioquímica e pelo interesse nos metabolismos hepáticos.

O facto da esteatose hepática, patologia antiga, mas ainda desconhecida em vários dos seus aspetos, ser uma entidade sobre a qual não havia estudos populacionais, que permitissem conhecer a realidade nacional, não necessariamente igual à conhecida de outros países, ou regiões, esteve na génese deste trabalho. Para tal, foram fundamentais a colaboração de vários centros e a conjugação de muitas boas vontades. Desde logo, o trabalho não teria sido possível sem o empenho, o estímulo e a dedicação da senhora

Professora Doutora Helena Cortez-Pinto, referência na Hepatologia nacional e internacional, em particular na esteatohepatite, a quem agradece com profunda gratidão a orientação e ajuda preciosas, que em conjunto com o senhor Professor Doutor Armando Carvalho, foram imprescindíveis para a realização deste trabalho. Para a sua concretização, foram ainda determinantes as parcerias com os vários centros nacionais, aos quais agradece toda a ajuda e colaboração, sem os quais não teria sido possível a sua realização. Para além do desafio e das dificuldades inerentes, ficam a enorme satisfação pelas várias colaborações e pelos laços profissionais e humanos que daí resultaram e que espera perdurem.

Ao senhor Professor Doutor Vítor Rodrigues, responsável pela tutorização no Programa de Doutoramento, agradece o apoio e os ensinamentos fundamentais para a execução deste trabalho.

Agradece à equipe do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) e nomeadamente às senhoras Professoras Doutoradas Mafalda Bourbon e Catarina Alves e à equipa de campo do INSA toda a prestimosa e dedicada ajuda, imprescindível, para a efetivação do trabalho.

A todos os que nos vários centros participaram neste trabalho, com empenho, esforço desinteressado e espírito de serviço, muitas vezes a par da atividade clínica, deixa um profundo agradecimento, que lhe será sempre difícil de retribuir. Em particular, agradece à senhora Professora Doutora Helena Cortez-Pinto e à Dr<sup>a</sup> Sofia Carvalhana, do Hospital de Santa Maria, na região de Lisboa. Na região Norte, agradece a colaboração da Dr<sup>a</sup> Ana Paula Silva, do Hospital de Vila Nova de Gaia. Na região centro assumiu a orientação dos participantes em conjunto com o senhor Professor Doutor Armando Carvalho, mas enaltece e agradece a ajuda do Dr. Filipe Breda e da Dr<sup>a</sup>. Joana Cochicho, nas várias tarefas. Na região do Algarve, agradece a colaboração do Dr. Francisco Velasco e da Dr<sup>a</sup> Carolina Vaz. No Alentejo, agradece a colaboração da Dr<sup>a</sup> Isabel Medeiros. Em todas as regiões agradece ainda a colaboração da vasta equipa de nutricionistas e dos colegas de Imagiologia, em particular ao senhor Professor Doutor Filipe Caseiro Alves e ao Dr. Pedro Oliveira, do CHUC, pela sua permanente disponibilidade e ajuda, sem a qual não teria conseguido os seus intentos.

À senhora Professora Doutora Bárbara Oliveiros agradece a análise estatística, parte fundamental do trabalho, mas também toda a disponibilidade que sempre nos dispensou. Igualmente agradece o trabalho da equipa do Centro de Estudos de Medicina Baseada na Evidência, da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, nomeadamente à

senhora Professora Doutora Filipa Sampaio e à senhora Dr<sup>a</sup> Rita Sousa, pela colaboração no tratamento dos dados constantes numa das publicações.

Apesar de toda a motivação, o esforço pessoal a que se dispôs ao iniciar este caminho, mantendo as suas atividades, clínica e docente, só foram possíveis pela ajuda e sacrifícios familiares que testemunhou ao longo deste tempo. Para a São, o Miguel, o Tiago e o João, o seu porto de abrigo, as palavras nunca serão suficientes para expressar a gratidão pelo seu amor e disponibilidade constantes, nos bons e nos maus momentos. A sua presença foi sempre um esteio e uma fonte de alento e de coragem.

Ao meu Pai agradeço os exemplos de dedicação, retidão, bom senso e fé, que sempre punha em tudo e que desde cedo nos transmitiu, estimulando permanentemente a potencialização das capacidades e fomentando a ideia de que é sempre possível ir mais além. Apesar de ausente fisicamente, a sua memória e os seus ensinamentos perdurarão para sempre nos nossos corações. À minha Mãe agradeço o seu enorme amor e exemplo de sacrifício, trabalho, dedicação e partilha. Ao Joaquim, meu irmão, deixo um agradecimento pela amizade e disponibilidade permanentes.

Aos meus colegas e amigos agradeço a amizade constante.

Aos meus doentes, companheiros de viagem e credores da minha amizade, o meu obrigado pela confiança depositada e ajuda ao meu crescimento, como médico e como homem. A sua presença deu a imprescindível dimensão humana, sem a qual o conhecimento científico não faz qualquer sentido.

## Índice:

Abreviaturas .....	3
Resumo .....	7
<b>Capítulo 1. Introdução .....</b>	<b>11</b>
1. Relevância da EH.....	12
2. Epidemiologia do fígado gordo não alcoólico.....	15
2.1. Incidência.....	15
2.2. Prevalência.....	16
2.3. Prevalência do FGNA em idade pediátrica.....	19
3. Da esteatose à esteatohepatite não alcoólica .....	21
3.1. Sobrecarga hepática de lípidos e resistência à insulina .....	21
3.2. Contribuição do colesterol e doutros lípidos .....	28
3.3. Frutose: um hidrato de carbono cada vez mais relevante .....	28
3.4. Participação dos diferentes organelos celulares.....	30
3.5. Relevância da sobrecarga de ferro no fígado gordo não alcoólico .....	32
3.6. Tecido adiposo e esteatohepatite não alcoólica (EHNA) .....	35
3.7. Imunidade inata e EHNA.....	37
3.8. Relevância do eixo intestino-fígado na EHNA.....	39
3.9. Vitamina D e FGNA.....	44
3.10. FGNA: doença determinada geneticamente?.....	46
4. Diagnóstico .....	50
5. Associação do FGNA com doença extra-hepática e outras condições .....	55
6. Tratamento.....	60
<b>Capítulo 2. Objetivos, material e métodos .....</b>	<b>71</b>
1. Objetivos .....	72
2. Desenho do estudo .....	72
2.1. Seleção dos participantes.....	72
2.1.1. Estudo e_Cor.....	73
2.1.2. Estudo da prevalência da EH.....	74
3. Critérios de inclusão .....	75
4. Critérios de exclusão.....	75

5. Procedimentos .....	75
6. Análise estatística .....	79
<b>Capítulo 3. Resultados.....</b>	<b>81</b>
1. Dados demográficos.....	82
2. Prevalência da EH na população adulta portuguesa .....	83
2.1. Fatores de risco: análise univariada.....	84
2.2. Fatores de risco: análise multivariada (regressão logística) .....	92
2.3. Relação da EH com os valores de elastografia hepática transitória.....	93
3. Comparação dos participantes com EH não alcoólica e EH alcoólica .....	94
3.1. Dados demográficos e clínicos .....	94
3.2. Fatores de risco .....	95
3.2.1. Grupo EH.....	95
3.2.2. Grupo FGNA.....	95
3.3. Dados de mortalidade .....	96
3.4. Discussão .....	96
3.5. Conclusões .....	100
4. Correlação entre a vitamina D sérica e a prevalência da EH .....	105
4.1. Participantes e métodos .....	105
4.2. Resultados .....	105
4.3. Discussão .....	108
4.4. Conclusões .....	109
5. Análise das causas de EH nos participantes sem consumo alcoólico .....	110
5.1 Resultados.....	110
5.2 Discussão .....	117
<b>Capítulo 4. Discussão.....</b>	<b>119</b>
<b>Capítulo 5. Conclusões .....</b>	<b>127</b>
<b>Apêndice.....</b>	<b>131</b>
<b>Bibliografia .....</b>	<b>135</b>

**Abreviaturas (por ordem alfabética):**

AAT: alfa-1-antitripsina

ApoA: apolipoproteína A1

ApoB: apolipoproteína B

ADN: ácido desoxirribonucleico

AGL: ácidos gordos livres

AGT: Ácidos gordos insaturados trans

AGS: ácidos gordos poli-insaturados, ou PUFA: *Polyunsaturated fatty acids*

ALT: alanina aminotransferase

AMP: adenosina monofosfato

ARFI: *Acoustic Radiation Force Impulse*

AST: aspartato aminotransferase

ATP: adenosina trifosfato

AUROC: *Area Under Receiver Operating Characteristic Curve*

C/EBP: CCAAT/*Enhancer Binding Protein*

CAP: *Controlled Attenuation Parameter*

Células NK: células “*natural killer*”

ChREBP: *carbohydrate response element binding protein*

CK18: citoqueratina 18

CoA: Co-enzima A

C-HDL: colesterol HDL

C-Total: colesterol total

CYP2E1: citocromo 2E1

DAGT: diacilglicerol aciltransferase

DALYs: *Disability-adjusted life years*

DAMPs: *damage-associated molecular patterns*

DHA: doença hepática alcoólica

DIOS: *Dysmetabolic Iron Overload Syndrome*

DG: Diabetes gestacional

DCV: doença cardiovascular

DM2: Diabetes *mellitus* tipo 2

ELF: *European Liver Fibrosis Study Group*

EHNA: Esteatohepatite não Alcoólica

FG: fígado gordo  
FGNA: fígado gordo não alcoólico  
*Fiaf: Fast Induced adipocit factor* (factor adipocitário induzido pelo jejum)  
FLI: *Fatty Liver Index*  
GCKR: gene da proteína reguladora da glucocinase  
GGT: Gama-Glutamiltranspeptidase  
GJ: glicemia em jejum  
GMI: Gordura Mono-insaturada  
GPI: Gordura Poli-insaturada  
GS: Gordura saturada  
GWAS: *Genome Wide Association Studies*  
HFE: hemocromatose  
HMG-CoA: Hidroxi-metil-glutaril Coenzima A redutase  
H-MRS: espectroscopia  
HNE: 4-hidroxi-2-nenonal  
HGJ: hiperglicemia em jejum  
IC 95%: intervalo de confiança de 95%  
ICD: *International Classification of Diseases*  
IFN- $\gamma$ : interferon  $\gamma$   
IL: interleucina  
IL-1 $\beta$ : interleucina-1 $\beta$   
IMC: índice de massa corporal  
IPAQ: *International Physical Activity Questionnaire*  
IR: insulino resistência  
IOG: intolerância à glicose oral  
JNK: cinase, ou, *Jun N-terminal Kinase*  
Kcal: quilocalorias  
KLF6: *Krueppel-like factor 6*  
LDL: *Low Density Lipoproteins* (Lipoproteínas de baixa densidade)  
LEPR: gene de codificante da leptina  
LPS: lipopolissacáridos  
MCP-1: proteína quimiotática dos monócitos  
MDA: malonilaldeído

MAFLD: *Metabolic-Associated Fatty Liver Disease*  
NAD: adenina dinucleótido  
NAFLD: *Nonalcoholic Fatty Liver Disease*  
NAS: *NASH Activity Score*  
NASH: *Nonalcoholic steatohepatitis*  
NF- $\kappa$ B: Factor de Necrose Tumoral  $\kappa$ B  
NKT: “*natural Killer T cells*”  
NLR: *Nucleotide-binding domain Leucine-rich-repeat containing receptors*  
NOD: *Nucleotide-binding oligomerization domain*  
OCA: Ácido Obetecólico  
OMS: Organização Mundial de Saúde  
PA: perímetro abdominal  
PAI-1: Inibidor do Ativador do Plasminogénio  
PAMPs: *pathogen-associated molecular patterns*  
PCR: proteína C reativa  
PEMT: fosfatidiletanolamina *N*-metiltransferase  
PKC: proteína cinase  
PNPLA3: “*Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3*”  
PPAR: *Peroxisome proliferator-activated receptor*  
PPP1R3B *protein phosphatase 1 regulatory subunit 3B*  
RE: retículo endoplasmático  
RM: Ressonância Magnética  
ROS: radicais livres de oxigénio  
SM: síndrome metabólica  
SNP: *single nucleotide polymorphism*  
SOD2: superóxido dismutase tipo 2 mitocondrial  
SREBP: *Sterol Regulatory Element-Binding Protein*  
TC: tomografia computadorizada  
TAD: tensão arterial diastólica  
TAS: tensão arterial sistólica  
TG: triglicéridos  
TGF- $\beta$ <sub>1</sub>: *transforming growth factor- $\beta$ <sub>1</sub>*  
TLRs: *Mammalian Toll-like Receptors* (receptores tipo Toll)

TNF $\alpha$ : *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* , (Factor de Necrose Tumoral- $\alpha$ )

UMA: unidades maço ano

UPR: *unfolded protein response*

VLDL: *Very Low Density Lipoproteins* (Lipoproteínas de muito baixa densidade)

## RESUMO

### **Introdução:**

Sendo conhecida há muito tempo, a Esteatose Hepática (EH) ganhou protagonismo crescente nas últimas décadas. Primeiro, pelo incremento da sua prevalência, na sequência do aumento da prevalência de fatores de risco como a obesidade, a diabetes mellitus tipo 2, a sobrenutrição, as alterações dos padrões alimentares e a diminuição da atividade física, sobretudo nas sociedades ocidentalizadas, já com contornos epidémicos para muitos desses fatores e em muitas regiões. Por outro lado, a frequência das formas avançadas da doença, em tudo semelhante às outras patologias hepáticas crónicas, motivou que seja já a principal hepatopatia crónica em muitos países, em frequência, gravidade ou custos.

Sem recomendações das principais sociedades científicas para rastreio da população em geral e com um deficit de diagnósticos pós internamento, por via das classificações das doenças em uso internacionalmente (*ICD, International Classification of Diseases*), sobretudo das fases mais tardias e gravosas da doença, a sua verdadeira dimensão estará ainda certamente subavaliada.

A sua associação e eventual inclusão nos fatores de risco para doenças cardiometabólicas aumenta a relevância do diagnóstico precoce e da correção dos fatores de risco. Esta importância é ainda maior, dada a ausência de terapêutica específica, quer nas fases iniciais, onde a prevenção e a correção dos fatores de risco são preponderantes, quer nas fases avançadas, onde faltam ainda medicamentos comprovadamente eficazes e seguros para a fibrose e a inflamação, hepática e sistémica.

Por tudo isto, a sua prevenção é cada vez mais importante, sendo para isso fundamental o conhecimento da realidade nacional. O objetivo principal do trabalho foi estimar a prevalência da EH na população adulta portuguesa e os objetivos secundários, foram a identificação dos principais fatores de risco.

### **Material e métodos:**

Estudo transversal, voluntário, multicêntrico, baseado na população portuguesa adulta (dos 18 aos 80 anos) residente no continente, não ajustado para a idade ou sexo, inscrita no Registo Nacional de Utentes, (base de dados de referência dos Utentes do Serviço Nacional de Saúde).

Com um valor previsível de 25% (segundo a literatura), um erro de 3% e um significado estatístico de 5%, foi calculada uma amostra de 800 participantes, com base no CENSOS 2011, considerada representativa da população adulta portuguesa.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e todos os participantes assinaram um consentimento informado previamente à inclusão no estudo.

Foram excluídos os indivíduos que recusaram participar, mulheres com gravidez há menos de 9 meses ou puerpério há menos de 3 meses, participantes que não falassem ou entendessem português, com doença mental, ou residentes fora da região. Aqueles que não foi possível contactar, após 3 tentativas em horas e dias diferentes, foram substituídos pelo seguinte na lista.

Os que aceitaram participar foram avaliados após cerca de 12 horas de jejum. Foram colhidos os dados biográficos, uma história médica, incluindo medicação atual ou crônica, hábitos tabágicos (unidades maço ano - UMA) e alcoólicos (gramas/dia). O consumo de álcool foi considerado excessivo acima de 20 gramas/dia nas mulheres e 30 gramas/dia nos homens. O exercício físico foi avaliado usando o IPAQ (*International Physical Activity Questionnaire: 12-Country Reliability and Validity*), validado para estudos populacionais.

Foi efetuado o exame físico, incluindo pressão arterial sistólica e diastólica, peso, altura e cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC).

Posteriormente, foi feita colheita de sangue para as diversas análises, incluindo glicemia, insulinemia em jejum, colesterolemia total e HDL (lipoproteínas de alta densidade), trigliceridemia, Apolipoproteína A1 e Apolipoproteína B (ApoB e ApoA1), creatininemia, aminotransferases (AST e ALT), gama-glutamil transpeptidase (GGT) e vitamina D sérica (VD). As amostras sanguíneas foram prontamente encaminhadas para o laboratório do Instituto Nacional de Saúde Pública, onde as análises foram efetuadas.

Por fim, os participantes que aceitaram participar no estudo de prevalência de esteatose hepática, foram avaliados no hospital designado, conforme a zona de residência, onde um nutricionista efetuou um questionário de frequência alimentar (QFA), aprovado para a população portuguesa e posteriormente submetido a leitura ótica e convertido em quantidades de macro e micronutrientes. Na mesma ocasião foi realizada uma ecografia abdominal para diagnóstico e quantificação da EH, segundo a classificação proposta por Hamaguchi, assumindo-se o diagnóstico de esteatose com uma pontuação de 2 ou mais pontos.

Os dados foram descritos em tabelas de frequência e respectivas percentagens (variáveis categóricas), médias e desvio padrão. Foi feita a distribuição das frequências das variáveis, intervalos de confiança das médias, proporções e taxas, cálculos dos *odds ratio* (OR) individuais e regressão logística para cálculo dos fatores predizentes.

Para determinar as causas mais frequentes da EH, foram efetuadas análise univariada, para as variáveis qualitativas e quantitativas, e análise multivariada.

A análise estatística foi feita recorrendo à aplicação SPSS, versão 23, e os testes estatísticos foram analisados ao nível de significância de 5%.

### **Resultados:**

Foram incluídos 834 participantes, 440 do sexo masculino (52,8%) e idade média de 49,8 ± 17,16 anos.

Foi diagnosticada a presença de EH em 302, correspondendo a 36,21%, (IC95%: 32,95% a 39,47%). A prevalência ajustada à idade, região e sexo, segundo o Censos 2011, foi de 37,8%. No total dos 834 participantes, 138 (16,5%), tinham critérios para fígado gordo não alcoólico (FGNA), 17% (IC95%: 14,5% a 19,5%), após ajuste para a idade, sexo e região, segundo o Censos.

Considerando apenas os participantes sem consumo alcoólico, ou com consumo inferior aos limites considerados, a prevalência da EH foi de 28,7% (IC95%: 24,8 a 32,5%), 31,2%, após ajuste à população, segundo o Censos.

Em toda a amostra, a prevalência da EH foi de 25,63% nas mulheres e de 45,68%, nos homens. Houve uma subida progressiva com a idade, tendo os participantes com EH mais 10 anos, em média, do que os sem EH (55,7 vs 46,5 anos respetivamente,  $p < 0,001$ ). O sexo masculino foi fator de risco: OR 2,44; IC95%: 2,151 a 2,729 ( $p < 0,001$ ). Analisando apenas o grupo com critérios para FGNA, a distribuição da EH pelos dois sexos foi semelhante.

No exame físico foram identificados vários fatores de risco para a EH. O IMC  $\geq 30$  Kg/m<sup>2</sup> (obesidade), teve um OR de 5,40 (IC95%: 5,142 a 5,678) e o de 25 a 30 Kg/m<sup>2</sup> (excesso de peso), um OR de 1,252 (IC95%: 1,216 a 1,288). A média do IMC foi superior nos participantes com EH ( $p < 0,001$ ), bem como o peso médio, em ambos os sexos ( $p < 0,001$ ). A hipertensão arterial, sistólica e diastólica, também se associou à presença de EH ( $p < 0,001$ ).

Não houve associação com a atividade física ( $p = 0,639$ ) e houve correlação pouco significativa com os hábitos tabágicos (nos não fumadores e nos fumadores habituais, ORs de 1,198 e 1,277, respetivamente). A medicação crónica potencialmente causadora de EH associou-se significativamente a EH ( $p = 0,031$ ), com um OR de 2,025 (IC95%: 1,384 a 2,666).

Na amostra global, o consumo alcoólico exagerado foi fator de risco para EH nos homens ( $p < 0,001$ ), com um OR de 2,389 (IC95%: 2,098 a 2,68).

Várias alterações laboratoriais foram identificadas como fatores de risco: OR de 4,089 (IC95%: 3,769 a 4,409) ( $p < 0,001$ ) para glicémias  $> 100$  mg/dl e OR de 5,826 (IC95%: 5,52 a 6,132) para um teste de HOMA  $> 2,5$ . As insulinémias em jejum foram significativamente superiores nos indivíduos com EH ( $p < 0,001$ ). A hipertrigliceridemia ( $> 150$  mg/dl) revelou um OR de 4,592 (IC95%: 4,230 a 4,954) e o colesterol HDL baixo ( $< 40$  mg/dl no sexo masculino e  $< 50$  mg/dl no sexo feminino) teve um OR de 2,597 (IC95%: 2,261 a 2,933), todos associados à presença de EH ( $p < 0,001$ ). Os participantes com EH tiveram valores médios de glicemia, colesterolemia total e LDL, insulínia em jejum, AST, ALT e GGT superiores e com significado estatístico.

As relações ApoB/ApoA1, consideradas fator de risco alto ou intermédio para doença coronária, associaram-se a ORs de 1,877 (IC95%: 1,632 a 2,122) e de 1,107 (IC95%: 1,067 a 1,147), respetivamente, para a EH. Os valores médios da ApoA1 e da ApoB nas mulheres com EH foram, em média, superiores aos daquelas sem EH ( $p = 0,002$  e  $0,001$  respetivamente). Nos homens apenas houve significado estatístico na ApoB, maior nos participantes com EH ( $p = 0,002$ ). A presença da SM revelou uma associação muito significativa com a EH e a sua presença representou um OR de 5,934 (IC95%: 5,581 a 6,287), ( $p < 0,001$ ).

As aminotransferases associaram-se significativamente à EH: ALT ( $p < 0,001$ ) e AST ( $p < 0,003$ ).

A ingestão diária de calorias foi superior nos indivíduos com EH apenas na análise da amostra global, mas a ingestão de macro e micronutrientes totais, diários, não foi significativamente diferente nos participantes, com e sem EH, em todas as análises.

Na análise de multivariáveis, tiveram associação significativa com a presença de EH, a idade na faixa dos 35 aos 64 anos ( $p = 0,015$ , OR: 1,938), a obesidade ( $p < 0,001$ , OR de

8,090), o excesso de peso ( $p < 0,001$ , OR de 3,591), a ingestão excessiva de álcool ( $p = 0,002$ , OR: 1,877) a relação ApoB/ApoA1 de alto risco ( $p = 0,02$ , OR: 2,011), a presença de insulino resistência ( $p < 0,001$ , OR: 2,255), a hipertrigliceridemia ( $p = 0,001$ , OR: 2,234) e o colesterol HDL inferior ao normal ( $p = 0,024$ , OR: 1,728). A GGT associou-se à presença de EH ( $p = 0,001$ , OR: 1,01). A frutose mostrou um “ $p$ ” de 0,001, mas com valores superiores nos participantes sem EH e o OR para EH foi de 0,981 (de 0,970 a 0,992).

A VD sérica média foi  $26,0 \pm 9,8$  ng/ml, com apenas 31,6% dos participantes com mais de 30 ng/ml (considerado genericamente o valor normal) e não houve diferenças dos valores médios, nos dois sexos, ou segundo a estação do ano da colheita das amostras sanguíneas (verão *vs* inverno). Não houve diferença nos níveis séricos dos participantes, com ou sem EH ( $p = 0,071$ ), nem em qualquer um dos níveis séricos de VD ( $p = 0,086$ ), mesmo quando analisados os participantes com níveis inferiores a 12 ng/ml (considerados muito baixos),  $p = 0,587$ . Os participantes obesos ( $IMC \geq 30$  kg/m<sup>2</sup>) tinham níveis de VD inferiores, aos restantes ( $p < 0,001$ ), mas não houve correlação entre o IMC e a VD ( $r = -0,193$ ). A VD associou-se à SM apenas nos participantes sem EH ( $p < 0,001$ ). Não foi encontrada correlação entre a VD, a ingestão da VD pelo QFA, ( $r = 0,075$ ,  $p = 0,383$ ) e a atividade física ( $p = 0,619$ ). Também não foi encontrada relação entre a ingestão de álcool, a VD sérica e a presença ou ausência de EH ( $p = 0,340$ ).

## Conclusões

O primeiro destaque é para o elevado valor global de prevalência de EH (37,8%). Após exclusão do consumo alcoólico excessivo e de hepatites virais foi de apenas 17%, correspondendo à prevalência estimada do FGNA. Embora a prevalência global seja considerável, a do FGNA foi inferior aos dados conhecidos até ao momento, nomeadamente os europeus. O aumento da prevalência do FGNA ainda não se refletiu entre nós nos números de mortes ou transplantes hepáticos atribuídos à esteatohepatite não alcoólica (EHNA), tendo estes últimos sido apenas 2% do total, no mesmo período. Podendo haver um viés de identificação ou de codificação entre nós, à semelhança do relatado na Europa, a EHNA não parece ter adquirido ainda a dimensão reportada por exemplo nos Estados Unidos da América e noutras regiões.

Nos fatores de risco, em primeiro lugar salienta-se o consumo alcoólico exagerado, causa importante de EH. Depois, assumem relevância a obesidade, o excesso de peso, a diabetes mellitus tipo 2, a insulino resistência e a hipertensão arterial.

De referir a ausência de associação da EH à ingestão calórica total e aos fatores nutricionais em geral. Entre nós, a dieta de cariz mediterrânico não revelou importância estatística como protetora do aparecimento de EH na análise de multivariáveis.

A VD sérica baixa, ou muito baixa, também não mostrou ser fator de risco para EH na nossa população adulta.

Finalmente, não foi encontrada associação aos diferentes níveis de exercício físico.

O conhecimento da realidade nacional e a identificação dos grupos de risco pode permitir o desenvolvimento de estratégias preventivas, que permitam minorar a EH em geral, o FGNA em particular e as fases mais avançadas da doença.

# **Capítulo 1**

## **INTRODUÇÃO**

## **1. Relevância da esteatose hepática**

O fígado é o maior órgão maciço do corpo humano e dispõe duma população celular variada, que lhe permite desempenhar funções a vários níveis e interrelacionar-se de forma ativa com os outros órgãos. Os hepatócitos, representam 60 a 80% do total de células hepáticas, possuem uma ampla variedade de recursos enzimáticos, que lhes permite uma atividade intensa e variada, intervindo ativamente em diversos metabolismos, nomeadamente de síntese e transformação de várias moléculas, destoxificação e secreção de sais biliares. De entre todos esses fenómenos metabólicos estão, por exemplo, os ligados à produção e armazenamento de lípidos e hidratos de carbono e à regulação da homeostasia energética. Estas funções são realizadas em interação permanente com os outros órgãos, duma forma que, apesar de cada vez mais compreendida, não está ainda totalmente esclarecida (1, 2).

Na sequência da sua intervenção, o fígado é muitas vezes envolvido em doenças metabólicas, primárias ou secundárias. As primárias resultam de fatores endógenos, habitualmente mutações genéticas, levando ao aparecimento de moléculas anormais ou ao bloqueio de vias metabólicas e manifestam-se algumas vezes sobretudo a nível hepático. As secundárias, de longe mais frequentes, envolvem quase sempre outros órgãos além do fígado e têm habitualmente na sua gênese comportamentos individuais, como por exemplo os nutricionais ou devidos à ingestão de substâncias potencialmente tóxicas, como é o caso do álcool. Ambas podem originar lesão hepatocelular com potencial inflamatório evolutivo, causando fibrose, cirrose e suas complicações, tal como noutras hepatopatias crónicas.

De todas as patologias hepáticas caracterizadas pelo excesso de depósitos, a esteatose hepática (EH), designada por fígado gordo (FG), é a mais comum. Pode ser diagnosticada por vários métodos. Histologicamente, pela presença de gordura (micro ou macro vesículas) em mais de 5% dos hepatócitos (3), bioquimicamente como um teor de triglicérides superior a 55 mg por grama de tecido hepático (4) e imagiologicamente, como mais de 5% de gordura da fração hepática por ressonância magnética (5). Foi descrita pela primeira vez no século XIX associada sobretudo ao consumo alcoólico (6, 7) e referenciada por Rokitansky, como precursora de cirrose hepática (Rokitansky, 1849). Apesar de haver registos da mesma altura referindo a associação à obesidade e à diabetes (8), só no final do século XX ganhou relevo como patologia hepática crónica,

sendo atualmente a alteração morfológica do fígado mais comum e encontrada em vários contextos (9). Cada vez mais frequentemente é considerada fator de risco para cirrose hepática e suas possíveis complicações, à semelhança das outras etiologias de doença hepática. Na maioria dos casos evolui de forma assintomática ou com clínica fruste e inespecífica, sendo muitas vezes um achado no decurso do estudo, por exemplo, de alterações das provas hepáticas, razão pela qual é uma entidade frequentemente diagnosticada apenas em fases avançadas.

A prevalência da EH aumentou muito nas últimas décadas, sendo atualmente a causa mais frequente de elevação das enzimas hepáticas e a patologia hepática crônica mais prevalente, coexistindo muitas vezes com outras hepatopatias no mesmo doente. Isto apesar de na prática clínica os diagnósticos serem feitos sobretudo em fases mais avançadas da doença, refletindo provavelmente alguma dificuldade ainda existente na sua inclusão no diagnóstico diferencial das doenças hepáticas crônicas e a ausência duma ideia de necessidade da sua prevenção.

O diagnóstico de fígado gordo não alcoólico (FGNA) é feito mais frequentemente na presença de fatores de risco, como a sobrecarga de peso, a obesidade central e o sedentarismo, de prevalência crescentes e transversal a nível global, responsáveis pela síndrome metabólica (SM) (10, 11). A SM, cujo substrato é a insulino resistência (IR), consiste na resposta inadequada à insulina circulante por parte dos órgãos alvo, nomeadamente músculo, tecido adiposo e fígado e associa-se a elevada prevalência de doença aterosclerótica. O FGNA é precisamente considerado a manifestação hepática da IR. Para o seu diagnóstico deve ser comprovada a ausência de consumo alcoólico ou consumos inferiores a 20 gramas por dia na mulher e 30 gramas por dia no homem (12). Tem sido reconhecida a existência de predisposição genética em alguns doentes, sugerindo que o FGNA resulte da interação entre um hospedeiro suscetível e fatores externos, habitualmente nutricionais e/ou hábitos de sedentarismo (13, 14).

O FGNA, designado comumente na literatura internacional por “*NAFLD - Nonalcoholic Fatty Liver Disease*”, engloba vários estádios da doença. O primeiro é a deposição de gordura nos hepatócitos, que nos adultos atinge sobretudo a zona centrolobular, referida como EH e habitualmente entendida como benigna (15, 16). A esteatose simples é muito comum, tendo, no entanto, com frequência algum grau de inflamação associada. Esta atinge maior expressão nos estádios avançados, onde são descritas lesões histológicas com infiltrado mononuclear inflamatório lobular (linfócitos,

sobretudo T, plasmócitos e monócitos), balonização dos hepatócitos, corpos de Mallory-Denk e fibrose peri-celular e peri-venular (17, 18). Esta fase mais avançada da doença constitui a esteatohepatite não alcoólica (EHNA), referida habitualmente na literatura internacional por “*NASH - Nonalcoholic steatohepatitis*”, designação criada por J. Ludwig em 1980 (19) e generalizada desde então. Esta fase mais avançada da doença acompanha-se de pior prognóstico, com o risco de aparecimento de complicações, como a cirrose ou o carcinoma hepatocelular (CHC) (20). Estima-se que entre 10 e 29% dos doentes com EHNA possam evoluir para cirrose em cerca de 10 anos (21).

Nas últimas décadas, embora com diferenças regionais, a obesidade registou um aumento da incidência a nível global com características epidémicas, ainda sem controlo (22). Esse facto contribuiu também para que a esteatose seja atualmente a patologia hepática mais frequente. A sua relevância resulta da história natural, em que, para além das complicações hepáticas, se verificam uma morbidade e mortalidade relevantes, devido a eventos cardíacos e vasculares, muitas vezes os principais determinantes do prognóstico vital dos doentes (23-25). Em relação à doença hepática, se muitos doentes se mantêm durante anos apenas com simples esteatose e uma evolução benigna, outros, por mecanismos fisiopatológicos ainda não totalmente esclarecidos, evoluem para inflamação e fibrose (26, 27), podendo causar cirrose e CHC. Esta relação entre a presença de fibrose e um prognóstico agravado, já descrita anteriormente, foi comprovada em estudos publicados recentemente, nos quais em evoluções prolongadas a presença de fibrose foi o principal determinante do prognóstico e do risco de mortalidade, na sequência de eventos hepáticos ou cardiovasculares (28, 29).

Alguns autores estimam que no decurso da sua doença, além da evolução para cirrose, cerca de 9% possam vir a ter insuficiência hepática e 1% CHC (30, 31). Nalguns países, tornou-se já uma das principais causas de transplante hepático (32).

A possibilidade de evolução para formas mais graves de doença e a elevada prevalência conferiram-lhe um relevo cada vez maior, tornando a EHNA um diagnóstico diferencial obrigatório das doenças hepáticas crónicas, recomendando vigilância e acompanhamento periódicos e especializados, à semelhança das outras hepatopatias.

## **2. Epidemiologia do fígado gordo não alcoólico**

Apesar dos vários estudos epidemiológicos efetuados, a verdadeira prevalência do FGNA não pode ser afirmada com certeza, pois os resultados publicados não podem ser generalizados, por várias razões. Em primeiro lugar, porque provêm de áreas geográficas e populações diferentes, depois por recorrerem a métodos de diagnóstico da esteatose diferentes e, finalmente, porque na ausência de métodos simultaneamente fidedignos, acessíveis e passíveis de serem usados em grupos populacionais, são feitas estimativas baseadas em métodos imagiológicos não invasivos para o diagnóstico da infiltração esteatósica hepática. De realçar ainda que muitos trabalhos são realizados em amostras populacionais de conveniência, como, por exemplo, ficheiros de utentes de instituições de saúde ou grupos de trabalhadores da mesma empresa, já previamente selecionados e que, por isso, não poderão ser considerados representativos da população em geral.

Quanto à forma de estabelecer o diagnóstico, a biopsia hepática é o método de referência, mas é uma técnica invasiva com possível morbidade e mortalidade que a tornam desadequada para estudos populacionais, devendo ser reservada apenas para o estudo de casos individuais. A ecografia, apesar das limitações, é o método usado na maioria dos estudos populacionais, pois não é invasiva, está facilmente disponível e tem um custo razoável. Em faixas populacionais selecionadas e em grupos mais pequenos, alguns autores têm recorrido a meios mais sofisticados, como, por exemplo, a ressonância magnética hepática (espectroscopia), mais sensível, mas menos disponível e mais dispendiosa.

### **2.1. Incidência**

Se persiste ainda a dúvida quanto à prevalência do FGNA, apesar dos vários trabalhos feitos, a incidência é igualmente incerta, sendo provavelmente muito superior à divulgada, pois em muitos estudos o diagnóstico é feito pela ecografia, que tem dificuldade em diagnosticar os casos de esteatose ligeira e moderada. No Japão, num estudo de 2005 efetuado em funcionários governamentais sem doença hepática prévia conhecida, sem hábitos alcoólicos e com marcadores virais negativos, a elevação das aminotransferases, interpretada como associada a FGNA, foi identificada em 31/1000 pessoas/ano (33). Noutro trabalho do mesmo ano, igualmente japonês, em 4401 adultos aparentemente saudáveis e com índice de massa corporal (IMC) de 22,6 kg/m<sup>2</sup> (SD: 3,0),

com 3147 participantes seguidos durante 414 dias (SD: 128), foram encontrados 308 novos casos de FGNA, correspondendo a uma taxa de cerca de 10% nesse tempo (34). Posteriormente, noutro estudo, também em adultos, numa população inglesa, foram encontrados 29 novos casos por cada 100 000 pessoas e por ano, sendo 23,5 não cirróticos e 5,5 com cirrose (35).

## **2.2. Prevalência**

Nos estudos de prevalência efetuados em faixas alargadas de população, por razões já explicadas os métodos imagiológicos são os mais usados, em detrimento da biópsia hepática. No entanto, em dadores vivos de fígado para transplante hepático foram realizados estudos de prevalência com recurso à histologia. Na Coreia, em 589 potenciais dadores vivos consecutivos, 51% tinham EH e 2,2% apresentavam critérios para EHNA (36). Noutros trabalhos, efetuados nos Estados Unidos, foram encontradas percentagens de EH significativas em cerca de 30% dos candidatos (37-39) e noutro 20% dos possíveis dadores apresentavam mesmo esteatose superior a 30% (40). Da Europa alguns dados foram também publicados, encontrando esteatose significativa em menos de 20 % (37, 41). De realçar que em muitos destes dadores considerados saudáveis, existiam percentagens de EHNA consideráveis, atingindo os 16 %.

A histologia foi também usada em estudos necrópsicos para determinação da prevalência da esteatose e da esteatohepatite, com a ressalva de que os resultados devem ser interpretados em função da não representatividade das “amostras” em relação à população em geral. Em dois desses trabalhos, um realizado no Canadá em 423 vítimas de acidentes aéreos e outro proveniente da Índia, em 1230 autópsias de adultos, 16% apresentavam FG (42, 43). No primeiro, em 11% havia evidência prévia de abuso de álcool e no segundo apenas 5% eram obesos, o que poderá significar que muitos destes casos possam não ser englobados numa designação mais estrita de FGNA. Noutro estudo semelhante, proveniente da Grécia e realizado entre 2006 e 2008, em 498 doentes falecidos por doença isquémica do miocárdio ou em acidentes de viação (68,4% homens, idade média de 64,4 ± 17,8 anos) foi encontrada esteatose em cerca de um terço e havia critérios de EHNA em 40% destes (44). Dada a natureza destes estudos, não foram excluídas outras causas de esteatose, nomeadamente a ingestão alcoólica, pelo que os resultados deverão ser interpretados com precaução.

Para os estudos populacionais, os métodos não invasivos, sobretudo a ultrassonografia, são naturalmente os escolhidos nos vários trabalhos publicados.

Em Espanha, em 2010, foi detetada uma prevalência de FGNA de 28,5% usando critérios ecográficos (33% nos homens e 20% nas mulheres) em 766 indivíduos de idade igual ou superior a 15 anos, habitantes da Catalunha (45). Em Itália, o estudo DIONYSOS encontrou uma prevalência de 20% em adultos sem suspeita prévia de doença hepática (46). Outro trabalho, proveniente da Índia, também por ecografia, revelou uma prevalência de cerca de 17% numa população de habitantes duma colónia dos caminhos-de-ferro, (47).

Alguns trabalhos revelaram uma prevalência superior, o que pode ser devido ao método de recrutamento usado. É o caso da pesquisa de EH por ultrasonografia efetuado no *Brooke Army Medical Center*, centro médico de cuidados primários do exército norte-americano localizado no Texas, efetuada em militares ao serviço há pelo menos 20 anos, ou reformados e seus dependentes, que acederam a participar voluntariamente. Em 328 participantes, com igual distribuição de sexos, entre os 18 e os 70 anos, foi diagnosticado FGNA em 46%, sendo a EHNA comprovada histologicamente em 29,9% dos indivíduos com EH (48). O FGNA associou-se sobretudo a eventos da SM e foi maior nos hispânicos e nos indivíduos com diabetes, grupo onde estas prevalências foram consideravelmente maiores: FGNA em 74% e EHNA em 22,2% dos participantes.

Nos Estados Unidos a prevalência da EH foi avaliada entre os participantes do NHANES III (*“Third National Health and Nutrition Examination Survey”*), um programa nacional de avaliação do estado de saúde da população do país. Foram considerados os registos das ecografias realizadas em 12 454 adultos entre os 20 e os 74 anos, realizadas entre 1988 e 1994, para quantificar o número de pessoas com EH na ausência de consumo alcoólico exagerado. O FGNA foi detetado em 19% dos participantes, sendo maior nos de origem mexicana (24,1%) relativamente aos brancos não hispânicos (17,8%) e aos afro-americanos não hispânicos (13,5%). Nos homens a prevalência foi maior do que nas mulheres (20,2 versus 15,8%, respetivamente) (49).

A avaliação da EH pode também ser feita por outros métodos não invasivos, como a ressonância magnética por espectroscopia de prótons, capaz de medir a quantidade de triglicéridos (TG) hepáticos e, como tal, de poder diagnosticar fígado gordo. Este método foi utilizado num trabalho de pesquisa da presença de EH num grupo de base populacional, multiétnico, proveniente do *Dallas Heart Study*, num total de 2287

participantes. A prevalência foi de 31%, sendo maior nos hispânicos (45%) do que nos brancos (33%) e afroamericanos (24%). Foi semelhante em ambos os sexos dos participantes de origem africana e hispânicos, enquanto no grupo de raça branca os do sexo masculino registaram o dobro da prevalência em relação aos do sexo feminino. De realçar que 79% dos participantes com esteatose tinham aminotransferases normais (50). Se nos países ocidentais, bem como naqueles que adquiriram hábitos alimentares ocidentalizados e com baixos níveis de atividade física, o FGNA é diagnosticado sobretudo em indivíduos com IR, obesos ou diabéticos, desde há algum tempo que tem vindo a ser referida, sobretudo em trabalhos provenientes do oriente (asiáticos e indianos), uma prevalência de EH numa faixa não despreciable de indivíduos sem hepatopatia conhecida e sem consumo exagerado de álcool ou obesidade (51, 52). Apesar de se verificarem prevalências inferiores a 20% em muitos trabalhos, levanta-se a dúvida sobre a sua natureza. Embora também nestes grupos o IMC elevado se associe a maior risco de fígado gordo, valores de IMC inferiores a 25 kg/m<sup>2</sup> associaram-se a EH na ecografia, sendo sugerido como causa o aumento da gordura troncular que esses indivíduos apresentavam.

Numa meta-análise recente (53), incluindo 86 estudos provenientes de mais de 22 países, envolvendo vários milhões de pessoas, a prevalência do FGNA foi de 25,24%, sendo maior no Médio Oriente e na América do Sul e menor em África. Foi relatada uma tendência de aumento do FG com a idade, apesar de poucos estudos incluírem doentes com mais de 70 anos. A associação a grupos de risco também foi documentada, estando o FGNA associado à obesidade em 51,34%, à diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) em 22,51%, à hiperlipidemia em 69,16%, à hipertensão arterial em 39,34% e à SM em 42,54% dos casos. O risco calculado de mortalidade, geral e por causas hepáticas, foi respetivamente de 1,05 e 1,94, o que realça o impacto que estes doentes representarão no futuro para os sistemas de saúde.

Alguns trabalhos relatam maior prevalência da EH nos homens relativamente às mulheres, sobretudo em idades mais jovens, havendo alguma tendência para a aproximação entre os dois sexos após a 5ª década da vida, pelo menos nalgumas populações (54-56). Foi descrito um risco acrescido de FGNA para o sexo masculino e a idade, independentemente da presença do SM (36, 45, 57), embora outros associem diminuição do risco com a idade (58, 59). Nas mulheres, a idade, sobretudo pós-menopausa, e a presença de SM foram associados a maior risco de FGNA (60-62).

Dum modo geral, dos vários trabalhos publicados, poder-se-á dizer que a prevalência estimada do FGNA estará entre os 20 e os 30 % da população adulta, havendo zonas do globo e algumas populações com valores superiores, mas, como já referido, este valor pode ser muito variável em função do local ou da população estudados. O facto do FGNA se associar à obesidade, que tem uma prevalência elevada em muitas regiões e está longe de estar controlada (22), permite supor que a verdadeira prevalência do FGNA seja ainda maior, pelo menos em algumas zonas do globo ou em algumas faixas da população. Mais uma vez, nestes estudos o padrão de consumo alcoólico provavelmente não foi avaliado em detalhe, pela dificuldade em colher dados acurados de consumo alcoólico, o que poderá ter enviesado os resultados.

### **2.3. Prevalência do FGNA em idade pediátrica**

Desde há anos que é conhecida a presença de FG também em crianças e adolescentes e, à semelhança do verificado na população adulta, também com aumento da prevalência. O estudo e acompanhamento de crianças e adolescentes com FGNA assume particular importância porque pode fornecer informações pertinentes relativamente à história natural da doença.

Sendo conhecida a importância da obesidade infantil, que, apesar de algumas diferenças regionais, atinge todos os continentes, é legítimo supor que o FGNA também afete uma grande percentagem das crianças e adolescentes. A presença de FGNA neste grupo etário favorece o aumento da sua prevalência na idade adulta, pois crianças obesas habitualmente originam adultos obesos e, segundo um estudo sueco recente, a presença de FGNA/EHNA e excesso de peso são importantes preditores de doença hepática crónica e CHC nos indivíduos do sexo masculino (63). O seu diagnóstico, no entanto, reveste-se de aspetos particulares nesta faixa etária, como é o caso do IMC, que deve ser adaptado a uma população em crescimento, ou da própria histologia do FGNA, que tem aspetos típicos da idade pediátrica (64). Já o risco de evolução para fases avançadas e a associação a doenças cardiovasculares, IR, obesidade abdominal e hipertensão arterial, também estão presentes na faixa pediátrica, à semelhança dos adultos (65, 66), apresentando estes doentes, dum modo geral, hipertrigliceridémia e/ou hipercolesterolemia e um maior risco de aterosclerose futura (67, 68).

A prevalência do FGNA pediátrico, segundo a literatura, será de 3 a 10% (69, 70), embora este valor seja obtido a partir de dados indiretos, como o valor da alanina aminotransferase (ALT) no caso do NHANES III. Na análise entre 1999 e 2004, a prevalência das referidas alterações foi maior nos adolescentes hispânicos de origem mexicana (11,5%), seguidos dos de raça branca (7,4%) e menor nos afro-americanos (6,0%) (71), um padrão semelhante aos adultos. Também os adolescentes do sexo masculino tinham mais esteatose (12,4%) do que as raparigas (3,5%), tendência comum a outros trabalhos. Quando se analisaram grupos de risco, como os obesos, a prevalência sobe bastante, atingindo valores entre 70% e 80% (72-74) em avaliações feitas em populações de várias regiões, que não só ocidentais.

Mais recentemente, numa análise de dados globais provenientes de 195 países, *Global Health Data Exchange* (GHDx) (<http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool>), foi detetado um aumento da prevalência anual estimada de FGNA/EHNA de 1,35 % nas crianças e adolescentes (até aos 19 anos), sobretudo no sexo masculino. Houve igualmente um aumento significativo no número de diagnósticos em jovens adultos (dos 20 aos 39 anos) de 152,85 milhões em 1990 para 284,32 milhões em 2017 (75). O crescimento foi verificado em todas as regiões, sendo, no entanto, maior nas consideradas de nível socioeconómico médio/alto (76).

A perspetiva futura parece ainda mais sombria quando são considerados dados como os publicados em 2021 sobre a prevalência da fibrose em adolescentes norte americanos. No estudo observacional NHANES, de 2017 a 2018, em 867 adolescentes (12-18 anos) avaliados por elastografia transitória e CAP (*Controlled Attenuation Parameter*), em contexto de MAFLD (*Metabolic-Associated Fatty Liver Disease*), os autores encontraram uma prevalência de EH em 24,16% (11,6% com CAP  $\geq$  280 dBm, sugestivo de EH marcada) e fibrose significativa em 4,4% (rigidez hepática  $\geq$  7,4 KPa). De notar que dos participantes com fibrose 35% tinham peso normal e 78% níveis de ALT normais, o que poderá desaconselhar o uso de bio marcadores, pelo menos nesta faixa etária (77).

### **3. Da esteatose à esteatohepatite não alcoólica**

#### **3.1. Sobrecarga hepática de lípidos e resistência à insulina**

A evolução da esteatose para esteatohepatite, com inflamação e fibrose, podendo causar cirrose, envolve para além dos hepatócitos outras células hepáticas, nomeadamente as células de Kupffer, os macrófagos, as células “*natural killer*” (NK), os linfócitos T, as células endoteliais sinusoidais e as células estreladas, com a participação ativa dos mecanismos de defesa inatos.

A EH caracteriza-se pela deposição de TG em vesículas intracelulares, começando a ter relevância quando excede 5% dos hepatócitos (5). Nos adultos verifica-se inicialmente uma deposição de esteatose na zona 3 dos ácinos, ou perivenular, tendo posteriormente uma distribuição difusa (78). Habitualmente começa como pequenos depósitos de gordura no retículo endoplasmático (RE) e no citoplasma, que aumentam de tamanho até ocuparem progressivamente todo o hepatócito, empurrando o núcleo e as estruturas celulares para a periferia, facto que, na opinião de muitos autores e investigadores, compromete os diversos organelos e sensibiliza o hepatócito aos estímulos tóxicos (79-81).

A sobrecarga de gordura hepática surge na sequência do desequilíbrio da “homeostasia lipídica” dos hepatócitos, entre lípidos armazenados e exportados, devido a alterações do metabolismo lipídico, inflamação e fatores hormonais, entre outros. É constituída sobretudo por TG formados pela esterificação dos ácidos gordos livres (AGL) com o glicerol (proveniente da glicólise sob a forma de glicerofosfato), mas foi também demonstrada a acumulação de outros lípidos, como os AGL, o colesterol, (esterificado e livre), a ceramida e os fosfolípidos (82).

Embora durante muitos anos a deposição excessiva de TG nos hepatócitos (83) fosse considerada um passo obrigatório e imprescindível, a partir do qual se desenvolvia posteriormente a inflamação verificada em alguns doentes, estudos experimentais em animais vieram acentuar uma ideia diferente, a de que os TG desempenham um papel de tampão. Após receber AGL circulantes em excesso, o fígado pode armazená-los no hepatócito como triglicéridos, protegendo-se da sua lipotoxicidade e prevenindo a inflamação hepática (84, 85), representando uma forma de adaptação dos hepatócitos à agressão pelos AGL e atenuando o seu efeito lipotóxico hepático (86). Por exemplo, a

inibição da síntese de TG, através da inibição da diacilglicerol aciltransferase 2 (DAGT2) nos ratinhos *db/db* deficientes em recetores de leptina e obesos, poderá mesmo propiciar maior lesão hepatocitária (85). A favor desta hipótese está o facto dos AGL acumulados aquando da diminuição da síntese dos TG estimularem o *stress* oxidativo e a lesão dos hepatócitos (87, 88). Além do esclarecimento do mecanismo fisiopatológico, se comprovada, esta noção pode ter implicações no tratamento, pois a redução dos TG circulantes pode não representar um benefício tão decisivo, em comparação com a síntese de TG *de novo*.

Subsiste ainda a dúvida se o teor de gordura hepática, por si só, representa um risco acrescido de esteatohepatite, embora alguns autores associem maior esteatose (superior a 66%) a maior propensão para a esteatohepatite (89).

Os ácidos gordos (AG), considerados os primeiros responsáveis pela agressão dos hepatócitos, provêm de várias fontes: lipólise no tecido adiposo e tecido celular subcutâneo, alimentação, ou síntese hepática *de novo*. Além desses mecanismos, há um contributo da diminuição da síntese hepática das lipoproteínas de muito baixa densidade, as VLDL (“*Very Low Density Lipoproteins*”) (90), devido à IR (91), ou da sua síntese em modo disfuncional (92). Enquanto em indivíduos saudáveis em jejum os AGL cheguem ao fígado provenientes sobretudo dos TG dos adipócitos, depositados quando há excesso de energia, nos indivíduos com fígado gordo há um reforço dos AGL provenientes da síntese *de novo* e da alimentação (93, 94), estando a entrada dos AGL nos hepatócitos favorecida nos indivíduos com NASH, ideia apoiada pela demonstração da sobre expressão da proteína CD36, responsável pela sua captação (95). Os AG circulantes estão também aumentados por causa da diminuição da inibição da lipólise nos adipócitos devida à IR.

Os AG de cadeia carbonatada, pequena e média, são provenientes da alimentação e da lipólise no tecido adiposo e são transportados ligados à albumina, enquanto os de cadeia longa são provenientes da alimentação e são transportados nos quilomicrons formados nas células do intestino. Os quilomicrons sofrem ainda uma clivagem, pela ação da lipoproteína lípase, chegando ao fígado na forma remanescente, com AGL. Nem todos os AG, no entanto, terão o mesmo potencial para se depositar, tendo o oleico e o palmítico maior toxicidade para as células, com redução da capacidade de síntese de TG (87).

Uma vez no fígado, os AGL são oxidados nas mitocôndrias, produzindo corpos cetónicos, usados como fonte de energia na falta da glicose, ou na produção de TG ou de ésteres do

colesterol. A  $\beta$ -oxidação dos AG pode ser inibida pela insulina (96), ou estar prejudicada pela menor resposta celular ao fator de proliferação dos recetores ativados pelo peroxisoma ("*Peroxisome proliferator-activated receptor*", ou PPAR- $\alpha$ ), fator de transcrição fundamental para a  $\beta$ -oxidação (97).

Os AG podem também ser sintetizados *de novo* no hepatócito. Quando há excesso de energia a glicose é convertida em piruvato e encaminhada para o ciclo de Krebs. O citrato aí produzido é depois enviado para o citoplasma, onde é convertido em acetil coenzima A, a partir da qual são depois sintetizados vários AG: ácido palmítico e o seu correspondente insaturado, ácido palmitoleico (com 16 átomos de carbono, ou C16), ou o ácido esteárico e o correspondente ácido oleico (ambos em C18), este último encontrado em grandes concentrações nos hepatócitos de humanos e de ratos com EH (98-100). Uma vez produzidos, os TG são armazenados em lipoproteínas de muita baixa densidade, as VLDL, no RE liso e rugoso, sendo depois estas partículas exportadas por exocitose. Caso contrário, ficam armazenadas no fígado. Sob a ação da lipoproteína lípase as VLDL são transformadas em LDL (*Low Density Lipoproteins*) e os restantes AG poderão ser novamente metabolizados, usados como fonte energética ou armazenados.

A insulina, além de diminuir a lipólise e estimular a lipogénese, regula a síntese *de novo* dos AG no hepatócito, juntamente com a glicose (101, 102). Esta ação é mediada por um fator de transcrição transmembranar, SREBP 1C ("*sterol regulatory element-binding protein-1 C*"), que ativa os genes nucleares necessários para a lipogénese (103, 104). Conforme comprovado em experimentação animal em ratinhos *ob/ob*, quando há IR este fator é ativado (105) e a sua inativação origina diminuição da EH (106). O SREBP 1C, ao provocar ainda a ativação da isoforma da Acetil Co-A, que promove a síntese de malonil-CoA, que por sua vez inibe a carnitina palmitoil transferase, responsável pelo envio de AG para a mitocôndria, impede desse modo a sua oxidação (107, 108).

A glicose também contribui, ativando a ChREBP ("*carbohydrate response element binding protein*"), que ao entrar no núcleo e ativando um fator de transcrição, promove a síntese de piruvato cinase (PK), enzima reguladora da glicólise, que catalisa a conversão de fosfoenolpiruvato em piruvato. Este, ao ser metabolizado no ciclo de Krebs, origina citrato e Acetil Co-A, usado para a síntese de AG. A ativação da PK tem como resultado a promoção da glicólise e da lipogénese, facilitando a conversão de glicose em AG quando há excesso energético (96).

Um outro fator de transcrição importante é o PPAR- $\gamma$  (*proliferator-activated receptor gamma 2*), necessário para a diferenciação dos adipócitos (109) e que está aumentado quando há IR (110, 111).

A AMPK, proteína cinase ativada pela adenosina monofosfato (AMP), interfere também na regulação da energia celular. A subida dos níveis de AMP tecidulares é em si um marcador de baixa energia e leva à ativação da AMPK. Como consequência, há produção de Adenosina Trifosfato (ATP) (por exemplo pela  $\beta$ -oxidação dos AGL) e diminuição do consumo de energia, como é o caso da lipogênese (112). A ativação da AMPK, por exemplo sob a ação da metformina ou das tiazolidinedionas, leva à redução da síntese dos AGL e ao aumento da sua  $\beta$ -oxidação (96).

Posteriormente à simples deposição de lipídios nos hepatócitos, é aceite pela maioria dos autores que o aparecimento de inflamação e fibrose no FGNA marca o ponto de viragem na história natural da doença (113), condicionando uma evolução que nalguns doentes termina em cirrose, insuficiência hepática ou mesmo CHC.

Apesar do muito que já se conhece, os mecanismos fisiopatológicos envolvidos não estão ainda totalmente esclarecidos, nomeadamente no sentido de saber porque é que só alguns portadores de FG evoluem para formas avançadas.

Como a inflamação e a fibrose revelam um estágio mais avançado, a sua presença tem sido estudada para avaliar a sua importância como determinantes evolutivos da doença. Num estudo que incluiu 221 doentes submetidos a duas biópsias com intervalo de um ano, sem terapêutica capaz de intervir na progressão histológica, a presença de inflamação na biópsia inicial e a idade foram os únicos fatores predizentes de evolução para fibrose (113).

Outros dois estudos recentes realçaram a importância do aparecimento da fibrose na evolução dos doentes, sendo o único fator capaz de influenciar a mortalidade global, a necessidade de transplante hepático, o aparecimento de complicações da doença hepática e o prognóstico vital (28, 29). Estes dois estudos podem, no entanto, revelar apenas que os doentes em que a fibrose está mais avançada têm maior risco de desenvolver um acontecimento clínico relevante, informação diferente dos mecanismos de progressão da doença, em que a presença de inflamação e o seu grau podem ser decisivos.

A evidência conhecida aponta para uma contribuição decisiva do aumento da gordura visceral como promotor da inflamação hepática e libertação de fatores hormonais pelo tecido adiposo, sobretudo em indivíduos com predisposição genética, originando o *stress*

oxidativo encontrado nestes doentes (114) e em clara relação com o excesso de gordura troncular (115).

Sendo menos frequente a presença de FGNA na ausência de obesidade e/ou de IR (116, 117), esta última é reconhecidamente um fator promotor da lipogênese hepática, da dislipidemia aterogénica e do FGNA, surgindo sobretudo quando há acumulação excessiva de gordura, preferencialmente nos músculos e fígado. Neste contexto surge a IR, situação em que a insulina se mostra incapaz de suprimir o afluxo de AG do tecido adiposo para o fígado, comprovando uma resistência periférica à sua ação (118). Persiste, no entanto, a dúvida se é a deposição hepática de TG e a subsequente inflamação a originar a IR, ou se o processo é iniciado à periferia, no tecido adiposo, envolvendo posteriormente o fígado, de modo sistémico e promovendo a deposição excessiva de TG no fígado e a IR hepática. Do já conhecido, este é um processo dinâmico, sendo o fígado simultaneamente promotor e alvo.

O mecanismo molecular responsável pela falência da ação da insulina também não está ainda completamente esclarecido. Inicialmente foi proposto que o excesso de  $\beta$ -oxidação dos AGL, com aumento da relação Acetil CoA/CoA e o contributo de vários intermediários, resultasse na diminuição da entrada de glicose no músculo (119). Dados experimentais posteriores confirmaram a diminuição do transporte de glicose para dentro das células após infusão de lípidos, sugerindo a associação da IR com a presença de metabolitos lipídicos capazes de interferir com a atividade de transportador da glicose (120). Mais recentemente foi proposto que a IR seria secundária à acumulação nas células musculares de diacilglicerol (DAG), com saturação da  $\beta$ -oxidação mitocondrial, acumulação de TG e alteração da sinalização intracelular da insulina, resultando na diminuição da atividade de transporte da glicose e a consequente diminuição da síntese de glicogénio e da oxidação da glicose (120-122). Foi demonstrado que o aumento do conteúdo hepático de DAG e de PKC $\epsilon$ , (proteína cinase C $\epsilon$ , inibidor da sinalização intracelular da insulina) é o maior preditor de IR hepática em doentes obesos com diagnóstico de NAFLD (123, 124), à semelhança do que se passa nas células musculares, também com o DAG e com a PKC $\theta$  (proteína cinase C $\theta$ , igualmente inibidor da sinalização intracelular da insulina, mas no músculo) (122, 125, 126). Estes fatos realçam a importância da presença de DAG com a consequente ativação dos inibidores referidos, mesmo na ausência de excesso de gordura visceral periférica.

A confirmação do papel do excesso de lipídios intracelulares é dada pela melhoria da IR após a redução da massa gorda ectópica e da perda de peso de, pelo menos, 10%, que melhoram a sensibilidade à insulina, a produção de glicose pelo fígado e as glicémias em jejum, em doentes com diabetes tipo 2 (127).

Além da ineficiência da insulina, outro aspeto relevante é a contribuição dada pelo tecido adiposo para a inflamação existente no FGNA, com a ativação dos macrófagos e libertação de citocinas, que mais tarde envolvem o fígado (128, 129). A atestar esta hipótese está a constatação da melhoria da esteatose em animais tratados com metformina, com ação anti-TNF $\alpha$  (“*Tumor Necrosis Factor*”- $\alpha$ , ou Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$ ) (130, 131) e de doentes com hepatite alcoólica tratados com inibidores do TNF- $\alpha$  (132). Por outro lado, se os fatores metabólicos contribuem para a NASH, a doença hepática mais avançada também se associa a maior descontrole metabólico (11, 133, 134). No músculo, a IR diminui a captação de glicose; no tecido adiposo, promove a libertação de AGL e em conjunto com a hiperglicemia, diminui a sua  $\beta$ -oxidação hepática, promovendo a sua deposição no fígado (135-137). No entanto, o metabolismo intra-hepático da glicose e dos lipídios também pode originar deposição de gorduras, independentemente das alterações extra-hepáticas que possam existir, como foi demonstrado em estudos em que após alguns dias de dieta rica em lipídios ocorria deposição de gordura no fígado independentemente da IR periférica (138). Por outro lado, é conhecida a diminuição da depuração hepática da insulina na cirrose, o que promove a IR e o aumento da deposição de gordura hepática (139, 140).

Sendo conhecida a acumulação de macrófagos no tecido adiposo de indivíduos obesos (141), foi também demonstrada a capacidade de segregarem citocinas, promotoras de lipólise no tecido adiposo e IR no tecido adiposo, no músculo e no fígado, além de promoverem a libertação de óxido nítrico (NO) e interleucina 6 (IL-6) (142).

Outros dados, provenientes da experimentação animal, também favorecem a ideia da libertação de mediadores inflamatórios pelo tecido adiposo originar IR periférica, (143), sendo aceites vários “elementos de ligação” entre obesidade e IR. Entre eles, o TNF- $\alpha$ , a interleucina-6 (IL-6) e a proteína C Reativa (PCR), foram já identificados em níveis elevados em doentes com NASH, bem como os seus recetores (144, 145), havendo evidência científica que o TNF- $\alpha$  contribui para a inflamação, não sendo apenas uma consequência da mesma (117, 146). Resultados de estudos em roedores demonstraram melhoria da IR após bloqueio da ação do TNF- $\alpha$  com anticorpos ou pentoxifilina, um

fármaco com capacidade de inibição do TNF- $\alpha$  (147, 148). De realçar que ambas as adipocitocinas (IL-6 e TNF $\alpha$ ,) foram também associadas a oncogénese em estudos animais (149).

A deposição de gordura em excesso promove a ativação de cinases nas células onde atua a insulina. As cinases mais frequentemente invocadas são a JNK (“*Jun N-terminal Kinase*”, uma cinase proteica sinalizadora), a cinase inibidora do fator nuclear kB (NF-kB) e a proteína cinase C (PKC). Essas cinases fosforilam os recetores de serina da insulina, alterando a resposta fisiológica à hormona, para além de serem moléculas de sinalização pró-inflamatórias, influenciando a transcrição de genes, citocinas, células de adesão, etc. (143, 150) e a sua ativação foi associada a IR em vários tecidos (151-154).

Mesmo sem obesidade ou inflamação, uma alimentação rica em lípidos, nomeadamente em AG, pode desencadear uma reação inflamatória mediante ativação dos TLRs (“*mammalian toll-like receptors*”), recetores celulares capazes de reconhecer padrões moleculares, como os dos gérmens gram-negativos, desencadeando a respetiva resposta imunológica de defesa, através da transcrição do NF-kB e conseqüente ativação de citocinas e resposta inflamatória. Os AG são ainda capazes de induzir a apoptose dos hepatócitos, evento comum na morte celular na EHNA. À semelhança das dietas ricas em carboidratos, podem induzir aumento da expressão de recetores celulares como o Fas (recetor do fator de necrose tumoral) e do ligando TRAIL-Rs, sensibilizando dessa forma os hepatócitos para a apoptose (155, 156).

Se em geral as dietas ricas em gorduras são um fator de risco para o FGNA, os tipos de lípidos ingeridos podem ter ações diferentes. Os AG poli-insaturados (AGS) (conhecidos na literatura como PUFA-“*Polyunsaturated fatty acids*”), consoante a sua estrutura, podem ter ação pró-inflamatória, caso dos n-6 PUFA, linoleico e araquidónico (157), ou anti-inflamatória, como os n-3 PUFA  $\alpha$ -linolénico, eicosapentaenóico ou ácido docosa-hexaenóico, que diminuem a lipogénese e aumentam a  $\beta$ -oxidação (158). Alguns metabolitos da oxidação do ácido linoleico, estão também associados a doença mais grave (159). A diminuição do consumo de n-3 PUFA e o aumento da razão n-6/n-3 foram associados à presença de maior gravidade de FGNA (99, 160), havendo melhoria da gordura hepática e da enzimologia hepática com o maior consumo de n-3 PUFA (161). Outro dado que reforça este conhecimento é que a inibição da enzima responsável pela conversão dos AGS nos seus correspondentes insaturados (esterol CoA dessaturase-ECD1), com a conseqüente acumulação de AGS, propicia a inflamação e a sobre

expressão da enzima e, apesar de provocar mais esteatose pelo aumento da síntese e deposição de TG, protege o fígado de inflamação (87).

### **3.2. Contribuição do colesterol e de outros lípidos**

A possibilidade de outros lípidos, além dos TG e dos AG, poderem também estar implicados na fisiopatologia da NASH é uma evidência cada vez maior, ajudando a fomentar o conceito de lipotoxicidade na sua gênese (162, 163). Embora a EH se associe sobretudo ao aumento do teor de TG, nos últimos anos várias experiências animais fizeram incidir a atenção sobre o papel do colesterol. Mari e colaboradores (164) demonstraram que o aumento do teor de colesterol nos hepatócitos os sensibilizava para a ação do TNF- $\alpha$ , para a apoptose e para maior produção de radicais livres de oxigênio (ROS). A corroborar esse papel está a ação da atorvastatina, que ao diminuir o colesterol hepatocitário, pela inibição da hidroximetilglutaril Coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), aumenta os níveis celulares de glutatião, reforçando a ideia da participação do colesterol e com implicações ao nível do tratamento (165). Um mecanismo sugerido para explicar o aumento do teor de colesterol poderia ser a diminuição de AG insaturados n-3, que poderiam provocar aumento da atividade da HMG-CoA redutase (118, 166), ou o aumento de expressão de enzimas com intervenção na síntese e encaminhamento da entrada do colesterol na mitocôndria (167).

Por outro lado, tal como os AGL, também o colesterol pode promover a inflamação, na medida em que estimulará a produção de TNF- $\alpha$  e de ROS (164, 168).

### **3.3. Frutose: um hidrato de carbono cada vez mais relevante**

Nos últimos anos, para além da glicose e dos lípidos, tem sido atribuído à frutose um papel ativo na gênese da EHNA. Embora seja conhecida há muito tempo, ganhou relevo a partir dos anos 60 do século passado pelo seu poder adoçante, por ser de fácil preparação e obtenção, barata, estável e disponível, por exemplo, a partir de xarope de milho. Por isso, passou a ser popular como adoçante em bebidas e sumos de fruta concentrados, sendo consumida atualmente por largas faixas da população. Pelo aumento do seu consumo e potencial lipogénico atraiu a atenção como fator de risco para a EH.

Com uma fórmula parecida com a glicose (é um intermediário do seu metabolismo), normalmente é pouco absorvida pelo intestino, pois o seu transportador celular (GLUT-

5, ou *Glucose Transporter Type-5*) habitualmente não está presente em grande quantidade nas células intestinais, contrariamente ao da glicose (GLUT-4). Após a absorção, é totalmente captada pelo fígado, sendo a maior parte transformada em glicose e depois em glicogénio. Apesar da semelhança com a glicose tem uma metabolização diferente, pois a da glicose é regulada pela insulina, pelo ATP e pelo citrato, enquanto a frutose é metabolizada na sua totalidade, revelando-se uma fonte energética de grande potencial. Elevados consumos de frutose estão associados a aumento da produção de triglicéridos *de novo*, originados através da produção de acetil-CoA e diminuição da depuração de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL). Além da gordura, uma parte é ainda transformada em lactato. Por outro lado, a sua fosforilação, ao consumir ATP, produz mais ADP, o qual serve como substrato para a produção de ácido úrico. Em última análise, todos estes eventos favorecem um clima pró-oxidante no fígado, nomeadamente com aumento da peroxidação lipídica.

A frutose pode ainda ter ação nefasta pela sua dificuldade em regular a saciedade. Alguns trabalhos relataram menor diminuição da saciedade após ingestão de frutose, relativamente à glicose e igualmente menor capacidade de diminuir a produção de insulina, menores glicemias pós-prandiais e níveis mais baixos de GLP1 (169, 170).

Consumida cronicamente em grandes quantidades por roedores, isoladamente ou em conjunto com a glicose, leva a IR hepática e extra-hepática, obesidade, hipertensão arterial e diabetes *mellitus* tipo 2 e nos seres humanos provoca dislipidemia e diminui a sensibilidade hepática à insulina (171). Apesar de haver alguma controvérsia sobre a sua contribuição para a epidemia de obesidade, vários estudos epidemiológicos apontam para uma associação entre o seu consumo excessivo e o aparecimento de complicações metabólicas e cardiovasculares, tendo também sido associado a inflamação hepática e fibrose em seres humanos (172-174).

Contudo, para alguns autores não terá maior risco de alterações bioquímicas do que outros açúcares quando consumida associada à glicose, como na sucrose comum, sendo o efeito nefasto associado sobretudo ao seu consumo excessivo, por exemplo em bebidas aditivadas com xarope de extrato de milho (175, 176).

### 3.4. Participação dos diferentes organelos celulares

No decurso da evolução do FGNA, desde a EH até à EHNA, são vários os organelos do hepatócito que podem sofrer agressão, contribuindo para o estabelecimento da lesão final. Nos últimos anos, a participação do RE ganhou relevo, podendo promover a produção de espécies pró-oxidantes e o desenvolvimento de inflamação na EHNA. Sendo o local de síntese de muitas proteínas membranares da célula, por vezes podem acumular-se proteínas “*unfolded*” (“desdobradas”) e originar a chamada “*unfolded protein response*” (UPR), resposta celular adaptativa e cuja falha em restabelecer a função normal do RE pode levar à apoptose, consequência, por exemplo, da acumulação de AGS (177, 178). Experiências em células de CHC conseguiram demonstrar *stress* do RE quando expostas a AGS (palmítico e esteárico), contrariamente ao sucedido com AG monoinsaturados (179). Outros autores conseguiram demonstrar também maior *stress* oxidativo em seres humanos com EHNA, quando comparados com doentes com SM, mas sem alterações hepáticas (180). A resposta ao *stress* no RE, através da ativação de diversas vias - JNK, NF- $\kappa$ B e C/EBP (CCAAT/*Enhancer Binding Protein*, uma proteína pro-apoptótica) - origina inflamação e fosforilação dos recetores de insulina (com o consequente agravamento da IR) e da lipogénese (181).

Mais recentemente, a ceramida (um esfingolípido produzido *de novo* no RE a partir da esfingosina e AG) chamou a atenção por participar no *stress* e morte celular (182), sendo produzida em maior quantidade se houver mais disponibilidade de AG, o que sucede na obesidade. Apesar do seu contributo na fisiopatologia do FGNA não estar ainda totalmente esclarecido, sabe-se já que tem participação nos mecanismos de morte celular e de resistência à insulina (183).

O desequilíbrio entre espécies pró-oxidantes e protetoras tem sido implicado na fisiopatologia da EHNA, sendo a oxidação dos AGL uma fonte de ROS. Esta designação abrange várias moléculas: oxigénio, aniões superóxido, peróxido de hidrogénio e os radicais hidroxilo, todas com capacidade agressora para a célula. O excesso de AG que chega à mitocôndria satura a sua capacidade de oxidação e origina aumento da produção de Acetil-CoA, que entra no ciclo de Krebs aumentando a produção de NADH e FADH<sub>2</sub> e também de eletrões, mecanismo capaz de gerar espécies reativas de oxigénio. Os eletrões provenientes da  $\beta$ -oxidação que não são usados na cadeia respiratória para a produção de ATP (libertando dióxido de carbono e água) podem reagir com o oxigénio,

originando os ROS. Cerca de 1 a 5% do oxigénio consumido na cadeia respiratória não é reduzido a água ou dióxido de carbono, originando ROS, percentagem que pode ser ainda maior se existirem mitocôndrias disfuncionais.

Os efeitos dos ROS são vários e a diferentes níveis da célula. A peroxidação dos AG polinsaturados origina a formação de derivados aldeídicos de longa duração, o 4-hidroxi-2-nenonal (HNE) e o malonilaldeído (MDA), que podem causar lesão celular, incluindo esteatose microvesicular (184, 185), proteólise da Apo-B, com redução da capacidade de formação das VLDL e conseqüente acumulação de TG (186). Levam ainda à depleção do ATP e da NAD (adenina dinucleótido), lesão do ácido desoxirribonucleico (ADN), alterações nas proteínas e oxidação nos lípidos das membranas, por peroxidação, promovendo a libertação de citocinas (187). Foi também documentada a produção de TNF- $\alpha$  e aumento da produção do fator de crescimento TGF- $\beta_1$  (“*transforming growth factor- $\beta_1$* ”), que ativa as células estreladas e os miofibroblastos, originando fibrose (188). Os AG exercem também a sua toxicidade sobre as mitocôndrias, induzindo permeabilização das suas membranas e aumento da produção de ROS, quando expostas a elevados teores de AG, aqui também através da estimulação da apoptose das mitocôndrias (150, 168), num processo em que a participação da catepsina B é essencial (189). As mitocôndrias, principal fonte das espécies reativas de oxigénio, são simultaneamente um dos seus principais alvos, nomeadamente o ADN e a cadeia respiratória mitocondrial, afetando a produção de ATP e contribuindo para a morte celular (190). Embora este conhecimento seja proveniente sobretudo de estudos animais, em fígados humanos com NASH também se evidenciou a presença dos produtos de peroxidação lipídica (191), levando a supor que um aumento do aporte de AGL ao fígado leve ao aumento da produção destas espécies reativas de oxigénio.

Os AGL podem também ser oxidados noutros locais, quando o seu afluxo ultrapassa a capacidade das mitocôndrias (192). É o caso do RE liso ( $\omega$ -oxidação), do citocromo P450 (CYP) ou dos peroxisomas ( $\beta$ -oxidação), aqui iniciada pela Acil-CoA e originando igualmente a produção de peróxido de hidrogénio. Os AG de cadeia longa são metabolizados no citocromo 2E1 (CYP2E1) e a sua expressão está favorecida em resposta ao aumento do seu aporte (193).

### 3.5. Relevância da sobrecarga de ferro no fígado gordo não alcoólico

Estando o FGNA relacionado predominantemente com os metabolismos glucídico e lipídico, outros elementos têm sido avaliados no estudo da sua fisiopatologia e, embora a sua participação não esteja ainda esclarecida, são motivo de atenção crescente. É o caso do ferro, vital para o organismo humano, utilizado em proteínas de transporte do oxigénio (hemoglobina e mioglobina) e várias enzimas, mas com cujo excesso o organismo tem dificuldade em lidar.

O fígado participa na homeostase do ferro de diversas formas: produz a maioria das proteínas ligadas ao seu metabolismo (transferrina, ferritina e hepcidina), armazena o excesso de ferro e funciona como reserva, mobilizável quando necessário. Porque o ferro livre é tóxico, em condições normais é armazenado com a ferritina, sobretudo nos hepatócitos, embora exista em todas as células hepáticas. Quando em excesso, ultrapassando a capacidade da ferritina, é armazenado também na hemossiderina, um complexo formado por ferritina degradada e hidróxido de ferro, insolúvel e dificilmente mobilizável (194).

O conteúdo hepático normal de ferro é inferior a 35  $\mu\text{mol/g}$  de peso seco, mas na hemocromatose ou na talassémia ultrapassa os 200-250  $\mu\text{mol/g}$ , associa-se a fibrose e cirrose (195, 196) e contribui para a inflamação e IR (197, 198). É conhecida desde há anos a associação da IR com o aumento do teor hepático de ferro (199) e com ferritinemia elevada (200, 201), o que também é comprovado pela melhoria da sensibilidade à insulina e do valor das aminotransferases (201, 202) após a realização de flebotomias em doentes com FGNA.

Para além dos distúrbios primários do metabolismo do ferro, nos últimos anos foi reconhecida a associação entre a sobrecarga de ferro e várias doenças hepáticas, bem como as suas implicações no prognóstico das mesmas. Desde há alguns anos tem sido reconhecida uma forma de sobrecarga de ferro, fora do contexto da hemocromatose, ainda sem uma explicação fisiopatológica evidente e que surge muitas vezes no contexto de outras patologias hepáticas. Referida na literatura por DIOS (“*Dysmetabolic Iron Overload Syndrome*”) (203) esta síndrome dismetabólica de sobrecarga é caracterizada por excesso hepático de ferro (nos hepatócitos e nos macrófagos), elevação da ferritina sérica, ausência de inflamação e saturação da transferrina normal ou ligeiramente elevada (204). Associa-se à obesidade, à diabetes *mellitus* tipo 2, ao abuso de álcool e à hepatite

C crónica (205-207) e constitui atualmente a forma mais frequente de sobrecarga hepática de ferro. É observada em cerca de um terço dos doentes com SM e FGNA (205, 208, 209), em cerca de 40% dos doentes com hepatite crónica pelo vírus C (206) e num número significativo de doentes com doença hepática alcoólica (DHA) (207, 210).

A importância da ferritina como marcador prognóstico do FGNA foi realçada num estudo em 628 adultos com FGNA, submetidos a biópsia, nos quais valores de ferritina superiores a 1,5 vezes o limite superior do normal se associaram a maior teor de ferro hepático, maior gravidade das lesões histológicas e em que a ferritina constituiu um fator independente predizente de fibrose hepática. Mesmo nos doentes em que não foi detetado aumento do teor hepático de ferro, a ferritinemia elevada associou-se a maior gravidade histológica (211).

Como a síndrome dismetabólica de sobrecarga de ferro e a hiperferritinemia associada ao FGNA partilham algumas características, foi proposto serem duas faces da mesma moeda (205). De facto, são comuns a ambas as condições as alterações metabólicas, o fígado gordo e a hiperferritinemia com saturação de transferrina normal ou quase, apesar de demonstração de alguma sobrecarga de ferro, hepática e no organismo no seu todo, na síndrome dismetabólica de sobrecarga de ferro.

É conhecido que o excesso de ferro pode estimular o *stress* oxidativo e mesmo a carcinogénese, tendo sido encontrada maior incidência de CHC em doentes com EHNA (212, 213) em relação aos controlos. Ao acumular-se nos hepatócitos o ferro origina *stress* oxidativo através da formação de radicais hidroxilo e catalisa a peroxidação lipídica, gerando malonilaldeído capaz de ativar as células estreladas. Embora ainda sem comprovação, a toxicidade sobre as células de Kupffer foi também apontada como responsável pelo início da fibrose (214), tendo ainda sido referidas a lesão oxidativa do ADN (215), a atividade imunomoduladora na resposta a agentes infecciosos (como os vírus) e a diminuição da vigilância anti tumoral, sendo proposta também uma alteração na resposta aos medicamentos imunomoduladores (216, 217). A influência do local de acumulação de ferro no fígado sobre a gravidade das lesões histológicas em doentes com FGNA foi também apreciada, havendo trabalhos a indicar que a acumulação nos hepatócitos tem mais risco (218) e outros a referir a acumulação não parenquimatosa como associada a maior inflamação e fibrose (219), o que pode estar em relação com diferentes influências genéticas, pois são trabalhos com populações diversas, europeia e norte-americana.

Podendo a sobrecarga de ferro agravar a fibrose, a associação dos genes da hemocromatose com o FGNA foi também pesquisada. Num estudo italiano recente, foram comparados doentes com FGNA com controlos, quanto à presença dos genes da hemocromatose (HFE) e sua associação com a gravidade das lesões histológicas (218). A sobrecarga de ferro parenquimatosa foi associada a maior gravidade histológica, relativamente à sobrecarga não parenquimatosa, mas apenas um terço dos doentes com mutações dos genes HFE tinham siderose e a acumulação de ferro nos hepatócitos só ocorreu em metade dos portadores de alterações do gene HFE, pelo que a presença de mutações não pode ser usada para identificar depósitos de ferro parenquimatosos. Também não foi possível demonstrar relação entre a presença de mutações dos genes HFE e a gravidade da fibrose. Outros estudos com objetivo semelhante demonstraram associação do aumento dos depósitos de ferro com esteatose nalguns, alguma associação com inflamação noutros, mas em nenhum com fibrose (218, 220, 221).

A possibilidade de outros genes poderem causar distúrbios do metabolismo do ferro foi também estudada. Por exemplo, foi descrita uma elevada prevalência das mutações do gene da alfa-1-antitripsina (AAT), nomeadamente dos alelos *Piz* e *Pis*, que estão associados a cirrose e CHC (222, 223), em doentes com FGNA, associado a hiperferritinemia, saturação normal da transferrina e siderose sinusoidal (224). Foi sugerido por alguns autores que a AAT poderá alterar o metabolismo do ferro mediante indução de *stress* no RE (225). O papel de outros genes, como a beta-globina, foi também pesquisado, mas são necessários mais estudos para esclarecimento do seu papel no FGNA (226).

Um outro aspeto relevante é o papel que o ferro pode ter na doença cardiovascular (DCV), que reconhecidamente surge associada ao FGNA e é uma causa importante de morbilidade e mortalidade nestes doentes. De facto, foi demonstrado o aumento do ferro nos macrófagos das paredes das artérias ateroscleróticas (227) e foi sugerido que o aumento das reservas de ferro possa ser considerado um marcador de risco cardiovascular, pelo menos por alguns autores (228). A favor desta teoria estão alguns trabalhos em que a depleção de ferro diminuiu a aterogénese em modelos animais (227), a doação de sangue foi associada a diminuição do enfarte do miocárdio (229) e as flebotomias associaram-se a diminuição da progressão da DCV (230).

De toda a forma, embora seja reconhecido ao ferro um contributo na evolução de esteatose a fibrose, não sendo a fibrose comum a todos os casos de síndrome

dismetabólica de sobrecarga de ferro, é provável que essa evolução necessite da participação de outros fatores.

Na sequência do conhecimento da relação entre a sobrecarga de ferro, a IR e o FGNA, o efeito da espoliação de ferro, sobretudo através de flebotomias na EHNA, foi estudado em vários trabalhos, reforçando a importância dessa associação. Apesar de alguns destes estudos incluírem poucos doentes ou serem não controlados, foi demonstrada a melhoria da IR em doentes com e sem intolerância à glicose (231, 232) e em doadores de sangue habituais (233) e a melhoria da ferritina, dos parâmetros metabólicos e dos testes de função hepática, na ausência de perda de peso (234). Num estudo controlado, com 128 doentes seguidos durante 12 meses, foi demonstrada melhoria da IR com a depleção de ferro, superior à conseguida pela alteração do estilo de vida, independentemente dos fatores de confusão, sendo a vantagem decorrente da flebotomia mais significativa se a ferritinemia de base for superior a 320 ng/ml (235). Assim, a depleção de ferro poderá ser uma opção de terapêutica nos doentes em que seja documentada a sobrecarga.

### **3.6. Tecido adiposo e esteatohepatite não alcoólica (EHNA)**

A gordura corporal está depositada sobretudo no tecido celular subcutâneo, 80% ou mais a nível abdominal, nos glúteos e na região femoral, normalmente logo abaixo da pele e acima dos músculos. A gordura visceral representa cerca de 20% no homem e 5 a 8% na mulher e está normalmente situada por baixo dos músculos abdominais, no grande e pequeno epiplon, a nível mesentérico, estando alguma ainda a nível retroperitoneal (236, 237). Desde há muito que se reconhece à gordura visceral um papel ativo na origem da SM (238), conferindo maior importância à distribuição da gordura do que propriamente à massa gorda total do indivíduo. O seu papel, por exemplo, é notório em indivíduos sem excesso ponderal, mas ditos “metabolicamente obesos”, com predisposição, nos quais o ganho de gordura visceral se traduz no aparecimento de IR (239). É o caso de grupos de doentes asiáticos, que, embora tenham menor IMC, dado o aumento da gordura visceral apresentam um risco elevado para FGNA (240).

A maior preponderância da gordura visceral, em relação à subcutânea, na génese da patologia metabólica e cardiovascular é explicada quer pela drenagem venosa da mesma pela veia porta, que facilita a chegada de grandes quantidades de AG ao fígado, quer por outras particularidades, como sejam: maior *turnover* lipídico da gordura visceral

relativamente à subcutânea, maiores níveis de AMPc, maior sensibilidade aos efeitos lipolíticos das catecolaminas, menor resposta à ação antilipolítica da insulina e menor atividade da lipoproteína lipase (241-244). Por outro lado, a expressão de vários mediadores inflamatórios – IL-6, IL-8, resistina, visfatina, PAI-1 (Inibidor do Ativador do Plasminogénio) e o MCP-1 (proteína quimiotática dos monócitos) – é maior na gordura visceral, enquanto a leptina, a adiponectina e adiposina têm maior expressão no tecido adiposo subcutâneo (241, 245, 246).

Até agora foram identificadas várias dezenas de adipocitocinas, péptidos produzidos no tecido adiposo com efeitos locais e sistêmicos, que podem ser pró ou anti-inflamatórias e que, por isso, têm capacidade de iniciar ou manter um clima inflamatório sistêmico e hepático. É o caso da adiponectina, hormona anti-inflamatória produzida pelo tecido adiposo, que ajuda a regular o metabolismo da glicose e dos AG e cujos níveis plasmáticos estão na proporção indireta dos do tecido adiposo. O aumento dos seus níveis reduz o teor de gordura hepática, melhora a resistência à insulina e regista níveis menores quando há excesso de gordura visceral (247-250).

A leptina é produzida sobretudo no tecido adiposo, tendo os obesos níveis aumentados. Reduz a ingestão de alimentos e promove o consumo energético (251). Atua no sistema nervoso central, estimula a captação e a oxidação dos AGL no músculo e no fígado e diminui a secreção de insulina no pâncreas e a expressão da pré pró-insulina e a apoptose das células  $\beta$ , contribuindo para a IR e o estado inflamatório. Os níveis elevados de leptina, pela ação no *feedback* negativo da leptina, originam leptino-resistência (252).

Outra hormona que surge aumentada nos obesos é a resistina, segregada pelas células mononucleares do tecido adiposo e com efeitos pró-aterogénicos e pró-inflamatórios, parecendo favorecer a IR, não estando ainda totalmente esclarecido o seu papel (253, 254). Os efeitos de outras adipocitocinas necessitam ainda de esclarecimento adicional.

O tecido adiposo pode também influenciar a etiopatogenia da EHNA pela produção de mediadores inflamatórios. São o caso da IL-6 e do  $\text{TNF}\alpha$ , aumentados em doentes obesos, diminuindo a seu nível plasmático quando há perda de peso. A IL-6 poderia atuar como indutora de IR hepática, facilitando a fosforilação do recetor da insulina e inibindo a sua transmissão de sinal (255-257), podendo as alterações inflamatórias no tecido adiposo anteceder a inflamação hepática.

### 3.7. Imunidade inata e EHNA

A imunidade inata surge pela integração de mecanismos de reconhecimento de padrões patogênicos, normalmente proteínas expressas pelas células do sistema imune inato, que desencadeiam a resposta de defesa celular e humoral ao reconhecerem padrões associados a germens, caso dos PAMPs (“*pathogen-associated molecular patterns*”), ou associados a padrões moleculares, caso dos DAMPs (“*damage-associated molecular patterns*”). Nos últimos anos alguns destes mecanismos de defesa têm sido implicados também na fisiopatologia da EHNA, nomeadamente os recetores do tipo Toll, (“*Toll-like receptors*”, ou TLR), os “*Nucleotide-binding oligomerization domain*” (NOD) e os “*Nucleotide-binding domain Leucine-rich-repeat containing receptors*” (NLR), embora o conhecimento nesta área seja sobretudo proveniente da sinalização e menos sobre o estado funcional das células nos doentes com EHNA.

Os TLRs são uma família de recetores proteicos celulares, transmembranares, que desempenham um papel importante na resposta imunológica inata, pois ativam a sinalização pró-inflamatória em resposta a patógenos microbianos. Representam a primeira linha de defesa em caso de infeção bacteriana ou viral, mas a continuidade do seu estímulo produz doença. No fígado, são expressos em várias células e embora os indivíduos saudáveis tenham alguma tolerância aos TLRs, fígados afetados por FGNA demonstraram maior sensibilidade (258), o mesmo tendo sido descrito em associação com a proliferação bacteriana intestinal e o conseqüente aumento da permeabilidade intestinal, na resposta ao complexo de ligação dos lipopolissacáridos dos microrganismos com os recetores TLR (TLR-LPS) (259). Além do FGNA, têm sido implicados na fisiopatologia de outras doenças, nomeadamente hepatites virais e mesmo no CHC (260). Nos mamíferos foram identificados 13 TLRs diferentes, mas têm sido sobretudo os TLR2, o TLR4, o TLR5 e o TLR9, que reconhecem respetivamente o peptidoglicano, os lipopolisacáridos (LPS), a flagelina e o ADN bacteriano (261) associados à EHNA.

O TLR4 é ativado pelo LPS proveniente das bactérias Gram negativas intestinais e está também aumentado após ingestão de dietas ricas em gordura ou frutose, ou deficientes em metionina, colina, dietas que se sabe alterarem a microbiota e a permeabilidade intestinais. Os LPS estão intimamente ligados ao desenvolvimento de FGNA e a sua ligação aos TLR4 é uma via de sinalização importante na progressão da doença. Quando injetados na corrente sanguínea, cerca de 80% dos LPS acumulam-se rapidamente no

figado (em 20 a 30 minutos). Em experiências com ratinhos com EHNA induzida pela alimentação foram demonstrados níveis circulantes elevados de LPS (261, 262), obesidade e IR (263). A ligação dos AG livres aos TLR4 desencadeia a produção de citocinas nas células intestinais e reforça a compreensão do papel do intestino na contribuição para a inflamação e a IR (264). O papel dos TLR4-LPS na gênese do FGNA é atestado pelo facto de ratinhos mutantes, com supressão do TLR4, não desenvolveram ativação de genes inflamatórios quando submetidos a uma dieta rica em gordura, lipogénica (265, 266). Em seres humanos com SM, diabetes e FGNA foram também documentados níveis elevados de LPS circulantes (267, 268).

Aos TLR9, que reconhecem “motivos” Gpc presentes no ADN de bactérias e de hepatócitos apoptóticos, foi também atribuído papel de promotor da esteatohepatite, em vários modelos da doença (269, 270). Isto foi comprovado em ratinhos deficientes em TLR9, que ficaram protegidos de esteatose, inflamação hepática e fibrose (260, 269, 271) após alimentação deficiente em colina, quando comparados com animais sem essa deficiência.

Os TLR2 reconhecem vários ligandos de bactérias Gram positivas (peptidoglicano e ácido lipoteicóico), vírus, fungos e protozoários. A sua participação no FGNA não está ainda totalmente esclarecida, atribuindo-lhe alguns autores um papel protetor, mediado pela IL-6 (272). Estes resultados são confirmados por trabalhos em ratinhos sem expressão dos TLR2 (“*knockout*”), alimentados com uma dieta usada habitualmente para induzir EHNA, nos quais não houve doença tão avançada quanto o esperado (273, 274). Alguns autores sugerem que o seu papel depende da população bacteriana intestinal (261).

Os TLR-5 são recetores para a flagelina bacteriana e a sua ausência foi associada a infeções intestinais (275). Igualmente, sem estar ainda esclarecida, é provável a sua participação no desenvolvimento da SM, uma vez que a ausência da sua expressão, motivou desenvolvimento de SM, obesidade, IR e EH e a transferência da microbiota intestinal para ratinhos sem a deficiência resultou em doença hepática nos recetores (276). O inflamasoma é um complexo proteico variado que desempenha um papel importante na resposta imune inata e participa na produção das citocinas pró-inflamatórias interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e IL-18, associadas à infeção, à inflamação e à autoimunidade. Os NLR estão presentes em várias vias ligadas à morte celular e noutros mecanismos imunes e um deles em especial, o NLRP3, que é responsável, entre outros, pela ativação

da sinalização pela IL-1, foi implicado em várias patologias hepáticas, como a isquemia e a toxicidade medicamentosa, ao FGNA e à fibrose hepática (277). Foi demonstrado em animais que a falta de inibidores da IL-1 se associou a maior propensão para EHNA (278). Apesar de serem necessários mais estudos para esclarecer o papel do inflamasoma, os dados já disponíveis apontam para a sua participação na regulação da resposta inflamatória intestinal a um grande número de patógenos, na manutenção do equilíbrio da flora intestinal e na EHNA, contribuindo para a inflamação hepática (260). Por outro lado, a microbiota intestinal e o inflamasoma podem ter um papel de regulação negativa no FGNA, na EHNA e em múltiplos aspectos da SM, o que foi demonstrado, nomeadamente, para os NLRP6, NLRP3 e a proteína efetora IL-18. Em ratinhos com deficiência dessas proteínas do inflamasoma, coabitando com os “*wild type*” sem a deficiência, verificou-se exacerbação da obesidade e da EH (279, 280).

A sinalização dos TLR leva à produção de mediadores inflamatórios, que além da regulação do metabolismo lipídico e da sinalização da insulina, como já dito antes, têm um papel na progressão da EHNA. São os casos do TNF- $\alpha$  e da IL- $\beta$ 1, cuja importância foi comprovada em experiências animais em que se demonstrou que o seu bloqueio limitou a evolução da doença (278, 281). Por outro lado, ratinhos deficientes nos TLR 2, 4 e 9 têm menor expressão de citocinas, mesmo quando alimentados com uma dieta lipogénica (deficiente em colina e metionina) (262, 269, 273).

Outras células têm sido também estudadas e, embora sem que o seu papel esteja esclarecido, sabe-se que, por exemplo, as NKT (“*natural Killer T cells*”) diminuem com o teor de esteatose e aumentam com a inflamação e fibrose (282, 283).

### **3.8. Relevância do eixo intestino-fígado na EHNA**

Nos últimos anos, além do excesso de peso, da falta de exercício físico, ou dos fatores genéticos, a microbiota intestinal (conteúdo genómico e metabólico dos microrganismos intestinais, incluindo bactérias, vírus, parasitas, etc.) ganhou protagonismo na fisiopatologia da EHNA, associada a alteração do equilíbrio da flora intestinal, a disbiose. Embora toda a complexidade da participação da microbiota na EHNA aguarde esclarecimento total, desde há algum tempo que é conhecida a associação entre a proliferação bacteriana intestinal, a obesidade e o FGNA, com base sobretudo em conhecimentos provenientes de experiências em animais (284, 285), estando a emergir

estudos humanos. A importância da microbiota intestinal é também atestada pela sua dimensão: cerca de 2000 espécies, 100 trilhões de bactérias e um genoma cerca de 150 vezes o humano (286).

Apesar do conhecimento atual ser ainda limitado, os dados já conhecidos apontam para a existência dum fenótipo de obesidade ao nível da microbiota intestinal e não apenas duma alteração isolada da população bacteriana (287, 288). Várias experiências em animais têm sido levadas a cabo, com demonstração da influência da microbiota na indução de obesidade, desde a manutenção do peso apesar duma dieta com teor elevado de calorias em ratinhos com ausência de microbiota intestinal (289) até à evidência do aumento de peso em ratinhos que receberam microbiota de similares obesos *versus* os que receberam microbiota de ratinhos magros (287).

Segundo a maioria dos autores, as interações entre a microbiota intestinal, a alimentação e o aumento da permeabilidade da parede do intestino, por um lado e a esteatose e a inflamação hepática, por outro, estão relacionadas com vários fatores: melhor absorção das calorias da dieta, aumento da permeabilidade da parede intestinal e maior facilidade de entrada de bactérias na circulação portal, tendo como pano de fundo o estímulo da imunidade inata. Não perdendo de vista que muitos dos gérmens intestinais serão apenas comensais e não interferem no equilíbrio com o hospedeiro, a evidência científica aponta para que a microbiota intestinal tenha um papel marcante na absorção de nutrientes e na constituição das reservas energética e lipídica, mas também na resposta imune, quer como protetora fisiológica, quer influenciando o clima inflamatório verificado no FGNA e na EHNA.

A ocorrência de proliferação da população bacteriana do intestino delgado tem sido relacionada, em vários trabalhos, com a maior alteração da permeabilidade intestinal, secundariamente à ação sobre as junções celulares intestinais e associada à EHNA (270, 290). Este assunto foi objeto de atenção numa publicação, conjugando uma meta-análise com um trabalho experimental em ratinhos. A meta-análise evidenciou um aumento da permeabilidade intestinal em cerca de 40% dos doentes com FGNA e em cerca de 50% dos doentes com EHNA, relativamente aos controlos. Quanto aos resultados experimentais, demonstraram que essa alteração surge apenas depois do aparecimento da inflamação hepática, um dado importante que, se reproduzido noutros trabalhos, poderá ajudar a entender melhor as alterações neste âmbito (291).

No intestino há pelo menos 9 grandes grupos de bactérias residentes, pertencentes aos filos *Actinobactérias*, *Bacteroidetes*, *Cianobactérias*, *Deferribactérias*, *Firmicutes*, *Proteobactéria*, *Tenericutes*, *TM7* e *Verrucomicrobia*. Destes, os *Bacteroidetes* e os *Firmicutes* são os mais representativos, tanto no homem como nos roedores (292).

Dum modo geral, mesmo em humanos obesos, os níveis das *Firmicutes* (Gram-positivas) estão aumentados e os de *Bacteroidetes* (Gram-negativas encontradas normalmente no intestino, membranas e mucosas) estão diminuídos, podendo o aumento da relação entre eles ser considerado típico da obesidade (293, 294). Numa das primeiras experiências que demonstraram a influência da microbiota na origem da obesidade, ratinhos com intestino sem gérmens foram “infetados” com conteúdo intestinal proveniente de ratinhos “normais”, com ganho de peso e aumento da gordura corporal, apesar de não haver alteração na alimentação. O facto de terem sido *Bacteroides* comensais a ser colocados nos ratinhos sem gérmens intestinais, levanta no entanto a dúvida se a população bacteriana intestinal é causa ou consequência da obesidade (285). A demonstração do efeito da dieta com alto teor de calorias comparativamente a uma com baixo teor de calorias sobre a população bacteriana do intestino foi comprovada noutro trabalho em que foram necessários apenas 3 dias para condicionar uma adaptação na flora intestinal, com 20% de aumento de *Firmicutes* e 20% de diminuição de *Bacteroidetes*, traduzidos num ganho de 150 Kcal diários nesses indivíduos (295). A razão aventada seria o aumento da fermentação e hidrólise de polissacáridos, não digeridos de outra forma, que ao serem transformados em monossacáridos ou AG de cadeia curta, passariam a poder ser absorvidos. Metabolitos como o acetato, o propionato ou o butirato podem funcionar como reguladores do apetite, mas se produzidos em grande quantidade podem originar TG no fígado e funcionar também como sinalizadores de recetores intestinais, desencadeando inflamação (296, 297).

A intervenção da microbiota no metabolismo lipídico pode-se verificar a outro nível, pela supressão da expressão no epitélio intestinal do *Fiaf* (fator adipocitário induzido pelo jejum), que inibe a lipoproteína lípase, do qual resulta o aumento da síntese hepática de TG que se acumulam no tecido adiposo (298). Por outro lado, as enzimas bacterianas podem atuar noutros locais, como por exemplo na colina, um fosfolípido que integra a membrana celular e participa no metabolismo lipídico, na produção das VLDL. A microbiota, além de consumir a colina tornando-a indisponível para a inclusão nos lípidos exportados pelo fígado, metaboliza-a, produzindo metilaminas (di e trimetilamina), que

são tóxicas, causando inflamação e fibrose hepáticas depois de absorvidas e transportadas ao fígado (299, 300). Por isto se compreende que o teor de colina na dieta influencie a microbiota e secundariamente a EH (301).

Na procura duma explicação para a associação entre a população bacteriana intestinal, a obesidade e o FGNA, foi também sugerido que possa estar relacionada com o aumento dos TLR2 e dos TLR 4, pois ratinhos mutantes, sem expressão de TLR2 ou de TLR4, tiveram menos FGNA após ingestão de dietas com altos teores de gordura indutoras de FGNA/EHNA e com níveis elevados de bactérias Gram positivas (262, 302), tendo sido sugerida a possibilidade de existir uma reação cruzada entre ambos os recetores (261). Outra hipótese seria a falta de recetores intestinais TLR2, identificada em ratinhos como facilitadora da entrada em circulação de LPS, promotores de alterações compatíveis com a SM (303). A endotoxémia persistente, mesmo em níveis baixos por infusão de LPS, origina obesidade em ratinhos na presença desses recetores (263).

Outras famílias bacterianas, menos numerosas, podem também ter papéis importantes, que, sem estarem ainda esclarecidos, poderão ter intervenção, por exemplo, ao nível da IR. É o caso dum trabalho que refere o aumento da população de *Akkermansia muciniphila*, que representa 3 a 5% da população microbiana em adultos saudáveis (304), em ratinhos após 6 semanas de toma de metformina (305).

A microbiota intestinal foi também associada à produção de álcool endógeno. O aumento das *Proteobacterias*, entre elas a *Escherichia*, foi associado ao aumento da produção de etanol intestinal em crianças obesas (306). Esses resultados necessitam de confirmação, pois adultos submetidos a cirurgia de *by-pass* em Y de Roux, com aumento da população de *Escherichia*, tiveram melhoria da obesidade e do controle metabólico (261).

O aumento da permeabilidade intestinal, documentado em humanos e animais obesos, pode ser induzido por uma dieta rica em gordura, permitindo a translocação de bactérias e de produtos bacterianos e a sua presença nos tecidos pode exacerbar a IR, a inflamação hepática e a fibrose (307). Por outro lado, a permeabilidade intestinal pode ser alterada pela modificação da população bacteriana, como foi demonstrado após perda de *Bifidobacterium* envolvidas na manutenção da barreira intestinal (308, 309), ou à presença de bactérias do género das Enterobacteriáceas (310).

Além destes aspetos, foi também evidenciado que a obesidade pode ser influenciada pelo sistema endocanabinoide, estimulado por um estado de inflamação crónica de baixo grau, secundária à endotoxémia, com produção de LPS. Os autores demonstraram que a

microbiota modula o sistema endocanabinoide interferindo secundariamente com a permeabilidade intestinal, a adipogênese e a função do tecido adiposo (311).

Como já referido, a disbiose pode ainda contribuir para o desenvolvimento de CHC. A promoção deste tumor foi associada à sinalização efetuada pelo TLR4 (312) e através do metabolismo intestinal dos ácidos biliares (313). Neste caso, a inibição da produção de ácido desoxicólico a partir dos ácidos biliares primários no intestino, evitou o desenvolvimento de CHC em modelos animais (313), realçando o papel dos ácidos biliares na carcinogénese.

Um outro aspeto da relação entre conteúdo intestinal e EHNA é o que se prende com a possível ação terapêutica da flora intestinal na evolução da doença e, sobretudo, o possível interesse terapêutico dos probióticos na evolução da mesma. Os probióticos são comensais vivos que têm sido invocados na melhoria da saúde do hospedeiro. Os mais usados em ensaios têm sido os lactobacilos, os estreptococos e as bifidobactérias. Os *Bifidobacterium* e os *Lactobacillus* produzem ácido láctico e outros metabolitos e assim impedem o crescimento das bactérias Gram negativas (261).

Alguns estudos têm sido publicados com resultados promissores na evolução da EHNA sobretudo em modelos animais. Vários trabalhos têm demonstrado redução da colesterolémia, da gordura visceral e da IR com *Bifidobacterium* (314) e prevenção da EH e da EHNA com *Lactobacillus* (315, 316). Outros trabalhos demonstraram em modelos animais uma diminuição da produção de LPS e da expressão de TNF- $\alpha$  (315, 317). Um outro aspeto da ação dos probióticos é a melhoria da permeabilidade intestinal, por exemplo aumentando a expressão de proteínas de junção (318), ou controlando a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 e IFN- $\gamma$ ) (319). Finalmente, embora ainda sujeito a confirmação, foi sugerida a hipótese de que os probióticos possam originar ligandos para os TLR, que produzam uma resposta anti-inflamatória em vez de inflamatória (261).

A reprodutibilidade destes conhecimentos nos seres humanos é mais difícil, porque a microbiota intestinal é muito maior do que a que é ingerida e porque existe uma grande variabilidade individual (320, 321). De toda a forma, estudos do efeito dos lactobacilos em adultos e crianças com EHNA demonstraram melhoria bioquímica, com redução das aminotransferases (322, 323).

Os prebióticos são substâncias presentes em certos alimentos, que não são digeridos, e que podem ser benéficos por melhorarem a microbiota intestinal, melhorar a função de

barreira intestinal ou melhorarem o metabolismo lipídico. Parte da microbiota intestinal consegue digerir carboidratos complexos, transformando-os em AG de cadeia curta, os quais podem ser usados como fontes de energia, mas também lhes são atribuídas funções de reforço da barreira intestinal e diminuindo a produção de LPS (324, 325).

### **3.9. Vitamina D e FGNA**

A Vitamina D (VD) é uma hormona esteroide, predominantemente sintetizada na pele pela radiação solar ultravioleta B, (7-dihidrocolesterol, colecalciferol, ou Vitamina D<sub>3</sub>) e em menor percentagem proveniente da dieta, especialmente óleo de peixe e gema de ovo (ergocalciferol, Vitamina D<sub>2</sub>) (326). A pré-vitamina produzida na pele pode ser armazenada nos adipócitos ou sofrer duas hidroxilações, no fígado e no rim, formando 1,25-dihidroxitamina D, [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] ou calcitriol, a forma mais ativa da vitamina D (327). Como a forma [25(OH)D<sub>3</sub>] tem maior semivida (de 2 a 3 semanas) e níveis séricos mais estáveis é a que se doseia habitualmente (328).

A vitamina D, que circula no sangue ligada a proteínas, controla direta ou indiretamente a expressão de mais de 200 genes, sendo os seus efeitos mediados por recetores nucleares (VDR) presentes em mais de 30 tecidos e células diferentes (328-331). Para além da homeostase do cálcio e do osso, têm sido atribuídos à VD efeitos pleiotrópicos, incluindo mecanismos de proliferação e diferenciação celular, imunidade inapta e adaptativa e reparação do DNA (332-338).

A hipovitaminose D está presente numa proporção importante da população mundial (329) e pode existir em percentagens consideráveis nos doentes portadores de doença hepática crónica (339), associando-se a um aumento da mortalidade na população em geral, por causas variadas, incluindo patologia cardiovascular (340, 341).

A primeira referência à hipovitaminose D associada a maior dificuldade em controlar a diabetes nos meses de inverno foi feita há já algumas décadas em residentes na Antártica (342). Posteriormente, foi demonstrada uma relação inversa entre a VD sérica e a presença de diabetes (343, 344), uma possível interação e melhoria da função das células β (345-348) e uma correlação positiva com a adiponectina (349-352). Estudos animais demonstraram que a hipovitaminose D diminuía a função das células beta e a sensibilidade à insulina, contribuindo para a perda do controle glicémico e atribuíram à VD um papel no metabolismo hepático dos glúcidos e lípidos, promovendo a função e a

sobrevivência dos ilhéus de Langerhans (353, 354), ajudando na prevenção e controle da DM2 induzida pela obesidade e, conseqüentemente, do FGNA. Além disso, vários estudos associaram níveis baixos da VD à IR, a diabetes, à intolerância à glicose, à SM (355, 356) e às doenças cardiovasculares (357, 358). Esta noção foi reforçada pela demonstração da melhoria da secreção e da sensibilidade à insulina após suplementação com vitamina D (359-361).

Dado o papel do fígado no metabolismo e na homeostasia da vitamina D, a sua deficiência pode ser consequência ou causa da patologia hepática, faltando ainda estabelecer o verdadeiro sentido da ligação entre ambas. Nos últimos anos tem sido sugerida a contribuição da hipovitaminose D em várias doenças hepáticas, como, por exemplo, a hepatite C (362, 363). Em doentes com FGNA foi documentada deficiência da vitamina D em vários grupos de doentes, inclusive adolescentes (364, 365). Em duas meta-análises, doentes com FGNA e EHNA tinham níveis de VD mais baixos do que os seus controles (366, 367). Outro estudo reportou que nos doentes com FGNA a hipovitaminose D estava associada a alterações histológicas mais graves (368). À VD foi ainda associado um efeito repressivo na formação do colagénio tipo I nas células estreladas hepáticas humanas, com um potencial efeito na regressão da fibrose hepática (369). Contudo, outros estudos não demonstraram a associação entre a hipovitaminose D e o FGNA (370-372). Num desses, nem a presença de insuficiência (20–30 ng/ml), nem de deficiência (< 20 ng/ml) se associaram a histologia hepática mais grave (370). Apesar de algum benefício da suplementação com VD em doentes com IR (344), tal como demonstrado em ratos com esteatohepatite induzida pela dieta (373), nenhum benefício foi encontrado em indivíduos com tolerância normal à glucose (374).

Apesar de alguma evidência, epidemiológica e experimental, da associação entre deficiência de VD e FGNA, a verdadeira relevância da hipovitaminose D para o FGNA e a direção real duma possível associação entre ambos necessita de clarificação. Outra dúvida relevante para o contexto estritamente “não ósseo” é se os valores propostos pela sociedade americana de Endocrinologia (375) para o metabolismo do cálcio e as necessidades ósseas fisiológicas (deficiência se < 20 ng/ml e insuficiência se 20–30 ng/ml) se podem aplicar linearmente às outras patologias, ou a grupos populacionais. Por exemplo, na mesma altura em que a Sociedade de Endocrinologia propôs os valores referidos atrás, o *Institute of Medicine* (IOM), assumindo uma exposição solar mínima,

assumiu que valores de apenas 16 ng/ml seriam suficientes para metade da população e que 20 ng/ml satisfariam as necessidades em VD de quase toda a população (326).

### **3.10. FGNA: doença determinada geneticamente?**

O aumento epidémico da obesidade e da IR, da alteração dos padrões alimentares e do sedentarismo crescentes em largas faixas da população, sobretudo nas últimas décadas, são propícios ao FGNA, que assim se tornou a etiologia mais frequente das alterações das provas hepáticas (376). Contudo, a verdade é que só alguns doentes desenvolvem morbidade e mortalidade significativas, o que favorece a hipótese da existência duma predisposição genética individual. Por exemplo, é conhecida a predisposição para a doença em familiares de portadores de FGNA (377) e a sua menor incidência em afro-americanos, relativamente a indivíduos de origem hispânica ou a caucasianos (50, 378-380).

A introdução de ferramentas como a GWAS (*Genome Wide Association Studies*) permitiu que nos últimos anos fossem conhecidos alguns determinantes genéticos em várias patologias, o mesmo sucedendo no FGNA. Do já conhecido, a maioria dos alelos terá uma influência menor na doença, sendo poucos aqueles com ação mais vincada (381). Nenhum gene foi ainda associado a um padrão hereditário claro, o que dificulta encontrar um risco genético suficientemente forte para determinar a doença ou condicionar uma evolução mais grave (382). No caso do FGNA, as associações genéticas avaliadas são sobretudo provenientes de estudos caso-controle (383) e foram baseadas na sua concordância com algumas das manifestações habituais da doença: alterações bioquímicas, EH ou inflamação e fibrose. O facto de apenas alguns estudos usarem o critério histológico compromete a força das associações, entretanto descritas, entre genes e a doença.

Sendo o FGNA uma doença multifatorial, envolvendo outros órgãos, como o tecido adiposo ou o intestino, influenciado por vários metabolismos regulados por uma multiplicidade de genes, é legítimo suspeitar que a probabilidade de associações entre fígado gordo e mutações genéticas poderá ser alta. Os fatores genéticos com potencial envolvimento na doença repartem-se por várias áreas, desde a regulação do metabolismo glucídico e da IR, à regulação do metabolismo lipídico, nomeadamente dos TG, dos fatores pró-inflamatórios e da fibrose (383), além de muitos outros.

Muitos genes ligados aos vários aspetos da fisiopatologia do FGNA têm sido estudados, permitindo maior compreensão da sua influência, fazendo supor que num futuro mais ou menos próximo possam ser encontradas relações mais claras com a frequência ou formas mais graves da doença. A influência destes conhecimentos no diagnóstico, no manuseamento destes doentes e no seu prognóstico está ainda por avaliar, quanto mais não seja porque se trata de análises que não estão disponíveis na prática clínica diária, permanecendo no âmbito da investigação. Por outro lado, muitos desses trabalhos têm sido feitos com grupos pequenos de doentes, o que não permite obter significado estatístico e não foram reproduzidos com outros doentes, pelo que a interpretação dos resultados deve ser feita com precaução, embora com grande expectativa. Por isso, a referência seguinte será apenas para os trabalhos considerados mais representativos em face dos resultados publicados.

Dos muitos genes pesquisados até agora, o do *PNPLA3* (“*Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3*”), também conhecido como adiponutrina, que codifica a triacilglicerol-lipase (enzima major da hidrólise dos TG nos adipócitos), é aquele a cuja presença foi reconhecida maior suscetibilidade para o FGNA. Foi também sobre ele o primeiro estudo GWAS sobre o FGNA, publicado em 2008 com base no *Dallas Heart Study* (384, 385). Neste estudo foi identificado o SNP (“*single nucleotide polymorphism*”) rs738409, codificando a substituição isoleucina-metionina na posição 148 do gene da adiponutrina, o *PNPLA3* (Ile148Met), com maior expressão nos hispânicos e menor nos afro-americanos e associado a um teor maior de TG hepáticos. O mesmo estudo identificou um segundo SNP, o rs6006460, com uma distribuição oposta e associado a uma redução da deposição de TG.

Mais recentemente, foram descritos outros genes próximos do *PNPLA3* com intervenção no desenvolvimento da EH e da inflamação lobular e/ou da fibrose (386): “*neurocan*” (NCAN; rs2228603), gene com um provável papel na adesão celular, “*protein phosphatase 1 regulatory subunit 3B*” (PPP1R3B; rs4240624), proteína reguladora da glucocinase (GCKR; rs780094) e “*lisofosfolipase-like protein 1*” (LYPLAL1; rs12137855) e mesmo em variantes destes, como a PPP1R3B (rs2126259), que intervém na síntese do glicogénio (387). Outros genes, próximos, têm vindo a ser apreciados e poderão vir a ser referenciados, entretanto.

Nos últimos anos foram realizados vários estudos que confirmaram que a presença dos alelos GG do SNP rs738409 do *PNPLA3* se associava a alterações mais acentuadas das

provas de função hepática (388), maior teor de esteatose, maior gravidade histológica nas populações adulta (389-391) e pediátrica (392-394), em diferentes etnias e até a maior frequência de CHC (395, 396). Ao invés, não foi demonstrada associação deste gene à IR (390, 397) ou a eventos habitualmente descritos na SM (398). No homem este gene tem maior expressão no fígado (399, 400), após a ingestão de alimentos e em indivíduos obesos (390). Em estudos animais aparece com menor expressão após o jejum (401). A sua ação não está ainda esclarecida, mas poderá estar relacionada com alterações estruturais no seu sítio catalítico (402), ou a uma menor secreção das VLDL, pela dificuldade em mobilizar os TG dos seus depósitos intracelulares, devido à perda da atividade hidrolítica da enzima (403). A presença de alguns AG, como o palmítico (saturado), o oleico (monoinsaturado), ou o linoleico (polinsaturado), aumentam a expressão do *PNPLA3* (399), sugerindo que a atividade do *PNPLA3* pode ser influenciada pelo meio metabólico envolvente.

Dados recentes apontam para que a presença do polimorfismo na posição 148 do gene do *PNPLA3* (rs738409, isoleucina-metionina) esteja também associada a maior gravidade da DHA, com maiores inflamação, cirrose e tendência para o CHC (404).

O GCKR, gene da proteína reguladora da glucocinase, contribui para o controle do metabolismo glucídico. Os polimorfismos rs780094 e rs1260326, relacionados entre si, aumentam a atividade da enzima e promovem a entrada de glicose na célula, aumentam a produção de malonil-CoA, que, além de substrato para a lipogénese, pode bloquear a  $\beta$ -oxidação dos AG (386, 405). Num estudo europeu (406, 407) a associação da presença do *PNPLA3* e do rs1260326 foi proposta como explicação para cerca de um terço do teor de esteatose em crianças obesas.

O PEMT (fosfatidiletanolamina *N*-metiltransferase) catalisa a síntese da fosfatidilcolina, necessária para a produção das VLDL. Dois estudos reportaram a associação entre FGNA e um polimorfismo no exon 8 (408, 409).

Aspetos relacionados com a síntese do colesterol foram também já investigados, neste caso o *SREBP*. A presença do gene mutante *SREBP1C* foi associado a maior esteatose e EHNA e o polimorfismo *SREBP* fator 2 foi relacionado com maior gravidade histológica, sendo considerado um fator predizente para EHNA num grupo de doentes italianos (410, 411).

Sendo o *stress* oxidativo considerado um cofator importante na fisiopatologia do FGNA, a sua regulação genética foi também alvo de atenção. O gene da superóxido dismutase

tipo 2, mitocondrial (SOD2), enzima que catalisa a conversão do superóxido em peróxido de hidrogénio e oxigénio, foi também estudado. O polimorfismo Crs4880T, que resulta numa troca da valina pela leucina, alterando a estrutura terciária da proteína, foi associado a maior taxa de fibrose, em doentes europeus (412), sendo descritos resultados semelhantes em doentes japoneses (413).

O KLF6 (*Krüppel-like factor 6*) é um fator de transcrição expresso nas células estreladas que regula a expressão de vários genes que medeiam a fibrose e funciona como supressor tumoral, tendo alguns polimorfismos sido já relacionados com várias neoplasias. O SNP rs3750861 foi associado a fibrose hepática no FGNA (414).

A angiotensina II exerce as suas ações através de dois recetores. O recetor 1, codificado pelo gene ATGR1, é expresso nas células estreladas hepáticas e promove a sobrevivência dos miofibroblastos hepáticos. O SNP rs3772622 foi relacionado com esteatohepatite e fibrose, sendo referida uma interação com o *PNPLA3* (415, 416). Estes achados favorecem a hipótese dos antagonistas dos recetores da angiotensina poderem diminuir a fibrose associada ao FGNA (417).

A adiponectina (hormona reguladora da homeostase da energia mediante sensibilização da insulina) e a leptina (hormona reguladora do apetite e do consumo de energia) são ambas produzidas pelos adipócitos e os aspetos relacionados com os seus genes também já foram objeto de análise. A adiponectina é codificada pelo gene *ADIPOQ*. Num trabalho com doentes japoneses foi encontrada uma associação entre a homozigotia do polimorfismo +45, G/G, IR e maior fibrose (418). A leptina é codificada pelo gene *LEPR* e uma mutação no gene rs6700896 foi associada em doentes egípcios com maior esteatose (419).

À semelhança do já conhecido noutras patologias, os aspetos epigenéticos também têm merecido atenção, como por exemplo a metilação do ADN, que foi relacionada com maior probabilidade de diferenciação das células estreladas e maior fibrose (420).

Apesar das incertezas que ainda existem, é grande a expectativa de que os aspetos genéticos possam vir a ajudar à nossa compreensão da doença num futuro que se espera não muito distante.

#### 4. Diagnóstico

Com uma clínica habitualmente pobre e inespecífica, na grande maioria dos casos a EH é diagnosticada sobretudo em exames de imagem realizados para esclarecimento de alterações analíticas sugestivas de patologia hepática, ou encontrada no decurso do estudo de outras condições. É mais provável suspeitar de EH pela presença de fatores de risco (diabetes e/ou obesidade) do que pela presença de manifestações clínicas, sendo que a evolução até fases mais tardias da doença se pode verificar de modo totalmente silencioso, com apenas algumas referências a dor no hipocôndrio direito ou fadiga. Em formas mais avançadas, como a cirrose, são mais frequentes os sinais e sintomas típicos dessa fase, ou as manifestações associadas às suas complicações, como ascite, hipertensão portal, encefalopatia, insuficiência hepática e CHC, à semelhança das doenças do fígado doutras etiologias (421).

Alterações no exame físico, como a *acantose nigricans*, são descritas apenas nalguns casos raros e em fases avançadas da doença, mas estão correlacionadas sobretudo com a IR, a SM e a obesidade (421).

Recentemente começou a ser prestada atenção à alteração da qualidade de vida destes doentes, ao cansaço ou à produtividade no trabalho, uma perceção dos doentes nem sempre coincidente com a apreciação clínica, os chamados “*patient-reported outcomes*” (PROs). Os dados que vão sendo conhecidos referem que estes doentes reportam uma qualidade de vida e saúde mental inferiores à população em geral (422) e maior fadiga do que os doentes com outras patologias hepáticas crónicas (423).

Se a esteatose isolada pode ser diagnosticada por métodos imagiológicos, não invasivos, o diagnóstico da EHNA assenta em critérios histológicos, que só podem ser obtidos por biópsia hepática, mas cuja realização levanta questões que devem ser tidas em conta previamente. Por ser um gesto cruento, obriga à permanência em meio hospitalar mesmo que por tempo limitado e é passível de efeitos secundários, que, embora raros e controláveis na grande maioria dos casos, podem, no extremo e muito raramente (aproximadamente 1 em 10 000 a 1 em 12 000), condicionar inclusive a morte (424-426). Por outro lado, a amostragem obtida numa biópsia normal, mesmo que de boa qualidade (mínimo de 15 mm, desejavelmente 25 mm) (427), pode não permitir um diagnóstico exato, por corresponder apenas a 1:50 000 do volume hepático e, como tal, não ser representativa da totalidade do órgão, onde a doença nem sempre tem uma distribuição

uniforme (428). Apesar disso, é ainda o método de eleição para o diagnóstico e aquele com o qual têm sido comparadas nos últimos anos várias metodologias semiquantitativas, entretanto propostas, baseadas em critérios clínicos e laboratoriais.

Os habituais testes laboratoriais reveladores de lise celular podem ser úteis no diagnóstico, mas têm um papel limitado. Sendo expectável que lesões hepatocitárias mais graves se acompanhem de valores mais elevados de aminotransferases, nomeadamente da ALT, na EHNA nem sempre se verifica essa correlação, podendo inclusive a ALT ter um carácter flutuante (429). Por outro lado, é conhecida a presença de aminotransferases normais mesmo em estádios mais avançados da doença (430, 431) e foi demonstrado risco de progressão em doentes com ALT normal (432). A relação AST/ALT superior a 1 é referida como associada a maior risco de doença mais avançada, nomeadamente de fibrose (433).

Além das aminotransferases, a alteração laboratorial mais frequente é a elevação da gama-glutamiltanspeptidase (GGT). Níveis mais elevados de GGT foram associados a um aumento da mortalidade (434, 435) e foi ainda sugerido que pudessem prever maior fibrose (436).

A primeira abordagem diagnóstica da esteatose é feita habitualmente por exames de imagem, sendo a ecografia o primeiro recurso na grande maioria dos casos, pela sua disponibilidade e baixo custo. Tem uma sensibilidade de 60-94% e uma especificidade de 66-97% (437, 438) e a sua performance foi melhorada pela introdução na avaliação de critérios como a diferença de “brilho” entre o fígado e o rim (439). Apresenta como maiores limitações ser dependente do operador (440) e a dificuldade para diagnosticar teores ligeiros ou moderados de esteatose, inferiores a 30%, situação agravada para níveis abaixo dos 10% (38) e nos obesos (441).

Ao longo dos anos outros métodos de imagem foram sendo utilizados, sobretudo no diagnóstico de casos individuais e menos no rastreio de populações. É o caso do *doppler* hepático, baseado nas alterações da pulsatilidade e velocidade de fluxo na veia porta, na influência exercida sobre a veia e artéria hepáticas (442, 443), dados que necessitam de esclarecimentos adicionais. A tomografia computadorizada (TC), com grande utilidade no diagnóstico da esteatose focal (444), relativamente à ecografia tem maior especificidade, embora com baixa sensibilidade (445). Tem como limitações a pouca disponibilidade e a elevada dose de radiação, o que a torna indicada apenas para casos isolados. A ressonância magnética (RM) revela uma grande capacidade de diagnosticar mesmo

pequenas infiltrações de gordura, em torno dos 3% (446). A espectroscopia, em particular, tem uma sensibilidade e uma especificidade acima dos 90%, com a vantagem de poder avaliar uma grande área hepática. Tal como a TC é dispendiosa e pouco acessível, podendo a presença de fibrose interferir na avaliação da esteatose (447). Posteriormente à introdução da elastografia transitória hepática para avaliação da rigidez do fígado, tradutora do grau de fibrose e usada em doenças hepáticas crónicas, foi desenvolvido um novo método, o *Controlled Attenuation Parameter* (ou “CAP”), mediante a adaptação da sonda, com resultados capazes de dar informação sobre o teor de esteatose (448). Foi demonstrada grande capacidade de diagnóstico inclusive para graus de esteatose de 10% (449), tendo sido obtida uma AUROC (*Area Under Receiver Operating Characteristic Curve*) de 0,94 para esteatose moderada e de 0,95 para esteatose grave, com *cut-offs* de 243 dB/m para esteatose ligeira e de 303,5 dB/m para esteatose grave, num grupo populacional português (450). Não estando acessível em todos os centros e devendo ainda ser validado noutros estudos, poderá ser um método adequado para estudos populacionais, por ser não invasivo, fácil de realizar e pouco dependente do utilizador.

Nos anos mais recentes foram propostos vários *scores* baseados em dados do exame físico e/ou em testes laboratoriais de rotina, na tentativa de predizer a presença de EH, evitando realização de exames complementares, sobretudo os métodos invasivos, como a biópsia hepática e passíveis de serem usados em rastreio de indivíduos assintomáticos.

O *Steatotest* (451), descrito em 2005, recorre a 12 variáveis numa fórmula desconhecida, é calculado *on line* e pago, tendo sido testado sobretudo em França.

O FLI (*Fatty Liver Index*), construído a partir dum estudo populacional (o “*Dionysos Nutrition & Liver Study*”), com recurso ao IMC, perímetro abdominal, TG e GGT, tem um valor preditivo de 0,84 (IC95% 0,81-0,87) na deteção do FG (452). Valores inferiores a 30 são tidos como excluindo FG e valores superiores a 60 considerados diagnósticos de EH. Foi considerado adequado para estudos de base populacional, usado em vez da ecografia e reproduzido posteriormente noutros estudos. Foi também correlacionado com a mortalidade global, por DCV e cancro, num grupo de adultos provenientes do estudo Cremona para estudo da prevalência da diabetes *mellitus* em Itália (453).

O *NAFLD Liver Fat Score*, com recurso a valores laboratoriais simples (SM, DM2, insulinémia em jejum, AST e AST/ALT), foi comparado numa população finlandesa com a espectroscopia por RM, tendo sido demonstrada uma especificidade e uma sensibilidade de 95% (454).

À semelhança da esteatose, vários autores têm tentado criar um modelo capaz de prever a presença da EHNA, evitando a biópsia, pelo menos nalguns casos. Até agora nenhum reuniu o consenso geral, tendo sido publicados vários nos últimos anos, quase sempre a aguardar validação noutras populações, diferentes daquelas nas quais foram estudados inicialmente.

São exemplos desses *scores*, o “HAIR”, proposto em 2001 (455) com base na presença de hipertensão arterial, do valor da ALT e da IR em doentes com obesidade mórbida, o *NASH Test* de 2006 proposto por Poynard *et al*, que à semelhança do *Steatotest*, é calculado *on line*, sob pagamento, tem boa especificidade, mas baixa sensibilidade (456). O *NASH Diagnostics*, engloba numa fórmula não revelada, citoqueratina 18 (CK18), adiponectina e resistina e depois de ensaiada em doentes com obesidade mórbida (457), foi rearranjado (*NASH Diagnostics panel*), com inclusão de diabetes, IMC, TG e CK18, apresentando melhoria da sensibilidade e da especificidade (458).

Outros testes propostos foram o “*Nice model*” incorporando o CK18, a ALT e o SM (459), ou o “*Apoptosis Panel*” com recurso a marcadores de apoptose (460).

Foram ainda propostos marcadores séricos individuais como a adiponectina (461), o TNF- $\alpha$ , a interleucina-6 (462), a Proteína C Reativa (463), cujos estudos demonstraram pouca capacidade diagnóstica, ou não foram validados por outros autores. Alguns autores procuraram explorar marcadores associados à fisiopatologia da EHNA, como os fragmentos da CK-18, como marcador de necrose, que se mostrou como o único com alguma capacidade de diferenciar entre esteatose e EHNA (464, 465).

Os exames imagiológicos, nomeadamente a ecografia, inclusive com contraste de microbolhas (466) e a TC, isolados ou conjugados com outros parâmetros, foram testados com o objetivo de estabelecer diferenças entre esteatose e EHNA. Apesar de alguns resultados obtidos (467, 468), nomeadamente com a medição do diâmetro longitudinal do baço, não provaram eficácia suficiente para cumprirem satisfatoriamente esse objetivo. A procura estendeu-se a outros testes, como a deteção de carbono (13C) respiratório, proveniente da metabolização hepática da cafeína, que está comprometida em cirróticos e indivíduos com EHNA (469), ou a testes cintigráficos, que poderão vir a ser considerados no estudo desta condição após validação externa.

O aparecimento de fibrose constitui um marco importante na evolução da EHNA, com implicações prognósticas e, por isso, a procura da fibrose hepática por métodos não invasivos constitui uma preocupação desde cedo (28, 29). Alguns marcadores séricos

foram avaliados, como o ácido hialurónico ou o colagénio tipo IV, com resultados promissores, aguardando confirmação (470, 471).

Ao longo dos anos foram construídos vários scores com intenção de predizer a fibrose. De todos, destaca-se o *NAFLD Fibrosis Score* (472) (idade, glicémia, IMC, plaquetas, albumina e relação AST/ALT), validado em diferentes grupos e útil sobretudo na fibrose avançada, que fica no entanto por esclarecer em cerca de 25% dos casos.

O *FIB-4* (473), apresentado como podendo identificar os casos de fibrose avançada, numa forma vantajosa mesmo quando comparado com outros testes e recorrendo a doseamentos laboratoriais simples (idade, aminotransferases e número de plaquetas).

O *BAAT* (idade, IMC, ALT e TG), simples, com especificidade de 100%, embora menor sensibilidade, sobretudo nos graus intermédios (474).

O *BARD* (475), muito simples de determinar, mas com resultados diferentes nos grupos onde foi testado.

O “*ELF*” (*European Liver Fibrosis Study Group*), demonstrou valor sobretudo nos casos de fibrose avançada (476).

O *Fibrotest* (477), com fórmula não divulgada, usado primeiro nas hepatites virais e depois no FGNA, com grande especificidade para fibrose avançada mas com dificuldade em distinguir fibrose ligeira da moderada.

O *Fibrometer* (478) e o *NAFLD Diagnostic Panel* (458), poderão igualmente ser úteis nos estádios avançados da fibrose, necessitando ainda de validação.

Mais recentemente, em face do desenvolvimento e aplicação dos métodos de análise de metabolitos em fluídos biológicos, tem sido possível associar perfis séricos lipídicos com o aparecimento e desenvolvimento do FGNA e os diferentes estádios de gravidade. Estando ainda no começo, mostra-se muito promissora, pois os autores conseguiram identificar uma assinatura lipídica sérica e relacioná-la com aspetos do FGNA, como por exemplo a síntese hepática lipídica de novo, ou a alteração da oxidação dos AGL não esterificados e propor diferentes perfis séricos para o FGNA e a presença de fibrose, inclusive com diferentes gravidades (165, 479, 480).

Após a introdução da elastografia hepática transitória (ET) (Fibroscan), que mede a rigidez hepática, tradução da fibrose que possa existir, a utilização deste método alargou-se desde as hepatites virais até às outras patologias hepáticas, incluindo o FGNA. As maiores dificuldades de realização do exame são normalmente colocadas pela presença de espaços intercostais estreitos ou de obesidade marcada, devendo os valores ser

interpretados com cautela quando há atividade inflamatória ou colestase marcadas, ou ascite. Vários trabalhos têm vindo a ser publicados em relação ao FGNA, sendo consensual a capacidade do Fibroscan para diagnosticar fibrose avançada e cirrose. Numa meta-análise de 2011, a AUROC calculada foi de 0,94 (0,90-0,99), com uma sensibilidade de 0,94 (0,88-0,99) e uma especificidade de 0,95 (0,89-0,99) (464).

O ARFI (*Acoustic Radiation Force Impulse*) é uma tecnologia adaptada à ecografia que pode ser feita durante a mesma e que nos estudos já feitos, apesar dos poucos doentes incluídos, permite obter valores comparáveis aos do Fibroscan (481). Outros métodos desenvolvidos e realizados a partir de exames imagiológicos, têm vindo a ser propostos e poderão vir a desempenhar um papel importante na avaliação da fibrose devida ao FGNA. São o caso da elastografia em tempo real, (em simultâneo com a ecografia) e a elastografia por ressonância magnética, que necessitam ainda de validação.

## **5. Associação do FGNA com doença extra-hepática e outras condições**

A SM foi descrita em 1986 por Reaven (482), agrupa vários fatores de risco para DCV e DM2 e ocorre com uma frequência superior ao possível aparecimento isolado, aleatório, dos referidos fatores individualmente. Tem como substrato a IR, descrita em diabéticos não insulino-tratados, mas também em indivíduos com alterações no teste de tolerância à glicose e inclusive em 25% dos indivíduos não obesos e com teste de tolerância à glicose normal.

Com os anos foram propostas várias classificações da SM (Tabela I) que, embora com semelhanças, diferem nalguns aspetos, como por exemplo na relevância dada à presença de obesidade e entre si no modo como concretizam o diagnóstico (483). Anos mais tarde, o próprio autor do conceito considerou-o “fútil” e propôs o seu abandono, recomendando antes o controle “agressivo” dos fatores de risco individuais, quando presentes (484). De facto, a SM, recorrendo a critérios como a obesidade, a hipertensão arterial, a dislipidemia e a hiperglicemia, não contempla fatores de risco como os hábitos tabágicos, a idade, o sexo, o colesterol das LDL, ou mesmo fatores familiares que têm reconhecida importância na DCV. Apesar de se manter a dúvida se constitui uma entidade nosológica homogénea, reconhecida em classificações de doença, a verdade é que se vai mantendo na literatura e pode-se dizer em seu favor que permite uniformizar conceitos, foca a atenção em doentes

com risco de DCV e pode ajudar a melhorar a nossa compreensão da fisiopatologia dum grupo grande de doentes.

No entanto, é consensual a sua relação com a IR e a intolerância à glicose secundária a uma população crescente de AGL circulantes. Inicialmente é compensada por um hiperinsulinismo secundário ao aumento de secreção de insulina, mas após esgotadas as reservas das células beta pancreáticas, leva ao descontrolo desses AGL e ao aumento da produção de glicose pelo fígado, testemunhando a intervenção hepática na fisiopatologia da IR e a interligação do FGNA com a SM.

**Tabela I. Definições e critérios diagnósticos da síndrome metabólica**

	<b>OMS (1998)</b> (485)	<b>NCEP ATP III</b> (2004) (486)	<b>IDF</b> (2005) (487)	<b>AHA/NHLBI</b> (2005) (488)
<b>Critério obrigatório</b>	IR: IGO, HGJ, DM2 ou outra evidência de IR	Nenhum	Obesidade central: PA > 94 cm (H) > 80 cm (M)	Nenhum
<b>Critérios de diagnóstico</b>	IR ou DM e ≥ 2 dos seguintes	≥ 3 dos seguintes	Obesidade central e ≥ 2 dos seguintes	≥ 3 dos seguintes
<b>Obesidade</b>	H: cintura/anca 0,90 M: cintura/anca 0,85 e/ou IMC>30kg/m <sup>2</sup>	‡ H: PA > 102cm ‡ M: PA > 88cm	PA: ‡ HE: > 94cm ‡ ME: > 80cm	‡ H: PA > 102cm ‡ M: PA > 88cm
<b>Hiperglicémia</b>	IGO, HGJ, DM2	GJ ≥ 100 mg/dl, ou Re/ *	GJ ≥ 100 mg/dl, ou Re/ *	GJ ≥ 100 mg/dl, ou Re/ *
<b>Dislipidemia</b>	TG 150 mg/dl ou, C-HDL: <35 mg/dl (M), <39 mg/dl (F)	TG 150 mg/dl ou, C-HDL: <40 mg/dl (M), <50 mg/dl (F), ou Re/ *	TG 150 mg/dl ou, C-HDL: <40 mg/dl (M), <50 mg/dl (F), ou Re/ *	TG 150 mg/dl ou, C-HDL: <40 mg/dl (M), <50 mg/dl (F), ou Re/ *
<b>Hipertensão</b>	140/90 mmHg	TAS >130mmHg, ou, TAD >85mmHg, ou Re/ *	TAS >130mmHg, ou, TAD >85mmHg ou, Re/ *	TAS >130mmHg, ou, TAD >85mmHg ou Re/ *
<b>Outros</b>	Microalbuminúria			

‡ M: mulheres; H: homens; ME: mulheres europeias; HE: homens europeus. \* Re/: a fazer medicação. GJ: glicémia em jejum. TG: trigliceridemia. C-HDL: colesterolemia HDL. Critérios para obesidade central (PA) são específicos para cada população; os valores mostrados são para mulheres e homens, europeus

Os critérios de diagnóstico da SM incluem a hipertensão arterial, a hiperglicemia em jejum, a hipertrigliceridemia e a diminuição do C-HDL, que concorrem para um clima de intolerância à glicose, dislipidemia e estado pró-trombótico, pró-inflamatório e aterosclerótico. A medida do perímetro abdominal, tradutora da presença de gordura troncular e visceral, motivo de debate quanto aos pontos de corte que devem ser usados (variam entre sexos e grupos étnicos) é, no entanto, uma ferramenta reconhecidamente

importante, por exemplo nos cuidados primários, em ações de rastreio para sinalização de novos casos.

Entre o fígado e as manifestações da SM há uma relação bidirecional comprovada nos doentes. Depois de ser considerado como a manifestação hepática da SM, o FGNA foi identificado nos últimos anos como fator de risco para esta síndrome, condicionando pior controlo da diabetes e aumento da prevalência de doenças cardiovasculares (489, 490), na sequência da já referida deposição ectópica de gordura no fígado e da consequente IR. Por outro lado, a presença da SM aumenta o risco de evolução para EHNA (489-493).

Dos vários componentes da SM, os ligados à dislipidemia assumem uma associação forte com o FGNA. A hipertrigliceridemia é, por si só, um fator de risco para FGNA (494, 495) e a presença de colesterol LDL elevado é associada a lesões com inflamação, ou seja a EHNA (496). A obesidade e a deposição de gordura visceral estão reconhecidamente presentes na maioria dos doentes com FGNA, assumindo um papel determinante no seu desenvolvimento e agravamento. De facto, a maioria dos obesos têm FGNA e cerca de um terço têm EHNA (497). Vários trabalhos documentaram que o ganho de peso e a obesidade estão correlacionados com o aparecimento de FG e aumentam o risco de fibrose (433, 498, 499), embora numa meta-análise essa tendência não tenha sido confirmada (500). Apesar dos obesos terem deposição de gordura em vários órgãos e sistemas, até agora foi sobretudo a gordura visceral que assumiu relevância, pela sua capacidade de intervenção hormonal e por ter sido também correlacionada como fator de risco para doença necro-inflamatória e fibrótica mais avançada (501). O aumento da deposição da gordura noutras localizações, como a epicárdica, foi também relacionado com maior gravidade do FGNA em contexto de disfunção autonómica (502). Apesar desta associação, continuam a ser descritos casos de FGNA em doentes sem obesidade e a sua ausência em obesos (503). Paralelamente, têm sido descritas alterações metabólicas semelhantes às observadas em obesos em pessoas com IMC normal, em cerca de 5% ou mais da população, consoante os grupos estudados, tendo em comum com os portadores da SM, a IR e o sedentarismo (504). Nestes casos tem sido encontrado também FGNA (505).

O FGNA encontra-se associado a todos os componentes da SM, mas a relação com a DM2 tem sido das mais referidas na literatura. Em estudos populacionais, o FGNA foi encontrado em 30 a 70% dos diabéticos, os quais nem sempre registam alterações da enzimologia hepática, mesmo em presença de doença avançada com inflamação e fibrose

(432, 491, 506). Numa comparação entre 70 diabéticos e 70 pessoas saudáveis, os diabéticos apresentaram uma infiltração de gordura hepática 80% superior, sem, no entanto, haver subida das aminotransferases (507). A mesma ausência de relação entre a elevação da ALT e a presença de FGNA foi demonstrada num trabalho recente, em 103 diabéticos obesos, nos quais foi encontrada uma prevalência de FGNA em 50% dos casos (508). Estes resultados indicam que nestes doentes, para além duma prevalência elevada de FGNA, a suspeita não poderá ser feita apenas com base em critérios bioquímicos, o que poderá atrasar em muito o diagnóstico.

Por outro lado, a presença de gordura hepática nos diabéticos foi referida como determinante da dose de insulina necessária para estes doentes obterem um controle metabólico adequado (509).

Além do FGNA, a EHNA surge em muitos doentes com DM2 que têm um risco acrescido em 2 a 4 vezes de complicações hepáticas (491, 510), o que foi também confirmado num estudo prospetivo recente (511): foi identificado que os diabéticos tinham um risco de virem a morrer de doença hepática crónica, atribuída ao FGNA, de 2,47 vezes nos homens e de 2,7 vezes nas mulheres, relativamente aos controlos não diabéticos. Estes resultados aconselham claramente a prevenção e o diagnóstico precoce do FGNA nos diabéticos.

Além das causas hepáticas, há evidência de que o FGNA se associa a um aumento da mortalidade por todas as causas, como a cardiovascular ou as neoplasias (511-514). Têm surgido na literatura alguns trabalhos a sugerir a associação entre o FGNA e a HTA, quer apontando à HTA um papel favorecedor da fibrose hepática (500), quer sugerindo a relação inversa (505). A presença de hiperuricemia foi também associada, quer ao risco de EHNA, quer à sua gravidade, em vários estudos (515-517).

Nos últimos anos aumentou a evidência de que o FGNA, sobretudo a doença mais grave e com fibrose, está associado à DCV aterosclerótica, fibrilhação auricular e até insuficiência cardíaca (23, 518-521). Sendo ainda necessário esclarecer aspetos como a dimensão do risco ou a fisiopatologia que os liga, a DCV é a primeira causa de morte em muitos doentes com FGNA (25, 27, 522, 523) e a IR terá seguramente um papel determinante na ligação entre DCV e FGNA. Dadas as evidências, a abordagem destes doentes, deverá compreender também, a avaliação do risco cardiovascular, ao longo da sua evolução (523).

O FGNA, sobretudo em fases avançadas da doença, tem sido ainda associado à doença renal crónica, (524-526) e mais recentemente, a risco aumentado de demência (527, 528).

As grávidas que desenvolvem diabetes gestacional (DG) têm despertado atenção pelo risco de desenvolvimento de FGNA (529-531). Num estudo efetuado em diferentes zonas dos Estados Unidos, incluindo 1115 mulheres de raça branca e negra e com uma ou mais gravidezes, a DG foi diagnosticada em 124 (11%) (532). Após 25 anos de acompanhamento, o FGNA foi diagnosticado (por TC abdominal sem contraste) em 75 delas (7%). O risco de FGNA aos 25 anos, na análise simples, foi 2,56 vezes superior (95% CI: 1,44–4,55) nas mulheres com DG *versus* as que não tiveram DG. Na análise ajustada à idade, número de gravidezes, perímetro abdominal, IMC, HOMA-IR, triglicéridos e C-HDL de base, e também considerando o aumento do IMC nos anos de seguimento, a existência de DG manteve significado estatístico, com um OR de 2,29 (95% CI: 1,23–4,27, P = 0,01) para o aparecimento de FGNA na idade média da vida. Além da DG, o HOMA-IR (*Homeostatic Model Assessment, insulin resistance*) de base (OR: 1,77; 1,38–2,27; p < 0,01) e a hipertrigliceridemia (OR: 1,09; 1,03–1,14; p = 0,03) também se associaram à presença de FGNA ao 25º ano. O diagnóstico de diabetes incidental após a gravidez associou-se à presença de DG e de FGNA, sugerindo poder ser um elo de ligação entre ambos. Quando a análise foi feita apenas nas mulheres sem diabetes incidental, não foi encontrado significado estatístico entre DG e FGNA. No entanto, nas mulheres que desenvolveram DG foi diagnosticado um maior número de casos de FGNA na idade média. Apesar deste facto, que se poderá dever a menor poder estatístico, os autores reconhecem à DG a importância dum marcador precoce de FGNA e recomendam atenção e medidas de prevenção para diminuir o risco futuro de FGNA. Foi também o primeiro estudo a estabelecer a associação da DG e do FGNA em mulheres de raça negra.

Um outro estudo recente, realizado no Canadá em 476 grávidas, correlacionou a presença de EH por ecografia no primeiro trimestre (entre as 11 e as 14 semanas) com a possibilidade de disglucemia (hiperglicemia em jejum e intolerância à glicose, pelo teste de tolerância à glicose oral), ou DG às 24–28 semanas (533). O estudo reforça a ideia de que a presença de fígado gordo precocemente na gravidez, à semelhança do que se passa noutros contextos, sugere a presença de IR e a possibilidade de diabetes mais tarde e, por outro lado, que a medida da gordura hepática pode indicar as mulheres com maior risco de DG e que, por isso, beneficiam de vigilância mais apertada.

## 6. Tratamento

Apesar de reconhecida como entidade autónoma há anos, dos aumentos da prevalência e incidência e dos múltiplos ensaios terapêuticos, visando os vários mecanismos fisiopatológicos já identificados, não há ainda um tratamento farmacológico específico, aprovado e consensual, que seja eficaz na resolução da esteatohepatite e em impedir ou reverter a fibrose.

Apesar dos muitos ensaios realizados ou em curso, são várias as razões para a ausência de fármacos aprovados. Desde logo, a multiplicidade de fatores fisiopatológicos envolvidos, com uma heterogeneidade de fatores de risco e evolutiva entre doentes e a dificuldade em conseguir um modelo animal específico que reproduza as várias fases da doença (534). Depois, a identificação clara da população alvo a tratar, persistindo, por exemplo, a dúvida do empenho devido ao tratamento da EH, na ausência de inflamação concomitante, sobretudo em doentes com menor risco de progressão para EHNA, apesar de ser consensual a indicação para o tratamento das comorbilidades, como a dislipidemia e a diabetes frequentes nestes doentes. Nos ensaios clínicos, apesar do incremento dos testes indiretos, a seleção de doentes tem passado inevitavelmente pela biopsia hepática, levando à exclusão de alguns por recusa do exame. Acresce que alguns ensaios não são controlados com placebo e a duração do tratamento pode não ser a mais adequada para estudar a capacidade de melhoria de lesões, que poderão necessitar dum tempo mais prolongado. Finalmente, a juntar à falta de eficácia ou aos efeitos secundários de algumas moléculas, deverão ser tidas em conta a fisiopatologia multifatorial e a necessidade de replicar na vida real os possíveis benefícios encontrados nos ensaios. Todos estes fatores têm contribuído para que, apesar de inúmeros ensaios, ainda não exista um medicamento aprovado para FGNA ou EHNA.

Apesar de não haver consenso, a Associação Europeia para o Estudo do Fígado (EASL) recomenda o tratamento nos doentes com fibrose significativa (F2 ou superior) e nos doentes com maior risco de progressão (535).

Estando a EHNA associada a um excesso de energia consumida, habitualmente através de uma alimentação hipercalórica, em detrimento da energia despendida, é consensual a necessidade de inversão deste balanço energético, sendo claramente recomendada a perda de peso em todos os doentes com excesso ponderal ou obesidade. Este objetivo é difícil

de conseguir de forma sustentada e duradoura na prática clínica (536). Para além disso, deve ser promovido o controle dos eventos habitualmente englobados na SM.

A perda de peso deverá ser obtida pela dieta e pelo aumento do consumo energético, através de exercício físico (aeróbico ou de resistência), integrados numa mudança do estilo de vida. O objetivo é a diminuição do excesso de tecido adiposo ectópico (visceral e hepático), há muito identificado como fator de risco para FGNA e EHNA e doenças cardiovasculares associadas. O benefício obtido é proporcional à percentagem de redução do peso (537), sendo que para perdas entre 4 e 14% foram referidas diminuições de 35 a 81% nos TG intra-hepáticos (538). Associadas à perda de peso foram descritas melhoria das aminotransferases e da IR (539, 540) e da histologia hepática (537). A melhoria da inflamação hepática foi descrita para diminuições de peso em torno dos 10% (541). Outros autores, mais recentemente, descreveram resolução da EHNA, inclusive com melhoria da fibrose, quando foram conseguidas perdas de peso superiores aos 10% (542). Foi demonstrado que o exercício físico levou à diminuição da gordura visceral (medida por RM) e da EH (avaliada por espectroscopia <sup>1</sup>H-MRS) num grupo de adultos submetidos a exercício aeróbico durante 8 semanas, independentemente do volume e intensidade do mesmo (543). Mesmo sem perda de peso, o exercício físico permitiu a diminuição da gordura hepática (544, 545).

Como alguns doentes poderão ter dificuldade em tolerar o exercício aeróbico, o efeito do exercício de resistência foi também ensaiado em doentes com FGNA. Embora num grupo pequeno de doentes, mostrou eficácia quanto à diminuição da gordura hepática e à melhoria do controle glucídico, independentemente da perda de peso (546). Noutro estudo (547), em que foram comparados um programa de treino de resistência *versus* um grupo de controle, durante 3 meses, foi igualmente demonstrada diminuição da gordura hepática e da massa gorda, total e troncular, sem relação com a perda de peso, tendo ainda sido demonstrada baixa da colesterolémia e da ferritinémia nos doentes submetidos a exercício físico. Os dois tipos de exercício foram comparados num ensaio em doentes com diabetes tipo 2 e EHNA, sem terem sido demonstradas diferenças entre si quanto à redução da gordura hepática, visceral e total. O controle glicémico, medido pelo *clamp* euglicémico, foi também semelhante nos dois grupos (548).

Apesar de benéficos a longo prazo, a mudança do estilo de vida e a perda de peso são objetivos difíceis de conseguir e de manter, estimando alguns autores que apenas 50% dos indivíduos conseguem atingir o peso ideal (549, 550), havendo percentagens

consideráveis de doentes que registam variações ponderais importantes ao longo do tempo, mas sem conseguir estabilizar no peso desejável (536). Num estudo observacional baseado nos registos clínicos eletrónicos de cerca de 7 % da população do Reino Unido, entre 2004 e 2014, apenas cerca de 15% dos utentes atendidos em cuidados primários e submetidos a aconselhamento nutricional pelo seu médico conseguiram ter uma perda de peso sustentada. Nesse tempo, apenas 1 em cada 210 homens obesos e 1 em cada 167 mulheres obesas conseguiram o objetivo de chegar ao seu peso normal. Nos indivíduos com obesidade mórbida as dificuldades foram ainda maiores, pois mesmo reduções de apenas 5% do peso inicial só foram alcançadas em 12,5% dos indivíduos do sexo masculino e em cerca de 14,3 % das mulheres (536). Estes dados reforçam a noção da dificuldade do controle do peso ao nível dos cuidados primários e realçam a necessidade de se conseguir uma forte motivação pessoal dos doentes, mas também um aconselhamento nutricional especializado e uma orientação da prática do exercício físico. Nos doentes obesos em que, apesar da intervenção no estilo de vida, da dieta e do exercício físico, não é possível a perda de peso, a cirurgia bariátrica pode representar uma alternativa válida, ponderadas as indicações e os possíveis efeitos secundários. Pode ainda ser recomendada nos doentes com excesso de peso e diabetes (551). Associados à perda de peso, foram demonstrados resultados histológicos relevantes, com melhoria ou mesmo resolução da EHNA e da fibrose, em percentagens importantes dos doentes (552-555). Como os doentes com FGNA têm habitualmente um aporte energético excessivo para as suas necessidades, além do exercício físico o tratamento deve incluir uma intervenção na dieta, restringindo o aporte calórico. Ao longo das últimas décadas têm sido vários os trabalhos a demonstrar os benefícios da alteração do padrão dietético, mesmo sem perda concomitante de peso. Na ausência de ensaios clínicos aleatorizados, envolvendo um número elevado de doentes e que permitam conclusões definitivas, têm sido realizados vários trabalhos com este propósito. Reduções calóricas de 500 Kcal por dia resultaram em diminuição da gordura hepática (539, 556) e dietas com baixo teor de calorias (800 a 1800 kCal/dia), ou com restrição de hidratos de carbono (20 a 50 g/dia), proporcionam as maiores reduções no teor hepático de TG (557, 558). Foi demonstrado, embora num número pequeno de doentes, que baixos teores de hidratos de carbono, inferiores a 20 g/dia, podem melhorar a inflamação e a fibrose, associadamente à perda de peso (559). Para perdas de peso semelhantes, dietas com restrição de hidratos de carbono mostraram superioridade na melhoria da IR, do teor de gordura, da EH e da ALT, relativamente às

dietas com restrição de gorduras (560, 561). Isto, pese embora a dieta hipocalórica à custa da redução do teor de gordura também tenha provado ser eficaz na descida do teor intra-hepático de gorduras e na perda de peso (127).

A suplementação de alguns nutrientes tem merecido atenção desde sempre, tendo sido investigados vários deles. Nos últimos anos foi testado um possível papel protetor dos AG polinsaturados  $\omega$ -3, com dietas enriquecidas ou como suplementação. Vários trabalhos documentaram melhoria do perfil lipídico sérico (nomeadamente TG), da EH e da enzimologia hepática (562-564) em doentes com FGNA. Apesar de, na sua maioria, estes trabalhos incluírem um número limitado de doentes e sem controle histológico, um deles incluiu biópsia antes e no final, tendo sido relatada melhoria da inflamação e da fibrose (565). Este último trabalho demonstrou ainda que essa melhoria foi independente da perda de peso e um resultado semelhante foi descrito por outros autores, embora num número pequeno de doentes (566), reforçando a importância da atenção aos macronutrientes na dieta. Em contraponto claro a estes resultados, um ensaio publicado em 2014, prospetivo, multicêntrico, aleatorizado e em dupla ocultação, controlado com placebo e usando duas doses diferentes de ácido eicosapentanoico (ácido gordo sintético polinsaturado  $\omega$ -3), não demonstrou benefício histológico na esteatose, inflamação, balonização, ou no score de fibrose (567).

Relativamente à ingestão de proteínas, apesar de ter sido descrita uma associação entre FGNA e consumo de carne vermelha (568, 569), não há atualmente dados que suportem a proposta duma dieta hipoproteica nestes doentes.

Nos últimos anos vários centros têm chamado a atenção para a possibilidade da ingestão de café poder ter um papel protetor na inflamação hepática. Uma revisão publicada em 2014 aponta um papel protetor para o café nos doentes com várias patologias hepáticas, traduzido em melhoria analítica, evolução mais lenta para cirrose e, inclusive, uma menor taxa de CHC (570). No que respeita ao FGNA, foram publicados alguns trabalhos apontando a um menor teor de esteatose em pessoas que ingeriram café “expresso” (571), mas também café “regular”, de filtro (572), tendo sido apontada uma relação inversa entre a ingestão de café e o teor de fibrose, isto apesar da menor capacidade de proteção em relação ao teor de esteatose (573).

Um estudo prospetivo realizado num grupo de adultos israelitas e publicado recentemente confirma esses dados, associando a ingestão de 3 ou mais cafés por dia a menor risco de fibrose, mas sem influenciar o teor de EH (574). O benefício poderá ser devido à

capacidade da cafeína diminuir a proliferação das células estreladas (575), mas pode ser também da responsabilidade dos polifenóis existentes no café (576), à semelhança de outros existentes, por exemplo, nas uvas, não estando esta questão esclarecida ainda. Dados os resultados publicados até ao momento, não havendo recomendação para reforçar a ingestão de café, também não há motivos para restringir o seu consumo.

Os PPAR (*Peroxisome proliferator-activated receptor*) são recetores nucleares proteicos de 3 isótipos principais (*PPAR- $\alpha$* , *PPAR- $\beta/\delta$*  e *PPAR- $\gamma$* ) envolvidos, entre outros, nos metabolismos glucídico, lipídico, proteico, na proliferação celular e na inflamação. As tiazolidinedionas (glitazonas) são agonistas PPAR- $\gamma$  (e em menor extensão- $\alpha$ ) (554), estão indicadas no tratamento da DM2 e foram o grupo de fármacos mais estudado e experimentado no FGNA e EHNA, embora com resultados pouco promissores e efeitos secundários (577). O interesse nestes fármacos resultou da sua capacidade de melhorar a IR, aumentar o fluxo de AG para o tecido adiposo a partir do fígado e a secreção de adiponectina (578-580). Para além dessas ações, foi identificada capacidade de inibir o desenvolvimento dos miofibroblastos e propriedades anti-inflamatórias, aspetos que tornaram o seu uso mais atrativo neste contexto (581). No maior ensaio publicado até agora com um fármaco deste grupo, a pioglitazona foi comparada com a vitamina E e um placebo, durante 96 semanas, em 247 adultos com EHNA sem diabetes (*“Pioglitazone versus Vitamin E versus Placebo for the Treatment of Nondiabetic Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis”-PIVENS*) (577). Foi demonstrada melhoria dos parâmetros bioquímicos, redução da esteatose, da inflamação lobular e da balonização; quanto ao seu objetivo principal, a diminuição do índice de atividade da doença (o *NASH Activity Score – NAS*) em 2 pontos, sem agravar a fibrose, apesar de ter sido conseguido numa percentagem considerável de doentes, não teve significado estatístico. Outros ensaios com outros fármacos deste grupo foram também realizados, mas igualmente sem melhoria da fibrose. Após a paragem do tratamento, as alterações recidivaram numa percentagem elevada de doentes, com todos eles. Os efeitos secundários, como a retenção de líquidos, a perda de massa óssea com aumento do risco de fratura e a associação a enfarte do miocárdio, levaram à suspensão da sua comercialização, com exceção da pioglitazona, o único da classe ainda no mercado. A EASL, sugere que seja usada nas formas avançadas, em doentes não diabéticos, que não conseguiram aderir, ou não responderam, à mudança do estilo de vida, devendo ser usada com precaução nos doentes com insuficiência cardíaca (376, 535, 541).

Outros mecanismos fisiopatológicos foram também explorados na procura da terapêutica mais indicada, como é o caso do *stress* oxidativo, sendo aí a vitamina E um dos mais testados. Compreende 8 tocoferóis, sendo o  $\alpha$ -tocoferol o mais ativo e a sua ação resulta da presença nos fosfolípidos da membrana celular, onde impede a oxidação celular pelos radicais livres, sendo-lhe ainda atribuídas ações anti-inflamatórias e sobre a fibrose (557, 582-584). No já referido estudo PIVENS, 800 UI/dia demonstraram melhoria histológica em todos os parâmetros, exceto na fibrose. Foi também experimentada na população pediátrica, mas os resultados do ensaio TONIC (*Treatment of NAFLD in Children*), apenas demonstraram melhoria da balonização, sem alteração nos restantes parâmetros histológicos ou bioquímicos (585). A decisão de medicar estes doentes com vitamina E deve ser ponderada, tendo em conta os possíveis efeitos secundários, que podendo ser apenas um dado estatístico, têm sido descritos associados a doses acima das 150 UI/dia, que são as normalmente usadas nos ensaios. Tem sido relatado aumento da mortalidade global (586), da incidência de tumores da próstata (587) e de acidentes vasculares cerebrais hemorrágicos (588), o que, mesmo na ausência dum mecanismo fisiopatológico claro, leva alguns autores a recomendá-la apenas em adultos não diabéticos, com EHNA (541), de preferência por períodos curtos de tempo (535), pelo menos enquanto não forem realizados novos ensaios terapêuticos.

Sendo comum a dislipidemia nos doentes com FGNA, cujo prognóstico é fortemente influenciado pelas complicações associadas à aterosclerose, a necessidade de recurso a terapêutica farmacológica, nomeadamente estatinas, é muito frequente nestes doentes. Além da diminuição do risco cardiovascular, apenas foi evidenciada diminuição da EH quando associadas às vitaminas C e E (589) e alguma melhoria das aminotransferases (590). O seu uso nestes doentes não condiciona aumento do risco de hepatotoxicidade (591).

Muitas outras terapêuticas foram experimentadas nestes doentes, com ação dirigida aos diferentes momentos da fisiopatologia da EHNA, mas pelas razões apontadas antes, ou pelo pequeno número de doentes, ou pela ausência de grupo de controle ou de falta de poder estatístico, não se constituíram como alternativa útil. Um desses exemplos é o losartan, antagonista dos recetores da angiotensina, a que foi atribuída capacidade de promoção da sobrevivência dos miofibroblastos (592) e que mostrou alguma capacidade de diminuição da inflamação e da fibrose numa pequena série de doentes (417). Outro desses fármacos é a pentoxifilina, com capacidade de inibição das citocinas pró-

inflamatórias, incluindo o TNF- $\alpha$  e hepatoprotetora: num ensaio em 55 doentes com EHNA, publicado em 2011 (593), foi demonstrada melhoria do índice NAS e mesmo da fibrose, mas esses resultados ficaram a aguardar confirmação noutros ensaios para se poder recomendar o uso nestes doentes.

Outros fármacos, no entanto, contornaram essas dificuldades e posicionaram-se noutra patamar de desenvolvimento, deixando a expectativa de que no futuro a terapêutica da EHNA possa vir a contar com novas alternativas eficazes.

Os ácidos biliares intervêm na absorção dos lípidos alimentares, têm papel ativo no metabolismo do colesterol, são agonistas do recetor do farnesóide X e dum recetor transmembranar, a proteína G e, por isso, inibem a síntese lipídica de novo, a gluconeogénese hepática, a glicogenólise e melhoram o estado de IR (594), havendo evidência de inibirem a inflamação e a fibrose, hepáticas (595).

O ácido obeticólico (OCA), um agonista do recetor do farnesóide X, foi experimentado em alguns ensaios, sendo publicada uma análise preliminar acerca do mais recente (596). Tratou-se dum ensaio fase-3, randomizado e controlado contra placebo, com 1968 doentes incluídos (fibrose F1 a F3), em que foram testados 10 ou 25 mg/dia do OCA. Houve melhoria da fibrose em 18% com 10 mg ( $p=0,045$ ) e em 23% com 25 mg ( $p=0,0002$ ). Aos 18 meses, a resolução da NASH foi conseguida em 8% no grupo placebo, 11% no grupo de 10 mg de OCA ( $p=0,18$ ) e em 12% dos que fizeram 25 mg/dia de OCA ( $p=0,13$ ). O efeito secundário mais importante foi o prurido: 19% no grupo placebo, 28% no grupo dos 10 mg e 51% nos que fizeram 25 mg dia, sendo a gravidade referida geralmente como ligeira a moderada. A incidência de efeitos secundários hepáticos foi semelhante nos 3 grupos. Os efeitos mais graves foram mais frequentes no grupo dos 25 mg e foram correlacionados sobretudo com as comorbilidades ou as medicações concomitantes. Foi registada uma subida do colesterol LDL no primeiro mês, com uma estabilização dos valores ao 18º mês. Houve ainda necessidade de iniciar estatina, sobretudo no grupo medicado com 25 mg, com recuperação para os valores iniciais. Por razões de segurança, dados os efeitos secundários, a FDA requereu a continuação do estudo e nova análise dos dados, aguardando aprovação para o tratamento da EHNA.

O cilofexor, um agonista não esteroide dos recetores FXR foi ensaiado em doentes com EHNA, durante 24 semanas (100 mg vs 30 mg vs placebo), com boa tolerância em geral

(prurido sobretudo no grupo dos 100 mg) e melhoria da esteatose, da enzimologia hepática e dos níveis de ácidos biliares (597).

Os agonistas dos recetores PPAR têm sido também ensaiados dada a ação, entre outros, nos metabolismos lipídico e glucídico. Destes, o elafibranor foi estudado em ensaios de fase 2 e 3, sem sucesso quanto aos objetivos primários e secundários (*ClinicalTrials.gov*, NCT01694849 e NCT02704403, respetivamente). O lanafibranor (um pan-agonista PPAR) foi avaliado num ensaio de fase 2-b, aparentemente com maior sucesso em estudos pré-clínicos na melhoria da IR, da fibrose hepática, da expressão de genes inflamatórios e da ativação dos macrófagos (598), sendo necessários mais estudos.

Os agonistas do fator 21 de crescimento dos fibroblastos (*Fibroblast growth factor 21*, FGF21) são hormonas produzidas em resposta ao jejum com efeitos pleiotrópicos. Foi comprovada melhoria da sensibilidade à insulina e redução dos triglicéridos e do colesterol em ratos (599, 600), em primatas e em humanos (601, 602) com diabetes e obesidade. Algumas moléculas foram já submetidas a ensaios, caso da efruxifermina, com resultados promissores ao nível da EH e da fibrose (603), embora seja necessária confirmação noutros ensaios.

Um grupo similar é constituído pelos agonistas do fator 19 de crescimento dos fibroblastos (*Fibroblast growth factor 19*, FGF19), que promovem a inibição da lipogénese hepática induzida pela insulina e a inibição da síntese dos ácidos biliares a partir do colesterol, via citocromo P450 7A1 (604, 605). O NGM282 é um análogo sintético do FGF19 que foi ensaiado num estudo de fase 2b, em 50 doentes, com melhoria histológica, redução do score NAS e da fibrose às 12 semanas em 42% dos casos (*in ClinicalTrials.gov*: NCT03912532, acedida em 29/11/2021).

O icosabutato, um derivado sintético do ácido eicosapentanoico, oral, com elevada seletividade hepática, com ação anti-inflamatória e anti-fibrótica, foi ensaiado em 52 semanas, em doentes com EHNA, demonstrando melhoria do controlo glicémico e redução das lipoproteínas aterogénicas. (*in ClinicalTrials.gov*: NCT04052516, acedida em 29/11/2021).

Os inibidores da SGLT2 (*Sodium-Glucose Cotransporter 2*) foram experimentados neste âmbito também. A empaglifozina mostrou efeito sobretudo ao nível bioquímico e da esteatose (606), estando a aguardar resultados de mais ensaios. A dapaglifozina está em fase de ensaio (ensaio DEAN, vs placebo, ou junto com a vitamina E), aguardando-se resultados. Num ensaio em conjunto com o exanatido, em diabéticos com FGNA, houve

melhoria bioquímica, da EH e da fibrose, embora determinada apenas por *scores* de fibrose (607).

Os agonistas dos recetores GLP-1 (*Glucagon-like Peptide-1 Receptors*), usados na DM2 por melhorarem a sensibilidade à insulina, induzirem perda de peso e ajudarem à redução da EH, poderão ser úteis na EHNA. Após um primeiro ensaio em que o semaglutide revelou melhoria da EHNA e, em menor escala, reversão da fibrose (608), foi estudado posteriormente num ensaio de fase 2, com doses diárias de 0,1, 0,2, e 0,4 mg, em doentes com EHNA comprovada por biópsia (609). Houve melhoria significativa da EHNA (sobretudo na dose de 0,4 mg,  $p < 0,001$ ) e da fibrose, mas esta sem significado estatístico relativamente ao placebo ( $p = 0,48$ ). O liraglutido foi também testado em doentes com excesso de peso e EHNA, com e sem DM2 e/ou cirrose, num ensaio de fase 2, randomizado e controlado, com 1,8 mg subcutâneo, diariamente. Às 48 semanas a biópsia hepática confirmou melhoria histológica significativa (610). Sem excluir a possível proteção hepática do medicamento, os efeitos poderão refletir a perda de peso verificada. A nova apresentação de 3,0 mg, comercializada posteriormente, poderá ter resultados diferentes.

Contudo, um trabalho populacional recente, com um *follow-up* de cerca de 11 anos, sugeriu que os agonistas dos recetores GLP-1 tinham menor capacidade de impedir o aparecimento de EHNA e de CHC, comparados com a toma de insulina, enquanto as glitazonas (pioglitazona), no mesmo período de tempo, reduziram em 68% o risco de EHNA, quando comparadas com as sulfonilureias (611). Mais ensaios clínicos e trabalhos prospetivos poderão ajudar a esclarecer em definitivo estas dúvidas.

Recentemente, o resmetirom (MGL-3196), um agonista seletivo dos recetores  $\beta$  das hormonas tiroideias, demonstrou redução da fibrose *vs* placebo, com diminuição da deposição de colagénio no fígado e melhoria da sobrecarga lipídica, casos do colesterol LDL, apolipoproteína B e dos triglicerídeos, com possível benefício cardiovascular em doentes com fibrose F1 a F3 (612), havendo ainda alguns ensaios a decorrer. Outros fármacos, dirigidos à produção de colagénio e redução dos lípidos, foram experimentados, como o cenicriviroc (613), sendo aguardados resultados de outros ensaios (*in ClinicalTrials.gov*: NCT02217475 e NCT03059446, acedida em 29/11/2021). O aramchol é um ácido biliar conjugado, modulador da atividade da enzima SCD1 (*hepatic stearoyl-CoA desaturase*), que catalisa a formação de ácidos gordos monossaturados, sendo a sua atividade seletiva a nível hepático. Tem efeito a nível da

redução da esteatose, mas também da fibrose, atuando a nível das células produtoras de colagénio. Num primeiro ensaio de fase 2-b (“ARREST”) (614) não foi conseguido o objetivo de diminuição do teor de gordura hepática, mas há ainda outros ensaios a decorrer (ensaio de fase 3, “ARMOR”, *in ClinicalTrials.gov*: NCT04104321, acedida em 29/11/2021).

A belapectina é um inibidor da galectina 3 implicada na fisiopatologia da EH e da fibrose hepática. Num primeiro ensaio (615) não mostrou redução significativa do gradiente de pressão venosa portal nem da fibrose em cirróticos, tendo conseguido esse efeito apenas num subgrupo com hipertensão portal, mas sem varizes esofágicas. Assim, está atualmente a decorrer um ensaio de fase 2-b/3 em doentes com cirrose por EHNA, com hipertensão portal e sem varizes esofágicas, para avaliar a sua eficácia e segurança na prevenção das mesmas, aguardando-se os resultados (*in ClinicalTrials.gov*: NCT04365868, acedida em 29/11/2021).

Seja qual for a solução farmacológica encontrada, procurando intervir nos vários aspetos fisiopatológicos envolvidos, além da eficácia e da evicção dos efeitos secundários, existirá a incerteza acerca da duração do tratamento. A persistência de fatores de risco aconselhará muito provavelmente o tratamento prolongado e, seguramente, mantendo sempre o equilíbrio metabólico, com medidas de correção alimentar e consumo energético mediante exercício físico regular.



## **Capítulo 2**

### **OBJETIVOS, MATERIAL E MÉTODOS**

## **1. Objetivos**

O objetivo principal do estudo foi estimar a prevalência do fígado gordo na população adulta portuguesa. Os objetivos secundários, foram determinar os potenciais fatores de risco associados: ingestão de álcool, síndrome metabólica, níveis de atividade física, hábitos alimentares, medicação, alterações analíticas (dislipidemia, hiperglicémia, ou alterações das provas de função hepática), relação com o sexo e a idade e possível diferença da prevalência nas diferentes regiões do país.

## **2. Desenho do estudo**

Foi desenhado um estudo transversal, voluntário, de base populacional, multicêntrico e randomizado, na população adulta portuguesa residente no continente, com idades entre os 18 anos e os 80 anos, não ajustado para a idade nem para o sexo, inscrita no Registo Nacional de Utentes (RNU), que é a base de dados de referência dos Utentes do Serviço Nacional de Saúde.

Para o estudo de prevalência do fígado gordo, assumindo um valor previsível de 25%, segundo os dados publicados na literatura, com um erro de 3% e um significado estatístico de 5%, foi calculada uma dimensão da amostra de 800 participantes, que, com base no CENSOS 2011, se pode considerar representativa da população adulta portuguesa.

### **2.1 Seleção dos participantes**

Um estudo com esta dimensão realizado à escala nacional, envolve um grande trabalho de campo e implica uma logística considerável. A determinação dos valores laboratoriais teria que ser realizada num único laboratório com certificação de qualidade e necessitava duma drenagem rápida e eficaz das amostras sanguíneas colhidas, em condições de conservação adequadas, para garantir resultados fidedignos. Por isto, a amostra populacional foi partilhada com a do estudo e\_Cor, concebido para determinar a “Prevalência de Fatores de Risco Cardiovascular na População Portuguesa”, levado a cabo pelo INSA (Instituto Nacional de Saúde, Dr. Ricardo Jorge), de Lisboa, com um desenho similar e um horizonte temporal coincidente. Foi estabelecido um protocolo de colaboração para partilha da amostra e dos dados recolhidos em ambos os estudos, mantendo cada uma das equipas a responsabilidade científica e a coordenação dos respetivos projetos.

### 2.1.1. Estudo e\_Cor

Para o estudo e\_Cor, foi calculada uma dimensão amostral mínima de 1040 indivíduos, para obtenção de representatividade nacional, com base no Censos 2011 (dados populacionais do Instituto Nacional de Estatística, INE) calculada para uma prevalência esperada da hipertensão arterial de 42% (Estudo PAP) (616), com um Intervalo de Confiança (IC) de 95% e um erro amostral de 3%. Porque para além da representatividade nacional, se pretendia analisar informação regional, procurando uma maior robustez estatística e salvaguardando a significância das análises pretendidas, optou-se por uma distribuição homogénea da amostra, por região e classes etárias (18 aos 34 anos, 35 aos 64 anos e 65 aos 79 anos), definindo-se com base no conhecimento das prevalências de hipertensão por sexo e classe etária, um número mínimo de participantes por região de cerca de 337 (112 a 113 por classe etária). Os dados recolhidos foram posteriormente ponderados por género, idade e região geográfica com base no Censos 2011, de modo a constituírem uma amostra representativa da população portuguesa continental para os estratos considerados. Assim, foi definida uma amostra de 1685 indivíduos, distribuídos equitativamente pelas 5 regiões continentais, segundo a “Nomenclatura das Unidades Territoriais para Fins Estatísticos II” (NUTS II), obtida a partir das regiões de Lisboa, Centro, Norte, Alentejo e Algarve.

Em cada região, foi feita uma seleção aleatória simples de dois Agrupamentos de Centros de Saúde (ACES) por região de Saúde e de dois Centros de Saúde (CS) por cada ACES, com base na listagem cedida pela Administração Central do Sistema de Saúde (ACSS). Em cada CS foi depois feita uma seleção aleatória simples dos participantes inscritos, ponderada pela dimensão proporcional de inscritos em cada um, pertencentes a dado ACES e divididos equitativamente pelas três classes etárias definidas, com base na população da área de influência de cada ACES e nas listagens de utentes por CS (informação cedida pela ACSS).

A cada indivíduo selecionado, foi enviada uma carta convite por correio, com informação sobre o estudo e convidando à participação no mesmo. Posteriormente (num intervalo de 1 a 2 semanas) foi realizado um contacto telefónico para esclarecer eventuais dúvidas e verificar os critérios de inclusão e exclusão pré-definidos. Aos que aceitaram participar, foi agendada a recolha de dados para o respetivo Centro de Saúde, no INSA ou num posto de colheita instalado num laboratório previamente selecionado, na proximidade do CS da

sua zona. Aqueles que não foi possível contactar, após 3 tentativas em horas e dias diferentes, foram substituídos pelo seguinte na lista.

### **2.1.2. Estudo da prevalência da EH**

A todos os participantes no estudo e\_Cor, aquando da sua avaliação, foi proposta a participação no estudo de prevalência do fígado gordo, a ser realizado posteriormente, num espaço temporal inferior a 6 meses.

O estudo da prevalência do fígado gordo, foi centralizado em 5 hospitais, um em cada uma das 5 regiões estudadas: Hospital de Santa Maria (Centro Hospitalar de Lisboa Norte, EPE), Hospitais da Universidade de Coimbra, (Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, EPE), Hospital de Santos Silva (Centro Hospitalar Vila Nova de Gaia/Espinho, EPE), Hospital de Faro (Centro Hospitalar do Algarve, EPE) e Hospital do Espírito Santo, EPE – Évora.

Os participantes que acederam em participar no estudo de prevalência de fígado gordo, foram convocados para os hospitais das respetivas zonas, onde se avaliou e quantificou a ingestão alcoólica, a ingestão nutricional no ano anterior e a presença de EH e sua quantificação, por ecografia. Foi ainda realizada uma avaliação por elastografia hepática transitória (ET), apenas nas regiões de Lisboa e Vale do Tejo e do Centro, por indisponibilidade de equipamento, nas outras. Foi usada uma sonda “M” e para fins de análise, foi considerada fibrose significativa para valores superiores 8 Kpa (617).

Ambos os estudos foram aprovados pela Comissão Nacional de Proteção de Dados e pelas comissões de Ética, do INSA e da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, tiveram um carácter voluntário e em ambos foi assegurado sigilo quanto aos resultados. Todos os participantes foram devidamente esclarecidos quanto aos objetivos e procedimentos, tendo-lhes sido dada oportunidade para colocar as questões que considerassem relevantes, antes de iniciar a sua participação. Após isso, todos assinaram os consentimentos informados, de ambos os estudos.

Após o conhecimento dos resultados, do estudo analítico e da ecografia abdominal, aos participantes em que foram detetadas alterações, foi oferecida a possibilidade de acompanhamento posterior na consulta hospitalar.

### **3. Critérios de inclusão**

Adultos, com mais de 18 anos de idade, pertencentes ao Registo Nacional de Utentes (RNU) e aos ficheiros dos Centros de Saúde selecionados.

### **4. Critérios de exclusão**

Indivíduos que se recusaram a participar, mulheres que tivessem estado grávidas há menos de 9 meses, puérperas até há menos de 3 meses, utentes que não falassem português, com doença mental, que residissem fora da região do estudo, ou com quem o contacto tivesse sido impossível, após 3 tentativas telefónicas, em horas e dias diferentes.

### **5. Procedimentos**

Os indivíduos que acederam em participar no estudo e \_Cor, compareceram em dia e hora marcados e após assinatura do consentimento informado, foram avaliados por uma equipe coordenada por uma investigadora do INSA e constituída por um enfermeiro, um psicólogo e um técnico de laboratório. De início, foi-lhes aplicado um questionário desenvolvido pela equipa do estudo, estruturado em 10 secções principais e constituído por questões de resposta aberta e fechada, que incluía os indicadores relativos ao estudo: dados biográficos (sexo, idade, estado civil, raça, habilitações literárias e atividade profissional, composição do agregado familiar), anamnese incidindo nas patologias prévias diagnosticadas, medicação em curso, história de hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, diabetes, hipertensão arterial, doenças crónicas, hábitos tabágicos e alimentares e saúde feminina. Para efeitos de análise, foi considerada medicação com possível contribuição para EH, a toma crónica de corticoides, amiodarona, diltiazem, tamoxifeno, ou terapêutica antirretroviral.

A relação Apolipoproteína B/Apolipoproteína A1 (ApoB/ApoA1), foi considerada de acordo com os valores apontados por alguns autores, como fator de risco intermédio (homens: 0,7-0,89 e mulheres: 0,6-0,79) ou alto (homens: 0,9-1,1 e mulheres: 0,8-1,0), para doença coronária (618, 619).

Foi também avaliada a prática regular de exercício físico, durante uma “semana tipo”, tendo sido usado o “*International Physical Activity Questionnaire: 12-Country Reliability and Validity*” (IPAQ) (620), validado para estudos epidemiológicos, nacionais

e regionais e em cujo estudo de validação foram incluídas populações de diversos países, inclusive de Portugal. Os participantes foram distribuídos por 3 categorias, segundo os níveis de atividade física, ausente, moderada ou intensa, de acordo com o proposto no IPAQ.

De seguida procedeu-se a um exame físico compreendendo os parâmetros antropométricos:

- Pressão arterial, sistólica e diastólica, medida na posição sentada após um período de repouso mínimo de 10 minutos, usando um esfigmomanómetro digital (M6 Comfort, OMRON®). O valor utilizado na análise de dados foi a média aritmética de 3 avaliações: uma no braço esquerdo e duas no direito.

- Peso e altura, usando uma balança digital e um estadiómetro (SECA) com o participante apenas com roupa leve e descalço. O índice de massa corporal foi calculado com base no quociente, peso/altura, ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ), retirando 0,5 kg ao peso do participante.

- Perímetro da cintura: medido no ponto médio entre o rebordo inferior da costela e a crista ilíaca, com fita métrica flexível SECA e com o participante em pé.

De seguida foi feita a colheita de sangue, obtida após um jejum de cerca de 12 horas, aproximadamente 15 ml de sangue, para determinação de vários parâmetros: hemograma, glicémia, insulinémia, perfil lipídico (colesterol total, triglicerídeos, lipoproteínas de alta e baixa densidade), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama-glutamil transpeptidase (GGT), creatininémia, serologia de hepatite B (Ag HBs, Anti- HBc e Anti-HBs) e de hepatite C (Ac anti-VHC) e vitamina D sérica, medida por *Electro-chemiluminescence binding assay*-ECLIA. Após a colheita, o sangue era mantido em repouso cerca de 30 minutos a 3 horas. A amostra do tubo de bioquímica era centrifugada a 3000 rpm durante 15 min. Após estes procedimentos o sangue era guardado numa arca frigorífica com temperatura controlada entre 2° e 8°C e transportado para o INSA, onde as amostras eram processadas num período máximo de 24 horas. Todas as análises foram realizadas num único laboratório, a Unidade de diagnóstico laboratorial e de referência.

Os parâmetros bioquímicos para avaliação da dislipidemia, função renal, função hepática e metabolismo da glucose foram determinados no equipamento Cobas Integra 400 Plus (Roche®), por métodos enzimáticos colorimétricos, imunoturbidimétricos e com recurso à hexoquinase. A medição da hemoglobina glicosilada (HbA1c) foi determinada no equipamento Menarini 8160, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, *High*

*Performance Liquid Chromatograph*), o peptídeo C e a insulinémia, pela técnica de eletroquimioluminescência (ECLIA) no equipamento Cobas E411 (Roche ®).

No final da sua participação foi oferecido a cada participante um cartão identificativo com as medições obtidas no exame físico.

Posteriormente, foram calculados, o valor do HOMA (*Homeostasis Model Assessment*), (glicémia (mmol/l x insulinémia  $\mu\text{U/l}$  / 22,5) e a presença da SM, segundo os critérios da *American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement* (AHA/NHLBI) (488), já descritos atrás (Tabela I).

A recolha de dados iniciou-se em Março de 2012 e terminou em Janeiro de 2015, demorando em média, 3 meses por região.

Como já referido antes, durante a observação foi solicitada aos participantes autorização para contacto posterior, com vista à participação no estudo de prevalência do fígado gordo, realizado nos 6 meses seguintes.

Aos que aceitaram participar, foi administrado um inquérito para deteção de diferentes padrões de consumo de álcool e o consumo alcoólico, em gramas/dia, foi apurado segundo o teor usual das diversas bebidas consumidas. Foi ainda aplicado o AUDIT (*Alcohol Use Disorders Identification Test*), desenvolvido pela Organização Mundial de Saúde validado para a deteção do consumo exagerado de álcool e possível dependência (621) e recomendado para a deteção precoce e intervenção no consumo excessivo em adultos, pela Direção Geral de Saúde (DGS), (norma 30/2012, de 28/12/2012).

De seguida, um nutricionista efetuou um questionário de frequência alimentar (QFA), aprovado para a população portuguesa (622, 623). Os QFA, foram depois submetidos a leitura ótica e convertidos em quantidades de macro e micronutrientes.

Foi realizada depois uma ecografia abdominal, para diagnóstico e quantificação da EH, segundo a classificação proposta por Hamaguchi (439). Assumiu-se o diagnóstico de esteatose, para pontuações superiores a 2 pontos (Tabela II). As ecografias foram realizadas por imagiologistas com experiência na área, sempre sem conhecimento prévio do resultado de exames anteriores, de testes analíticos ou outros.

**Tabela II. Classificação ecográfica da EH (segundo Hamaguchi) (439)**

<b>A: Brilho hepático e eco contraste rim-fígado</b>	<b>Pontuação</b>
Sem brilho hepático e sem eco contraste rim-fígado	0
Presença de brilho hepático ou de eco contraste rim-fígado	1
Brilho hepático ligeiro e eco contraste rim-fígado positivo	2
Brilho hepático intenso e eco contraste rim-fígado positivo	3
<b>B: Atenuação profunda</b>	
Sem atenuação profunda	0
Visualização do diafragma, mas com aspeto escurecido	1
Não se visualiza o diafragma	2
<b>C: Má definição dos vasos sanguíneos</b>	
Ausente	0
Presente	1
<b>Pontuação total: A + B + C, se A &gt; 1</b>	
<b>Pontuação 0, se A=0</b>	
<b>Esteatose se total ≥ 2 pontos</b>	

## 6. Análise estatística

Os dados foram descritos em tabelas de frequência e respectivas percentagens (variáveis categóricas), médias e desvio. Distribuição das frequências das variáveis, intervalos de confiança das médias, proporções e taxas, cálculos dos *odds ratio* individuais, regressão logística para cálculo dos fatores predizentes.

Para determinar as causas mais frequentes da EH foram efetuadas, análise univariada para as variáveis qualitativas e quantitativas e depois, uma análise multivariada.

Na análise univariada para as variáveis qualitativas, foi determinada a associação com a presença de esteatose, através do teste qui-quadrado de independência, com determinação da prevalência observada na amostra e prevalência esperada observada na população, com 95% de confiança, para cada um dos grupos; determinação do *odds ratio* observado na amostra e do *odds ratio* esperado na população, com 95% de confiança.

Para as variáveis quantitativas, foi efetuada a análise ROC (*Receiver Operating Characteristic*) com determinação da AUC (*Area Under the ROC Curve*) e respetiva significância estatística, sempre que foi detetada diferença estatisticamente significativa entre os grupos com e sem EH avaliada pelo teste t-Student para amostras independentes.

Foi depois efetuada uma análise multivariada, para os fatores e covariáveis identificados na análise anterior como associados à presença de EH foram inseridos numa análise de regressão logística para identificação dos preditores independentes de risco de EH. Foi avaliado a qualidade do ajustamento do modelo através do teste de Hosmer-Lemeshow e do  $R^2$  de Nagelkerke.

Algumas variáveis quantitativas foram objeto de análise em separado por apresentarem diferentes pontos de corte para os sexos, masculino e feminino, e na análise quantitativa na amostra global (FG), tal não seria refletido. Essas variáveis, foram o álcool, o peso, a altura, a cintura, a ApoB, a ApoA1 e a relação ApoB/ApoA1, para a qual foram consideradas três classes de risco, conforme descritas, para doença coronária (618, 619, 624).

A análise estatística foi feita recorrendo à aplicação SPSS, versão 23, e os testes estatísticos foram analisados ao nível de significância de 5%.



## **Capítulo 3**

### **RESULTADOS**

## 1. Dados demográficos

Dos 1688 indivíduos (848 homens e 840 mulheres) que aceitaram participar no e\_Cor, 834 aceitaram participar no estudo de prevalência do fígado gordo, 215 na região de Lisboa, 219 na região Centro, 143 na região Norte, 119 na região do Algarve e 138 na região do Alentejo. Destes, 440 (52,8%) eram do sexo masculino e a idade média dos participantes na amostra foi de  $49,8 \pm 17,16$  anos.

Foi comparada na altura da avaliação (Apêndice 1) a amostra global do e\_Cor e o subgrupo que aceitou participar no estudo de prevalência da EH, não se identificando diferenças estatisticamente significativas em relação às variáveis sociodemográficas, dados do exame físico, presença de alterações laboratoriais potencialmente indutoras de EH, hábitos de ingestão alcoólica e prática de exercício físico. Assim, considerou-se a amostra selecionada para o nosso estudo, representativa da população portuguesa adulta.

Nas Tabelas III a V são descritas a distribuição dos participantes do estudo de prevalência de fígado gordo, em relação à idade e sexo, nas diferentes regiões do país.

**Tabela III. Idade dos participantes segundo as regiões (anos)**

Região	Máxima	Mínima	Média	Desvio padrão
Alentejo	79,00	19,00	51,80	16,98
Algarve	78,00	19,00	49,23	17,05
Centro	78,00	19,00	47,12	16,61
LVT	79,00	18,00	50,51	17,45
Norte	77,00	19,00	51,41	16,68

**Tabela IV. Distribuição por grupos etários**

Anos	Número	Percentagem (%)	Percentagem Válida (%)	Percentagem Cumulativa (%)
18 - 34	226	27,1	27,1	27,1
35 - 65	355	42,6	42,6	69,7
≥ 65	253	30,3	30,3	100
Total	834	100,0	100,0	

**Tabela V. Distribuição dos sexos nas 5 regiões e total nacional**

Região	Sexo	
	Feminino n (%)	Masculino n (%)
Alentejo	72 (52,2%)	66 (47,8%)
Algarve	62 (52,1%)	57 (47,9%)
Centro	109 (49,8%)	110 (50,2%)
LVT	91 (42,3%)	124 (57,7%)
Norte	60 (42,0%)	83 (58,0%)
Total (n=834)	394 (47,2%)	440 (52,8%)

## 2. Prevalência da EH na população adulta portuguesa

A ecografia revelou a presença de EH em 302 dos 834 participantes, o que corresponde a uma prevalência de 36,21%. Com base nesta amostra é de esperar, com 95% de confiança (IC95%), que a prevalência de EH na população portuguesa esteja entre os 32,95% e os 39,47%. A prevalência ajustada à idade, região e sexo, segundo o Censos 2011, foi de 37,86%. No total dos 834 participantes, 138 (16,5%), tinham critérios para FGNA, o que corresponderá a 17,0% (IC95%: 14,5% - 19,5%) após ajustamento para a idade, sexo e região, segundo o Censos.

Analisando a prevalência regional, verificou-se que está associada à Região ( $p=0,002$ ), esperando-se que seja superior nas regiões Norte, de Lisboa e Vale do Tejo e do Algarve, e inferior no Alentejo e na região Centro, conforme descrito na tabela VI.

**Tabela VI. Prevalência da EH nas 5 regiões**

Região	n	Prevalência	IC (95%) Prevalência	OR	IC (95%) OR
Alentejo	31	22,46%	15,5% - 29,43%	0,45	0,09 - 0,82
Algarve	46	38,66%	29,91% - 47,4%	1,13	1,07 - 1,19
Centro	77	35,16%	28,84% - 41,48%	0,94	0,91 - 0,97
Lisboa e Vale do Tejo	83	38,6%	32,1% - 45,11%	1,15	1,08 - 1,21
Norte	65	45,45%	37,29% - 53,62%	1,60	1,38 - 1,82

Quando analisada a prevalência de EH em relação à faixa etária, os resultados apontam para uma associação estatisticamente significativa com a idade ( $p<0,001$ ), com um

aumento muito marcado na faixa etária intermédia, a partir dos 35 anos e com um aumento menos pronunciado depois, conforme se mostra na tabela VII.

Analisada a prevalência de esteatose em função do sexo, foi estatisticamente mais elevada nos homens do que nas mulheres ( $p < 0,001$ ) (tabela VIII).

**Tabela VII. Prevalência da EH nos vários grupos etários**

Grupos etários	n	Prevalência	IC (95%) Prevalência	OR	IC (95%) OR
18 - 34 Anos	38	16,81%	11,94% - 21,69%	0,26	-0,1 - 0,62
35 - 64 Anos	145	40,85%	35,73% - 45,96%	1,42	1,32 - 1,51
≥ 65 Anos	119	47,04%	40,89% - 53,19%	1,93	1,75 - 2,11

**Tabela VIII. Prevalência da EH por sexos**

Sexo	n	Prevalência	IC (95%) Prevalência	OR	IC (95%) OR
Feminino	101	25,63%	21,32% - 29,95%	0,41	0,12 - 0,7
Masculino	201	45,68%	41,03% - 50,34%	2,43	2,14 - 2,72

### 2.1. Fatores de risco: análise univariada

Nas tabelas IX, X, XI e XII são mostradas as relações entre a presença de EH na amostra e as diferentes variáveis, qualitativas e quantitativas.

Da análise dos fatores de risco para EH, destacam-se vários resultados. Em primeiro lugar, a associação com a idade, verificando-se um aumento acentuado da esteatose a partir dos 35 anos, mais do que duplicando em relação ao grupo etário mais baixo e que após os 64 anos, atinge quase metade dos participantes. Consideradas as idades médias (Tabela X), os participantes com EH são cerca de 10 anos mais velhos ( $p < 0,001$ ). Em relação ao sexo, a prevalência de esteatose nos homens foi quase duas vezes maior do que nas mulheres, pelo que o sexo masculino constituiu um fator de risco (OR: 2,44-IC95: 2,151-2,729,  $p < 0,001$ ). Em relação aos dados do exame físico, a esteatose surge associada às características habitualmente englobadas na chamada SM. É o caso do perímetro da cintura acima dos 102 cm nos homens e dos 88 cm nas mulheres (OR:3,186, IC95%:2,897-3,475,  $p < 0,001$ ), tendo

os participantes com EH uma medida de cintura, em média, significativamente superior relativamente aos sem EH ( $p < 0,001$  para homens e mulheres).

No total da amostra, 23% dos participantes tinham obesidade e 42,9% excesso de peso. Consequentemente, o IMC elevado foi identificado como fator de risco para EH ( $p < 0,001$ ), com um OR de 1,252 (IC95%: 1,216-1,288) para IMC de 25 a 30 Kg/m<sup>2</sup> e de 5,40 (IC95%: 5,142-5,678) para IMC acima dos 30 Kg/m<sup>2</sup>. A média do IMC nos participantes com EH foi também superior aos que não tiveram EH, com significado ( $p < 0,001$ ). O peso médio dos indivíduos com EH foi maior do que o dos indivíduos sem EH, quer nos homens ( $p < 0,001$ ), quer nas mulheres ( $p < 0,001$ ). A presença de HTA também teve uma associação significativa com a EH, para valores acima dos 130 mm Hg para a TA sistólica e dos 80 mm Hg para a diastólica ( $p < 0,001$ ).

A atividade física não se associou significativamente à esteatose ( $p = 0,639$ ). Os hábitos tabágicos mostraram pouca relação com a presença de esteatose, apenas com OR de 1,198 nos não fumadores e de 1,277 nos fumadores habituais. A análise revelou que a toma crónica de medicamentos descritos como podendo originar EH teve um significado estatístico ( $p = 0,031$ ), com um OR de 2,025 (IC95%: 1,384-2,666). O consumo alcoólico, na análise da amostra global, revelou-se um fator de risco com grande impacto. De fato, consumos acima dos 20g/dia na mulher e dos 30 g/d, nos homens ( $p < 0,001$ ) traduziram-se num OR de 2,389 (IC% 95: 2,098-2,68). No entanto, quando se procedeu à análise das médias dos consumos alcoólicos separadamente para os dois sexos, apenas nos homens foi possível encontrar diferença com significado estatístico entre os participantes com e sem EH ( $p < 0,001$ ), sendo os consumos nas mulheres mais próximos entre os dois grupos ( $p = 0,101$ ).

A análise das alterações laboratoriais identificou vários fatores de risco. A glicemia superior a 100 mg/dl, com um OR de 4,089 (IC95%: 3,769-4,409),  $p < 0,001$  e o valor do teste de HOMA acima de 2,5, com um OR de 5,826 (IC95%: 5,52-6,132),  $p < 0,001$ , evidenciam uma associação marcada da EH, com alteração do metabolismo glucídico. A insulinemia em jejum foi também significativamente superior nos indivíduos com EH ( $p < 0,001$ ), refletindo a importância da resistência à insulina na génese da EH. Relativamente à dislipidemia, a hipertrigliceridemia ( $> 150$  mg/dl) com um OR de 4,592 (IC95%: 4,230-4,954), o colesterol HDL baixo ( $< 50$  mg/dl nas mulheres e 40 mg/dl nos homens), com um OR de 2,597 (IC95%: 2,261-2,933), mostraram ser fatores de risco ( $p < 0,001$ ). Estas associações foram comprovadas na análise dos valores médios de

colesterolemia e de LDL, que nos participantes com EH foram significativamente superiores aos que não apresentaram EH e pela análise dos valores médios de HDL, significativamente inferiores nos indivíduos com EH. A relação ApoB/ApoA1, fator de risco intermédio (0,7-0,89 nos homens e 0,6-0,79 nas mulheres) ou alto (0,9-1,1 nos homens e 0,8-1,0 nas mulheres) para doença coronária, revelou também associação significativa com a presença de esteatose, com ORs de 1,107 (IC95%: 1,067-1,147) e de 1,877 (IC95%: 1,632-2,122), respetivamente. Na análise dos valores médios da ApoA1 e da ApoB nas mulheres, as participantes com EH tiveram, em média, valores significativamente superiores às que não tinham EH ( $p=0,002$  e  $0,001$  respetivamente). No sexo masculino apenas houve significado estatístico no caso da ApoB, maior nos homens com EH ( $p= 0,002$ ).

Como seria de esperar perante estes resultados, a presença da SM revelou uma associação também muito significativa com a EH, tendo a sua presença um OR de 5,934 (IC95%: 5,581-6,287), ( $p<0,001$ ).

A EH correlacionou-se também de forma significativa com a alteração da enzimologia hepática. Os valores médios das aminotransferases e da GGT foram significativamente mais elevados nos participantes com EH: a ALT ( $p<0,001$ ), AST ( $p<0,003$ ), GGT ( $p<0,001$ ).

Em termos nutricionais, embora os participantes com EH tivessem uma ingestão calórica maior, não houve significado estatístico, quando comparada com o grupo sem EH. A ingestão dos diversos macro e micronutrientes, não foi significativamente diferente nos participantes, com ou sem EH (tabela X).

Na tabela X são mostradas as relações entre a presença de EH nos participantes e todas as diferentes variáveis quantitativas, excetuando as que apresentaram diferentes pontos de corte para os sexos masculino e feminino.

**Tabela IX. Associação entre a presença de EH e as variáveis qualitativas**

Grupos etários	n	Prevalência	IC 95	p	OR	IC 95
18-34 anos	226	16,81%	11,94% - 21,69%	<0,001	0,263	0,000 - 0,623
35-64 anos	355	40,85%	35,73% - 45,96%		1,416	1,322 - 1,510
≥ 65 anos	253	47,04%	40,89% - 53,19%		1,931	1,754 - 2,108
Sexo	n	Prevalência	IC 95	p	OR	IC 95
Feminino	394	25,63%	21,32% - 29,95%	<0,001	0,410	0,119 - 0,701
Masculino	440	45,68%	41,03% - 50,34%		2,440	2,151 - 2,729
P. cintura (cm)	n	Prevalência	IC 95	p	OR	IC 95
H <102, M <88	483	25,05%	21,19% - 28,92%	<0,001	0,314	0,025 - 0,603
H ≥102, M ≥88	349	51,58%	46,33% - 56,82%		3,186	2,897 - 3,475
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	n	Prevalência	IC 95	p	OR	IC 95
< 25	283	11,66%	7,92% - 15,4%	<0,001	0,139	0,000 - 0,452
25-30	358	39,11%	34,05% - 44,16%		1,252	1,216 - 1,288
> 30	192	66,67%	60% - 73,33%		5,410	5,142 - 5,678
PAS elevada	n	Prevalência	IC 95	p	OR	IC 95
< 130 mm Hg	466	25,97%	21,98% - 29,95%	<0,001	0,362	0,075 - 0,649
≥ 130 mm Hg	368	49,18%	44,08% - 54,29%		2,760	2,473 - 3,047
PAD elevada	n	Prevalência	IC 95	p	OR	IC 95
< 85 mm Hg	541	29,57%	25,73% - 33,42%	<0,001	0,450	0,158 - 0,742
≥ 85 mm Hg	292	48,29%	42,56% - 54,02%		2,224	1,930 - 2,518
Ativ. física	n	Prevalência	IC 95	p	OR	IC 95
Ligeira	354	35,88%	30,88% - 40,87%	0,639	-	
Moderada	301	34,88%	29,5% - 40,27%		-	
Intensa	179	39,11%	31,96% - 46,26%		-	
Álcool (g/dia)	n	Prevalência	IC 95	p	OR	IC 95
M <20 - H <30	526	28,71%	24,84% - 32,57%	<0,001	0,419	0,130 - 0,708
M >20 - H >30	308	49,03%	43,44% - 54,61%		2,389	2,098 - 2,68
H. <sup>os</sup> tabágicos	n	Prevalência	IC 95	p	OR	IC 95
Nunca fumou	453	32,01%	27,71% - 36,3%	0,001	1,198	1,08 - 1,316
Ex-fumador	197	43,15%	36,23% - 50,06%		0,835	0,717 - 0,953
Fumador ocasional	50	34,00%	20,87% - 47,13%		0,624	0,316 - 0,932
Fumador	134	41,04%	32,72% - 49,37%		1,277	1,117 - 1,437
M esteatog	n	Prevalência	IC 95	p	OR	IC 95
Não	796	35,43%	32,1% - 38,75%	<0,031	0,494	0,000-1,135
Sim	38	52,63%	36,76% - 68,51%		2,025	1,384-2,666

**Tabela IX. Associação entre a presença de EH e as variáveis qualitativas (cont.)**

Glicemia (mg/dl)	n	Prevalência	IC 95	p	OR	IC 95
<100	621	27,70%	18,49% - 26,55%	<0,001	0,245	0,000 - 0,561
>100	213	61,03%	42,11% - 60,54%		4,089	3,769 - 4,409
AST (U/L)	n	Prevalência	IC 95	p	OR	IC 95
M ≤ 29, H ≤ 39	800	35,25%	31,94% - 38,56%	0,003	0,344	0,000 - 1,051
M >30, H > 40	31	61,29%	44,14% - 78,44%		2,908	2,183 - 3,633
ALT (U/L)	n	Prevalência	IC 95	p	OR	IC 95
M ≤ 29, H ≤ 39	752	33,11%	29,75% - 36,48%	<0,001	0,252	0,000 - 0,713
M >30, H > 40	80	66,25%	55,89% - 76,61%		3,965	3,494 - 4,436
TG (mg/dl)	n	Prevalência	IC 95	p	OR	IC 95
< 150	681	29,52%	26,09% - 32,94%	<0,001	0,218	0,000 - 0,573
> 150	152	65,79%	58,25% - 73,33%		4,592	4,230 - 4,954
HDL (mg/dl)	n	Prevalência	IC 95	p	OR	IC 95
M > 50, H > 40	655	31,30%	27,75% - 34,85%	<0,001	0,385	0,054 - 0,716
M < 50, H < 40	179	54,19%	46,89% - 61,49%		2,597	2,261 - 2,933
HOMA-IR	n	Prevalência	IC 95	p	OR	IC 95
< 2,5	505	21,58%	18% - 25,17%	<0,001	0,172	-0,134 - 0,478
> 2,5	289	61,59%	55,98% - 67,2%		5,826	5,52 - 6,132
ApoB/ApoA1	n	Prevalência	IC 95	p	OR	IC 95
Risco baixo	325	26,15%	21,38% - 30,93%	<0,001	0,477	0,189 - 0,765
Risco moderado	160	38,13%	30,6% - 45,65%		1,107	1,067 - 1,147
Risco elevado	349	44,70%	39,48% - 49,92%		1,877	1,632 - 2,122
SM	n	Prevalência	IC 95	p	OR	IC 95
Não	664	27,71%	24,31% - 31,12%	<0,001	0,169	0,000 - 0,516
Sim	167	69,46%	62,48% - 76,45%		5,934	5,581 - 6,287

**Legenda:** n: número, IC95: intervalo de confiança 95%, OR: *Odds ratio*, nível de significância:  $p < 0,05$ , P cintura: perímetro da cintura, IMC: índice de massa corporal, PAS: pressão arterial sistólica, PAD: pressão arterial diastólica, Ativ. Física: Atividade física, H.<sup>os</sup> tabágicos: Hábitos tabágicos, M esteatog: Medicação potencialmente esteatogénica, AST: aspartato aminotransferase, ALT: alanina aminotransferase, TG: Triglicéridos, HDL: colesterol lipoproteínas de alta densidade, HOMA-IR (*Homeostatic Model Assessment*-resistência à insulina): método para aferir a resistência à insulina:  $\text{insulina jejum } (\mu\text{U/mL}) \times \text{glicémia jejum (mmol/L)}/22,5$ . HOMA-IR  $\geq 2,5$  indicativo de insulino resistência. ApoB: apolipoproteína B, ApoA1: apolipoproteína A1, ApoB/ApoA1: fator de risco para doença coronária - intermédio (homens: 0,7-0,89; mulheres: 0,6-0,79), alto (homens: 0,9-1,1; mulheres: 0,8-1,0), SM: síndrome metabólica.

**Tabela X. Relação entre a presença de EH e as variáveis quantitativas. Amostra global (homens e mulheres)**

Variável	EH	n	Média (ep)	IC 95%	p
Idade (anos)	não	532	46,45 (0,75)	-11,48 a -7,05	<0,001
	sim	302	55,71 (0,84)		
C-Total (mg/dl)	não	532	195,06 (1,55)	-12,14 a -1,63	0,010
	sim	302	201,95 (2,28)		
HDL (mg/dl)	não	532	59,22 (0,66)	6,41 a 10,63	<0,001
	sim	302	50,7 (0,84)		
LDL (mg/dl)	não	532	119,85 (1,37)	-12,64 a -2,46	0,004
	sim	302	127,4 (2,2)		
TG (mg/dl)	não	532	91,33 (1,8)	-65,96 a -41,2	<0,001
	sim	302	144,91 (6,03)		
Glicose (mg/dl)	não	532	90,86 (0,86)	-14,91 a -8,33	<0,001
	sim	302	102,48 (1,44)		
Insulinemia $\mu$ UI/ml	não	507	8,94 (0,2)	-5,67 a -3,72	<0,001
	sim	287	13,63 (0,45)		
AST (U/L)	não	530	19,94 (0,38)	-3,57 a -1,08	<0,001
	sim	301	22,26 (0,51)		
ALT (U/L)	não	530	18,48 (0,4)	-9,33 a -5,52	<0,001
	sim	302	25,91 (0,88)		
GGT (U/L)	não	532	20,92 (1,09)	-22,86 a -12,11	<0,001
	sim	302	38,4 (2,51)		
Albuminemia (g/dl)	não	532	39,99 (0,17)	-0,61 a 0,38	0,649
	sim	302	40,11 (0,18)		
Creatininemia (mg/dl)	não	532	0,77 (0,01)	-0,05 a 0,01	0,188
	sim	302	0,79 (0,01)		
IMC	não	532	25,62 (0,17)	-4,91 a -3,63	<0,001
	sim	302	29,89 (0,27)		
PAS	não	532	123,63 (0,9)	-14,75 a -8,95	<0,001
	sim	302	135,48 (1,15)		
PAD	não	532	78,18 (0,46)	-7,6 a -4,56	<0,001
	sim	302	84,26 (0,62)		
Calorias (kcal)	não	520	2589,09(37,96	-273,59 a -12,17	0,032
	sim	296	2731,97		
Proteínas (g)	não	520	112,22 (1,71)	-9,6 a 1,79	0,179
	sim	296	116,13 (2,41)		
Hid. <sup>os</sup> de carbono (g)	não	520	302,84 (4,84)	-10,77 a 21,68	0,509
	sim	296	297,38 (6,9)		
Gordura total (g)	não	520	100,76 (1,78)	-10,6 a 2,26	0,203
	sim	296	104,93 (2,75)		
GS (g)	não	520	28,24 (0,5)	-2,57 a 1,13	0,446
	sim	296	28,96 (0,8)		
GMI (g)	não	520	48,34 (0,98)	-5,7 a 1,2	0,201
	sim	296	50,59 (1,46)		
GPI (g)	não	520	16,11 (0,32)	-2,08 a 0,31	0,147
	sim	296	16,99 (0,52)		

**Tabela X. Relação entre a presença de EH com as variáveis quantitativas. Amostra global (homens e mulheres) (cont.)**

AG Trans	não	520	1,16(0,03)	-0,1 a 0,08	0,789
	sim	296	1,17(0,04)		
Cafeína (mg)	não	520	75,11 (2,54)	-15,62 a 1,47	0,105
	sim	296	82,18 (3,66)		
Vitamina C (mg)	não	520	182,23 (5,25)	-0,41 a 26,91	0,057
	sim	296	168,98 (4,57)		
Vitamina D (ng)	não	520	4,83 (0,11)	-0,49 a 0,26	0,560
	sim	296	4,94 (0,15)		
Vitamina E (mg)	não	520	12,73 (0,24)	-1,37 a 0,29	0,201
	sim	296	13,27 (0,37)		
Fibra Alimentar (g)	não	520	29,8 (0,56)	-1,43 a 2,16	0,692
	sim	296	29,44 (0,71)		
Fibra insolúvel (g)	não	520	18,41 (0,38)	-1,1 a 1,37	0,835
	sim	296	18,28 (0,49)		
Fibra solúvel (g)	não	520	7,72 (0,17)	-0,48 a 0,6	0,821
	sim	296	7,66 (0,21)		
AG Omega3 (g)	não	520	1,69 (0,03)	-0,18 a 0,02	0,100
	sim	296	1,77 (0,04)		
AG Omega 6 (g)	não	520	12,51 (0,27)	-1,7 a 0,37	0,209
	sim	296	13,17 (0,45)		
Frutose (g)	não	521	34,17 (0,93)	0,49 a 6,16	0,021
	sim	297	30,84 (0,99)		

**Legenda:** *ep*=erro padrão, IC95%: intervalo de confiança 95%, C-Total: colesterol total, HDL: colesterol lipoproteínas de alta densidade, LDL: colesterol lipoproteínas de baixa densidade, TG: Triglicerídeos, PAS: pressão arterial sistólica, AST: aspartato aminotransferase, ALT: alanina aminotransferase, GGT: Gama-glutamil transpeptidase, IMC: índice de massa corporal (kg/m<sup>2</sup>), PAS: pressão arterial sistólica, PAD: pressão arterial diastólica, GS: Gorduras saturadas, GI: Gorduras insaturadas, GPI: Gorduras polinsaturadas, AG Trans: ácidos gordos transaturados, AG Omega 3: Ácidos gordos Omega 3, AG Omega 6: Ácidos gordos Omega 6.

Nas tabelas XI e XII são mostradas as variáveis quantitativas que, por apresentarem diferentes pontos de corte para os sexos masculino e feminino, foram analisadas separadamente.

**Tabela XI. Amostra do sexo feminino**

Variável	EH	n	Média (ep)	IC 95%	p
Álcool (g/dia)	não	293	9,51(1,14)	-10,23 a 0,91	0,101
	sim	101	14,16(2,58)		
ApoB	não	293	109,92(2,38)	-25,08 a -6,75	0,001
	sim	101	125,84(3,94)		
ApoA1	não	293	144,24(2,59)	5,86 a 25,58	0,002
	sim	101	128,52(4,08)		
ApoB/ApoA1	não	293	0,95(0,04)	-0,41 a -0,08	0,005
	sim	101	1,19(0,08)		
Peso (kg)	não	293	64,4(0,64)	-16 a -9,02	<0,001
	sim	101	76,91(1,65)		
Altura (m)	não	293	1,59(0)	-0,01 a 0,03	0,211
	sim	101	1,58(0,01)		
P Cintura (cm)	não	293	86,79(0,72)	-16,08 a -10,33	<0,001
	sim	101	99,99(1,37)		

**Legenda:** *ep*=erro padrão, ApoB: apolipoproteína B, ApoA1: apolipoproteína A1, ApoB/ApoA1: fator de risco para doença coronária - intermédio (homens: 0,7-0,89; mulheres: 0,6-0,79), alto (homens: 0,9-1,1; mulheres: 0,8-1,0), P Cintura: Perímetro da cintura.

**Tabela XII. Amostra do sexo masculino**

Variável	EH	n	Média (ep)	IC 95%	p
Álcool (g/dia)	não	239	33,86(2,35)	-21,09 a -6,53	<0,001
	sim	201	47,67(2,86)		
ApoB	não	239	111,18(2,31)	-16,21 a -3,82	0,002
	sim	201	121,2(2,15)		
ApoA1	não	239	130,63(2,31)	-5,02 a 8,16	0,639
	sim	201	129,05(2,41)		
ApoB/ApoA1	não	239	0,98(0,04)	-0,18 a 0,02	0,135
	sim	201	1,05(0,04)		
Peso (kg)	não	239	74,54(0,7)	-12,79 a -8,41	<0,001
	sim	201	85,14(0,89)		
Altura (m)	não	239	1,71(0,01)	-0,01 a 0,02	0,409
	sim	201	1,7(0)		
Cintura (cm)	não	238	91,63(0,62)	-12,66 a -9,01	<0,001
	sim	200	102,47(0,69)		

**Legenda:** *ep*=erro padrão, ApoB: apolipoproteína B, ApoA1: apolipoproteína A1, ApoB/ApoA1: fator de risco para doença coronária - intermédio (homens: 0,7-0,89; mulheres: 0,6-0,79), alto (homens: 0,9-1,1; mulheres: 0,8-1,0), P Cintura: Perímetro da cintura.

## 2.2. Fatores de risco: análise multivariada (regressão logística)

Foram incluídas na regressão logística todas as variáveis que mostraram associação ou diferença estatisticamente significativa nos valores médios pelos métodos anteriormente utilizados (tabela XIII).

O modelo de regressão logística é válido e os dados ajustam-se bem ao mesmo (teste de Hosmer-Lemeshow:  $p = 0,480$ ), explicando as variáveis descritas na tabela seguinte 45,4% da presença de EH ( $R^2$  de Nagelkerke = 0,454). As variáveis não incluídas na tabela não deverão ser consideradas como fatores preditores de risco de EH; os valores de *odds ratio* poderão diferir dos anteriormente apresentados (análise bivariada), já que os descritos agora estão ajustados para o efeito conjunto das várias variáveis identificadas.

**Tabela XIII. Fatores de risco de EH – análise multivariáveis (regressão logística)**

	p	OR ajustado	IC 95% para OR	
			Inferior	Superior
Idade 18-34 anos	0,051			
Idade 35-64 anos	0,015	1,938	1,137	3,304
Idade $\geq$ 65 anos	0,069	1,701	0,960	3,016
Álcool abusivo	0,002	1,877	1,271	2,773
ApoB/ApoA1	0,006			
ApoB/ApoA1 (Risco moderado)	0,369	1,282	0,745	2,205
ApoB/ApoA1 (Risco alto)	0,002	2,011	1,295	3,123
Glicose >100 mg/dl	0,006	1,895	1,206	2,976
Presença de IR	<0,001	2,255	1,481	3,434
IMC < 25 (kg/m <sup>2</sup> )	<0,001			
IMC 25-30 (kg/m <sup>2</sup> )	<0,001	3,591	2,161	5,968
IMC (>30 (kg/m <sup>2</sup> )	<0,001	8,090	4,449	14,711
TG $\geq$ 150 mg/dl	0,001	2,234	1,373	3,636
HDL <40H <50M	0,024	1,728	1,076	2,774
GGT	0,001	1,010	1,004	1,017
Frutose	0,001	0,981	0,970	0,992

**Legenda:** IC95%: intervalo de confiança 95%, ApoB/ApoA1: fator de risco para doença coronária - intermédio (homens: 0,7-0,89; mulheres: 0,6-0,79), alto (homens: 0,9-1,1; mulheres: 0,8-1,0), IMC: índice de massa corporal (kg/m<sup>2</sup>), TG: Triglicerídeos, HDL: colesterol lipoproteínas de alta densidade, GGT: Gama-glutamil transpeptidase.

De entre as variáveis consideradas, mostraram significado estatístico o escalão etário dos 35 aos 64 anos ( $p=0,015$ , OR: 1,938), o excesso de peso ( $p<0,001$ , OR: 3,591) e a obesidade ( $p<0,01$ , OR: 8,09), a ingestão excessiva de álcool ( $p=0,002$ , OR: 1,877), a relação ApoB/ApoA1 de alto risco ( $p=0,02$ , OR: 2,011), a presença de insulino resistência ( $p<0,001$ , OR: 2,255), a hipertrigliceridémia ( $p=0,001$ , OR: 2,234) e os valores de colesterol HDL inferiores aos recomendados ( $p=0,024$ , OR: 1,728). A GGT associou-se à presença de EH ( $p=0,001$ , OR: 1,01). A frutose mostrou um “ $p$ ” de 0,001, mas o OR foi de apenas 0,981 (de 0,970 a 0,992).

### **2.3. Relação da EH com os valores de elastografia hepática transitória**

Apenas foi possível avaliar a ET nos participantes das regiões de Lisboa e Vale do Tejo e da zona Centro, por falta de disponibilidade de equipamento nas outras.

No total foram realizados 366 exames. A média dos valores de elastografia medidos foi de 5,08 kPa (mínimo: 2,30; máximo: 36,80,  $ep= 2,28$  kPa).

De acordo com a literatura (617), considerando uma elasticidade hepática superior a 8 kPa como de probabilidade intermédia de fibrose e superior a 10 kPa como de probabilidade elevada, apenas 9 participantes (8 homens e 1 mulher) tinham valores superiores a 8 kPa, ou seja cerca de 2,4% do total dos participantes no estudo. Todos tinham um score BARD superior a 2 e apenas 6 tinham FLI superior a 60.

A mesma análise feita apenas nos participantes com critérios de FGNA (excluindo ingestão de álcool acima de 20g/d nas mulheres e de 30g/d nos homens) identificou apenas 5 participantes, 1 mulher e 4 homens, todos com score BARD elevado.

Dada a pequena dimensão destes números, repetiu-se a análise usando um *cut off* de 6 kPa, tendo-se encontrado 47 participantes com valor de ET superior (12,8%). Destes, 43 tinham consumos alcoólicos acima dos limites referidos e apenas 4 critérios de FGNA.

Apenas nos participantes da região de Lisboa foi possível analisar a performance do CAP para diagnóstico da EH. Usando os dados da ecografia hepática e o FLI foram estabelecidos os *cut-off* de 243 dB/m como ótimo para diagnóstico de EH ligeira e de 303,5 dB/m como sugestivo de esteatose grave (450).

### **3. Comparação dos participantes com EH não alcoólica e EH alcoólica**

Após ajustamento das prevalências da EH (EH) e do fígado gordo não alcoólico (FGNA) à população adulta portuguesa, foram encontrados valores consideravelmente diferentes, de 37,8% e 17%, respetivamente. Dadas, a diferença significativa entre ambas e uma prevalência de FGNA inferior ao esperado, analisámos de forma particular, no grupo global (GG) dos 834 participantes, os participantes com EH e com FGNA e procedemos à comparação entre os grupos com e sem FGNA, tentando encontrar eventuais diferenças entre eles (625). O diagnóstico de FGNA foi assumido na presença de EH e exclusão de consumo alcoólico superior a 20 g/dia nas mulheres, ou de 30 g/dia nos homens, de acordo com o proposto pela Associação Europeia para o Estudo do Fígado, EASL (535), e das hepatites virais B (VHB) e C (VHC).

#### **3.1. Dados clínico-demográficos e clínicos**

##### **Grupo Esteatose Hepática (EH)**

A prevalência da EH foi quase duas vezes maior no sexo masculino do que no feminino (45,7% vs 25,6%), (OR: 2,43, IC95%: 2,1–2,7) (Figura 1). Nas mulheres, aumentou progressivamente com a idade, atingindo a maior prevalência entre os 35-64 anos. Na análise multivariada, a idade foi identificada como fator de risco para EH (OR: 1,938) para idades entre 35 e 64 anos (IC95%: 1,37–3,304). Os participantes com EH eram, em média, 10 mais velhos (55,7 vs 46,5 anos respetivamente,  $p < 0,001$ ).

##### **Grupo Fígado Gordo Não Alcoólico (FGNA)**

Após exclusão de ingestão alcoólica significativa e de outras etiologias, foi assumido que 138 participantes tinham FGNA. Eram mais velhos (idade média 54,7 vs 48,9 anos,  $p < 0,001$ ), sem diferenças significativas entre os sexos (Tabela XIV), quando comparados com os sem FGNA.

## 3.2. Fatores de risco

### 3.2.1. Grupo EH

A análise mostrou que a possibilidade de ter EH na presença de SM tinha uma OR de 5,934 (IC95%: 5,581–6,287) e a obesidade (IMC>30 Kg/m<sup>2</sup>) uma OR de 5,41 (IC95%: 5,142–5,678). De modo geral, os participantes com EH eram mais pesados (p<0,001), tinham maior perímetro da cintura (p<0,001) e maior TA (p<0,001), em ambos os sexos.

Hipertrigliceridemia, hiperglicemia, HDL baixo e um teste HOMA > 2,5 foram também fatores de risco para EH, com OR de 4,59 (IC95%: 4,230–4,954), 4,09 (IC95%: 3,769–4,409), 2,59 (IC95%: 2,261–2,933) e 5,83 (IC95%: 5,52–6,132), respectivamente.

Dos 834 participantes, 78 tinham DM (9,4%). O FG estava presente em 52 deles (66,6%), e apenas em 33,2% daqueles sem DM (p < 0,001).

O consumo alcoólico exagerado foi também fator de risco significativo para EH, com um OR de 2,39 (IC95%: 2,098–2,68). A análise da interação do consumo alcoólico com a obesidade mostrou um efeito supra aditivo, quando ambos estavam presentes. No entanto, os obesos ou com excesso de peso e com consumo moderado de álcool registraram uma prevalência inferior de EH relativamente aos seus correspondentes sem qualquer consumo alcoólico (Tabela XVI).

### 3.2.2. Grupo FGNA

Os participantes com FGNA tinham maiores prevalências de obesidade, de HTA, TA sistólica e diastólica médias, superiores, maior prevalência de SM (39,1% vs 16,1%) (Tabela XIV) e apresentaram níveis mais baixos de ApoA1 e de HDL (Tabela XV).

Foi registrada uma proporção maior de atuais ou antigos fumadores, em ambos os grupos (45,3% e 47,1% respectivamente), sem significado estatístico entre eles. A maioria dos participantes reportaram ausência ou atividade física baixa, em todos os grupos.

Não foi encontrada associação entre o consumo de macronutrientes e outras variáveis nutricionais e a presença de FGNA (Tabela XV).

A análise multivariada mostrou que o perímetro abdominal (>102 cm nos homens e >88 cm nas mulheres), a APOA1, a HDL baixa (< 40 mg/dl nos homens e < 50 mg/dl nas mulheres) representaram fatores de risco para FGNA (Tabela XVII).

O modelo produziu um Pseudo-R<sup>2</sup> de cerca de 14,9%, indicativo do modo como o modelo corrente explica a variabilidade da variável dependente, i.e., presença/ausência de FGNA.

O Score de fibrose BARD foi igual ou superior a 2 em 74,3% dos participantes no grupo EH e em 74,6% do grupo FGNA.

### **3.3. Dados da mortalidade**

No mesmo período de tempo, de acordo com a OMS, a mortalidade relacionada com EHNA foi de 0,105/100.000, enquanto a relacionada com patologia hepática foi de 6,79/100.000. Os dados recolhidos junto dos centros portugueses de transplantação hepática apontaram para uma percentagem de transplantações por EHNA ou cirrose criptogénica, com ou sem CHC, de aproximadamente 2% (comunicação pessoal).

### **3.4. Discussão**

Se a prevalência da EH foi elevada (37,8% dos participantes) após exclusão de outras causas, nomeadamente álcool e hepatites virais, a prevalência estimada de FGNA foi de apenas 17%, claramente inferior aos dados conhecidos de outros países europeus (53, 626). No entanto, esta prevalência ainda não se refletiu nos números de mortes ou de transplantes hepáticos atribuídos à EHNA, sendo estes últimos de apenas 2% do total de transplantações no mesmo período. Haldar e col. (627), também relataram apenas 4% de transplantes hepáticos relacionados com EHNA na Europa de 2002 a 2016, um número marcadamente diferente dos transplantes relacionados com doença hepática alcoólica, que representaram 32,2% do total; de notar, no entanto, que a percentagem de casos de EHNA aumentou significativamente de 2002 a 2016. Todavia, numa publicação recente, o álcool e as hepatites virais continuam a ser as principais causas de morbilidade e de mortalidade por doença hepática, apesar do crescimento epidémico da obesidade e da diabetes (628).

Na Europa, assistimos atualmente a uma discrepância entre uma elevada prevalência de EH e uma baixa prevalência de doença hepática terminal por EHNA. As explicações podem ser várias. A falta de reconhecimento da doença, uma evolução possivelmente mais lenta nalgumas populações, por fatores genéticos ou dietéticos, uma eventual demora entre o aumento da prevalência da obesidade e o aparecimento das suas consequências hepáticas, ou o facto da morbilidade e mortalidade destes doentes se dever mais à patologia cardíaca, vascular ou oncológica, muito frequente neste grupo, com uma menor morbi-mortalidade hepática. É também muito provável que exista uma associação de fatores metabólicos e ingestão alcoólica numa percentagem significativa dos casos de EH. A nossa observação, com diferenças significativas de prevalências de EH e FGNA, reforça essa hipótese. Em

países como Portugal, com consumos alcoólicos significativos numa faixa alargada da população, é ainda mais admissível uma etiologia mista para a EH, embora com uma alta prevalência de EH. Talvez por isso, um número importante de casos de FGNA fiquem por diagnosticar, ou então sejam catalogados como DHA, reduzindo falsamente a prevalência do FGNA. Nesse sentido, uma nomenclatura que não se baseie apenas na exclusão da ingestão alcoólica, como “*Metabolic associated fatty liver disease*” (MAFLD), poderia ser mais adequada (629).

O nosso estudo detetou uma associação do FGNA com a obesidade, a diabetes, a SM, a hipertensão arterial, níveis séricos reduzidos de colesterol HDL e elevados de colesterol LDL (Figura 2), semelhante ao que foi descrito por outros autores, com exceção apenas dos hábitos tabágicos, onde não foram registadas diferenças (626).

A natureza transversal do nosso estudo não nos permitiu medir a frequência dos eventos cardiovasculares, nem o possível contributo do FGNA como fator de risco, para além do papel dos já descritos. A menor prevalência da EH em mulheres jovens e maior em idades mais velhas poderão estar associadas a fatores hormonais, protetores em idades jovens, com a associação da deficiência estrogénica à SM pós menopausa (630).

Um dado inesperado foi a falta de associação, quer da EH, quer do FGNA, com um padrão dietético específico, ou com a atividade física. Estudos prévios, incluindo na população portuguesa, encontraram diferenças significativas entre o padrão dietético de doentes com FGNA/EHNA e a população geral, como sejam a diminuição do consumo de ácidos gordos  $\omega$ -3 (160). Contudo, enquanto na nossa análise o grupo FGNA foi uma variável “construída”, habitualmente na literatura os casos de FGNA resultam dum diagnóstico. Este aspeto pode alterar o modo como é feita a perceção da alimentação e o seu reporte, ou corresponder a doença mais grave. Nas últimas décadas a dieta mediterrânica emergiu como um fator protetor importante para o FGNA e a DCV (535, 631). Apesar da população portuguesa ter tradicionalmente uma dieta de tipo mediterrânico, esta não teve efeito protetor nos nossos participantes. A explicação pode estar na presença de outros fatores que se sobreponham ao efeito da dieta, como uma elevada presença de diabetes tipo 2, com uma prevalência estimada e ajustada à população de 9,8% da população adulta (632), similar aos 9,4% encontrados por nós. Poderá mesmo estar em causa uma predisposição genética para a resistência à insulina, que como se sabe predispõe ao FGNA (535, 633). A favor desta hipótese está a percentagem de Teste HOMA compatível com IR em 34,7% dos nossos participantes.

A obesidade e consumo alcoólico exagerado são dois conhecidos fatores de risco major para EH e doença hepática, potenciando-se mutuamente na gênese da EH. No nosso estudo, apesar de dois terços da nossa amostra terem obesidade ou excesso de peso, a ingestão moderada de álcool associou-se a menor prevalência de EH, sugerindo um efeito protetor. Resultados semelhantes foram reportados por outros autores (634-637), invocando um possível papel protetor da ingestão de quantidades ligeiras de álcool, particularmente vinho, em doentes com FGNA/EHNA. Num estudo recente nos EUA, doentes com FGNA a ingestão entre 0,5 e 1,5 bebidas/dia, demonstrou-se um efeito protetor na mortalidade global por todas as causas, embora o consumo acima desse nível se acompanhasse duma mortalidade aumentada (638).

Todos esses resultados devem ser interpretados com cautela, pois poderão ser devidos a um estilo de vida mais saudável, em vez do consumo de bebidas alcoólicas. Além disso, o consumo alcoólico tem um potencial deletério comprovado em presença de outra/as patologia/as hepática/as. De fato, tem sido demonstrado que doentes obesos têm maior suscetibilidade ao álcool (202) e doentes com FGNA com consumo regular têm 3,6 vezes maior probabilidade de desenvolver tumor hepático, relativamente aos abstinentes (639). De igual modo, Ajmera e col (640) demonstraram que mesmo quantidades pequenas de álcool estavam associadas a pior evolução histológica ao fim de 4 anos de seguimento, enquanto noutro estudo a mortalidade global aumentou com a ingestão de álcool, independentemente da quantidade (641).

Para avaliar o grau de fibrose, com os dados disponíveis, apenas foi possível aplicar o índice BARD (475). Os resultados encontrados revelaram uma alta probabilidade de doença avançada nos participantes do nosso estudo, mas isso aparentemente surge na sequência da grande maioria deles ter aminotransferases normais e do *score* ter sido construído com base em doentes (e não num grupo populacional) com aminotransferases elevadas.

As limitações do nosso estudo poderão ser um potencial viés de representatividade da nossa amostra, limitada pela taxa de aceitação em participar. Além disso, o QFA é sabido que pode ter problemas de reporte dos entrevistados, ou falta de objetividade, particularmente em indivíduos obesos (642-644).

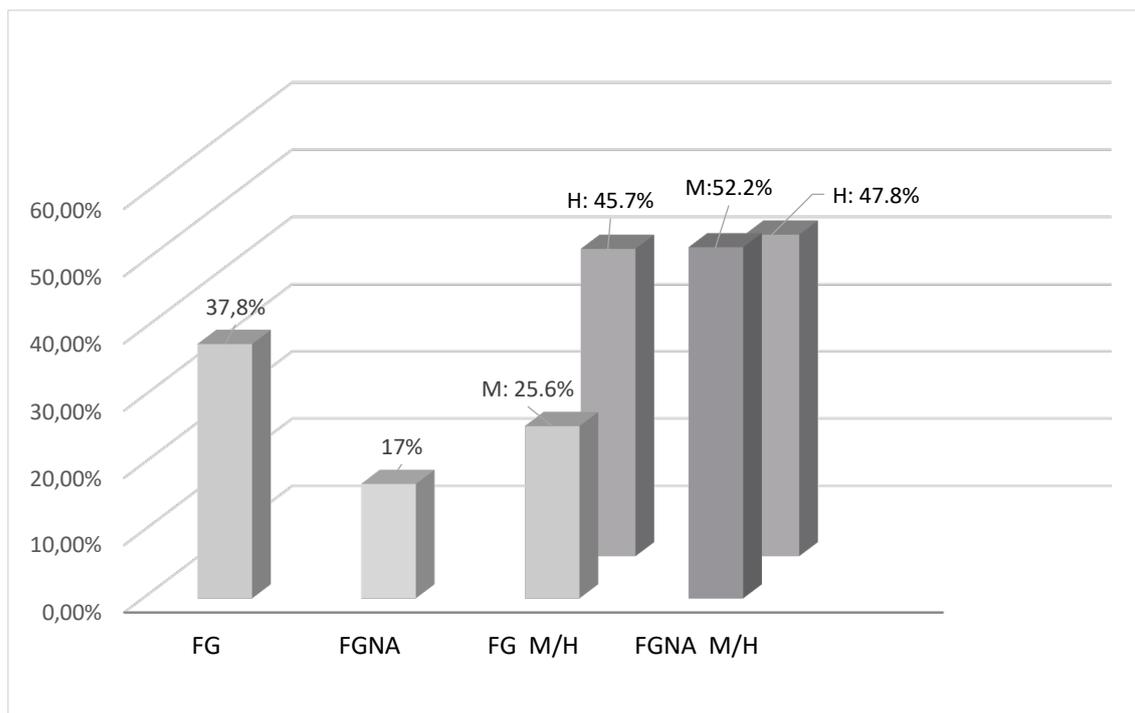


Figura 1. Prevalências ajustadas do FG e FGNA, globais e por sexos. FG: fígado gordo, FGNA: fígado gordo não alcoólico, M: mulheres, H: homens

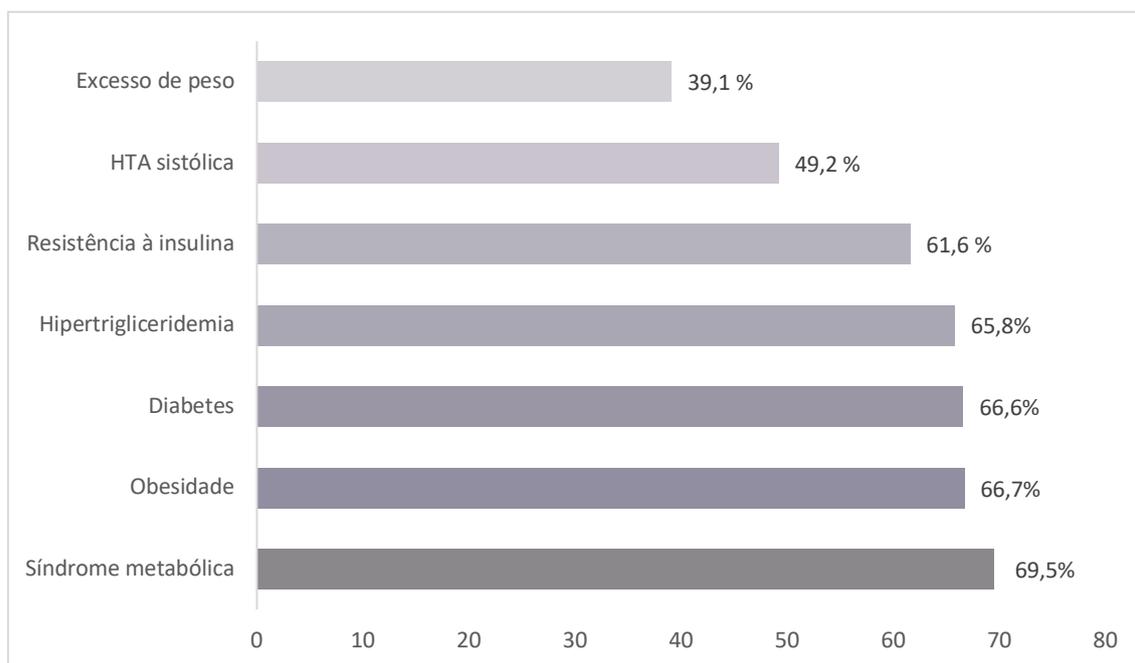


Figura 2. Prevalência do FG segundo os fatores de risco. HTA: hipertensão arterial, HTA sistólica: TA>130 mm Hg, obesidade: IMC>30 kg/m<sup>2</sup>, excesso de peso: IMC: 25-30 kg/m<sup>2</sup>.

### **3.5. Conclusões**

A análise dos dados do nosso estudo confirmou uma prevalência muito alta de EH na população adulta portuguesa e a sua relação com obesidade, IR e consumo alcoólico. Este continua a ser a causa mais comum de cirrose hepática em Portugal (645, 646), não obstante a contribuição de fatores metabólicos possa ter um contributo adicional significativo numa vasta percentagem da população. Isso pode-se dever, em parte, à distinção feita entre doença hepática relacionada com o consumo de álcool versus a não relacionada, o que poderá ser um pouco artificial, pelo menos numa vasta percentagem da população onde ambas poderão coexistir. Uma terminologia abarcando ambas as entidades, ainda que controversa, poderia ser mais realista e apropriada (647). Independentemente da designação e dos critérios usados, o reforço das medidas preventivas é fundamental, dada a relevância sanitária e o peso económico relacionados com estas situações, que poderão agravar-se nos próximos anos.

**Tabela XIV. Sumário dos dados demográficos e antropométricos dos grupos FGNA, Não-FGNA e GG**

	GG	FGNA	Não- FGNA	P *
Amostra, n	834	138	696	
Mulheres, n (%)	395 (47,2%)	72 (52,2%)	322 (46,3%)	0,225
Idade, média ± DP (anos)	49,8±17	54,7±15.4	48,9±17,2	0,000*
Idade grupos (anos), n (%)				0,012*
18-34	227 (27,2%)	24 (17,4%)	202 (29%)	
35-64	355 (42,5%)	62 (44,9%)	292 (42%)	
65-82	254 (30,4%)	52 (37,7%)	202 (29%)	
Região n (%)				0,000*
Alentejo	138 (16,5%)	16 (11,6%)	122 (17,5%)	
Algarve	119 (14,2%)	13 (9,4%)	106 (15,2%)	
Centro	220 (26,3%)	22 (15,9%)	196 (28,2%)	
LVT	215 (25,7%)	32 (23,2%)	183 (26,3%)	
Norte	142 (17,1%)	55 (39,9%)	88 (12,6%)	
Peso (kg), média ± DP	73,80±14,5	79,7±14,7	72,6±14,1	0,000*
Altura (cm), média ± DP	165±1	164±1	165±1	0,304
Circunferência abdominal (cm), média ± DP	93,54±12,9	100,9±11,8	92,1±12,6	0,000*
Circunf <sup>a</sup> . abdominal (cm) (H:>102, M: >88), n (%)	349 (42%)	92 (66,7%)	257 (36,9%)	0,000*
IMC (kg/m <sup>2</sup> ), média ± DP	27,2±4,8	29,6±4,9	26,7±4,6	0,000*
Obesidade (IMC>30 kg/m <sup>2</sup> ), n (%)	192 (23%)	58 (42%)	133 (19,1%)	0,000*
TA sistólica (mm Hg), média ± DP	127,9±21.3	132,5±19.2	127±21,5	0,001*
TA sistólica ≥ 130, n (%)	369 (44,1%)	79 (57,2%)	289 (41,5%)	0,001*
TA diastólica (mm Hg), média ±DP	80,4±11,1	83,1±10,4	79,8±11,2	0,002*
TA diastólica ≥ 85, n (%)	292 (34,9%)	61 (44,2%)	230 (33%)	0,012*
Síndrome metabólica, n (%)	167 (20%)	54 (39,1%)	112 (16,1%)	0,000*

\* Valor de **P** refere-se à comparação entre grupos FGNA e Não-FGNA (nível de significância de  $p < 0,05$ ). Diferenças entre variáveis com significado estatístico, marcadas com \*.

DP: desvio padrão; IMC: Índice de Massa Corporal (kg/m<sup>2</sup>); LVT: Lisboa e Vale do Tejo; TA: tensão arterial.

**Tabela XV. Sumário dos dados bioquímicos e dieta dos grupos: GG, FGNA e Não-FGNA**

	GG	FGNA	Não-FGNA	p *
Amostra, n	834	138	696	
ALT (U/L), média ± DP	21,2±12,3	24,5±14,3	20,5±11,8	0,000*
ALT M>29, H>39, n (%)	80 (9,6%)	25 (18,1%)	55 (7,9%)	0,000*
AST (U/L), média ± DP	20,8±8,8	20,8±6,3	20,8±9,3	0,218
AST M>29, H>39, n (%)	31 (3,7%)	7 (5,1%)	24 (3%)	0,351
GGT (U/L), média ± DP	27,2±34	31,4±26	26,4±35,3	0,000*
Albumina (g/L), média ± DP	40±3,731	40±3,3	40±3,8	0,858
Creatinina (mg/dL), média ± DP	0,8±0,2	0,8±0,2	0,8±0,2	0,442
Lpa (mg/dL), média ± DP	31,7±37,1	33,6±36,9	31,3±37,2	0,031*
ApoB (mg/dL), média ±DP	114,8±37,3	126,9±37,2	112,4±36,9	0,000*
ApoA1 (mg/dL), média ± DP	134,8±39,8	120,4±35,4	137,6±40	0,000*
ApoB/ApoA1, média ± DP	1,01±0,7	1,2±0,7	0,9±0,6	0,000*
TFG (ml/min)	100,3±18,9	96,3±18,3	101,1±18,9	0,007*
Coolesterol total (mg/dL), média ± DP	197,5±37,3	198,9±41,5	197,1±36,2	0,606
HDL (mg/dL), média ± DP	56,2±15,5	50,1±13,4	57,3±15,6	0,000*
HDL H<40, M<50 (mg/dL), n (%)	179 (21,4%)	55 (39,9%)	124 (17,8%)	0,000*
LDL (mg/dl), média ± DP	122,5±34,4	124,7±39,6	121,9±33,2	0,411
TG (mg/dL), média ± DP	110,7±75,7	146,6±119,6	103,6±61,2	0,000*
TG >150, n (%)	152 (18,2%)	42 (30,4%)	109 (15,7%)	0,000*
Glucose (mg/dL), média ± DP	95±22,5	100,3±24,7	94±21,9	0,000*
Glucose >110mg/dL ou medicação,n (%)	107 (12,8%)	29 (21%)	77 (11,1%)	0,015*
Insulina (μU/L), média ± DP	10,6±6,3	13,9±8,2	10±5,6	0,000*
HOMA IR, média ± DP	2,6±1,8	3,5±2,4	2,4±1,7	0,000*
IR (HOMA ≥ 2,5), n (%)	290 (34,7%)	76 (55,1%)	212 (30,5%)	0,000*
Calorias (Kcal), média ± DP**	2640,3±916,2	2523,4±933,8	2663,2±912,2	0,111
Proteínas (g/dia), média ± DP**	113,6±39,9	111,9±43,1	114±39,3	0,339
Carboidratos (g/dia), média ±DP**	300,8±113,4	291,5±113,9	302,7±113,4	0,302

**Tabela XV. Sumário dos dados bioquímicos e dieta dos grupos: GG, FGNA e Não-FGNA (cont.)**

	GG	FGNA	Não-FGNA	p *
Gordura total (g/dia, média ± DP)**	102,2±43,2	99,2±47	102,9±42,4	0,170
AGS (g/dia)	28,5±12,3	27,9±15,3	28,6±11,7	0,097
AGMI (g/dia)	49,1±23,3	47,4±24,5	49,5±23,1	0,155
AGPI (g/dia)	16,4±7,9	15,9±8,3	16,5±7,8	0,150
Colesterol (g/dia), média ± DP**	358±161,5	345,7±170,7	360,6±159,7	0,112
Fibra (g/dia), média ± DP**	29,7±12,5	28,4±11,4	29,9±12,8	0,321
Açúcares (g/dia), média ± DP**	132,3±61,1	131±63,4	132,7±60,7	0,559

\* valor de p, refere-se à comparação entre os grupos FGNA e não-FGNA (significado:  $p < 0,05$ ). Variáveis com significado estatístico assinaladas com asterisco \*.

\*\* Valores obtidos pela administração do QFA (Questionário de Frequência Alimentar).

ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; Apo-A1: apolipoproteína A1; Apo-B: apolipoproteína B; GGT: gama glutamil transferase; HDL: lipoproteína alta densidade (“*high density lipoprotein*”); LDL: lipoproteínas de baixa densidade (“*low density lipoprotein*”); Lp (a): lipoproteína (a); TFG: taxa filtração glomerular; TG: triglicerídeos. HOMA-IR (*Homeostatic Model Assessment*- insulino resistência): método para avaliar a insulino resistência:  $\text{insulinemia jejum } (\mu\text{U/mL}) \times \text{glicemia jejum } (\mu\text{mol/L}) / 22,5$ . HOMA-IR *cut-off*  $\geq 2,5$  indica insulino-resistência. IR: insulino resistência. AGS: ácidos gordos saturados; AGMI: ácidos gordos mono insaturados; AGPI: ácidos gordos poli-insaturados.

**Tabela XVI. Odds Ratio (95% intervalo de confiança) para o efeito individual e interação do consumo alcoólico e o IMC no grupo EH**

IMC	Consumo alcoólico		
	Nulo	Moderado	Excessivo
		1,49 (IC: 1,02- 2,18)	2,89 (IC: 2,02-4,15)
<b>Peso normal</b>	1	1,93 (IC: 0,79-4,68)	1,55 (IC: 0,6-4,00)
<b>Excesso de peso</b> 4,74 (IC: 3,13-7,19)	2,90 (IC: 1,24-8,79)	2,48 (IC: 1,69-3,84)	4,04 (IC: 2,71-6,02)
<b>Obesidade</b> 14,77 (IC: 9,25 -23,56)	16,50 (IC: 7,01-38,83)	4,25 (IC: 2,35-7,78)	17,97 (IC: 9,63-33,54)

Valores de  $p < 0,05$ , excepto Peso normal \* Consumo moderado ( $p = 0,357$ )

**Tabela XVII. Regressão logística binária (grupos FGNA e não-FGNA)**

Variável	Odds ratio	p *	IC inferior 95%	IC superior 95%
Sexo (masculino)	0,622	0,065	0,376	1,030
Idade (anos)	1,009	0,368	0,989	1,032
Circunferência abdominal (H>102 cm M>88 cm)	1,805	0,041*	1,024	3,182
Obesidade (IMC>30kg/m <sup>2</sup> )	0,880	0,677	0,482	1,607
FLI > 60	1,912	0,069	0,951	3,845
ALT (M>29 U/L, H>39 U/L)	1,485	0,273	0,732	3,012
GGT (U/L)	0,999	0,992	0,993	1,007
TFG (ml/min)	0,999	0,948	0,984	1,015
Lpa (mg/dL)	1,001	0,619	0,996	1,007
ApoB (mg/dL)	1,007	0,293	0,994	1,019
ApoA1 (mg/dL)	0,985	0,046*	0,971	0,999
ApoB/apoA1 (mg/dL)	0,738	0,583	0,250	2,182
HDL (H< 40 mg/dL, M< 50 mg/dL)	1,941	0,029*	1,071	3,519
TG > 150 mg/dL	1,213	0,549	0,645	2,283
Glucose > 110 mg/dL	1,298	0,452	0,658	2,561
Insulina (μU/L)	1,036	0,108	0,992	1,082
HOMA-IR (≥ 2,5)	1,171	0,618	0,630	2,179
Síndrome metabólica	0,726	0,418	0,335	1,575
TAS ≥ 130 mmHg	1,662	0,096	0,914	3,025
TAD ≥ 85 mmHg	0,911	0,714	0,553	1,500

\*p respeita à comparação entre os grupos FGNA e não-FGNA (nível de significância de  $p < 0,05$ ); Pseudo-R<sup>2</sup>=0,149; n=785. DP: desvio padrão; FLI: *Fatty Liver Index*. TAS: tensão arterial sistólica; TAD: tensão arterial diastólica. ALT: alanina aminotransferase; Apo-A1: apolipoproteína A1; Apo-B: apolipoproteína B; GGT: gama glutamil transferase; Lp (a): lipoproteína (a); TFG: taxa de filtração glomerular; TG: triglicerídeos. HOMA-IR (*Homeostatic Model Assessment-insulino resistência*): insulina em jejum (μU/mL) x glucose jejum (mmol/L) / 22,5. HOMA-IR *cut-off* ≥2,5 indica insulino resistência.

#### **4. Correlação entre a vitamina D sérica e a prevalência de EH**

Nos últimos anos a vitamina D (VD) ganhou uma grande relevância na prática clínica e na investigação, que pelo seu papel já conhecido na fisiologia humana, designadamente a sua participação no metabolismo ósseo, quer pelo interesse renovado após a atribuição de efeitos pleiotrópicos. Apesar de alguma evidência científica da hipovitaminose D se associar ao FGNA, essa relação não está ainda bem esclarecida, assim como a direção duma possível relação entre eles. Sendo Portugal um país com um número elevado de horas de sol e não havendo dados nacionais conhecidos, analisámos a existência duma possível correlação entre a presença de EH e os níveis séricos da vitamina D (VD) (648).

##### **4.1. Participantes e métodos**

Em 789 participantes pertencentes ao grupo já descrito (tendo sido usados os mesmos critérios de seleção), a VD sérica foi medida por electroquimioluminescência (*Electrochemiluminescence binding assay*, ECLIA).

Para efeitos de comparação e análise os resultados foram agrupados em três diferentes categorias, de acordo com os critérios propostos por Holick J e a Sociedade de Endocrinologia (375): défice, se inferior a 20 ng/ml; insuficiência, entre 21 e 29 ng/ml; normal, se superior a 30 ng/ml.

Todos os restantes parâmetros usados foram obtidos de acordo com o descrito anteriormente.

##### **4.2. Resultados**

A VD sérica média foi de  $26,0 \pm 9,8$  ng/ml (mínimo: 5,0 e máximo de 70 ng/ml). Apenas 31,6% dos indivíduos tinham VD superior a 30 ng/ml (considerada normal). Não houve diferença estatisticamente significativa entre homens e mulheres ( $26,2 \pm 9,4$  ng/ml *versus*  $25,7 \pm 10,2$  ng/ml, respetivamente), bem como entre os valores séricos médios, quando colhidos no verão, ou no inverno ( $p=0,785$ ).

Os níveis séricos da VD foram semelhantes nos participantes com e sem EH:  $25,2 \pm 8,7$  versus  $26,4 \pm 10,3$  ng/ml, respetivamente ( $p=0,071$ ) (Figura 3). A prevalência de EH também não teve correlação estatisticamente significativa com qualquer um dos níveis séricos de VD: < 20 ng/ml: 36,6%, 21-29 ng/ml: 39% e > 30 ng/ml: 30,1% ( $p=0,086$ ).

Dos 789 participantes, 57 (12%) tinham VD inferior a 12 ng/ml, nível considerado muito baixo pelos critérios enunciados. Destes, 18 (31,5%) tinham EH e a comparação da

presença de EH nos participantes com VD abaixo ou acima de 12 ng/ml não teve correlação estatisticamente significativa ( $p=0,587$ ).

Apesar dos participantes com IMC acima de 30 kg/m<sup>2</sup> terem níveis de VD inferiores, aos daqueles com IMC entre 25 e 30 kg/m<sup>2</sup> e aos dos indivíduos com IMC < 25 kg/m<sup>2</sup> ( $p < 0,001$ ) não houve correlação entre o IMC e a VD ( $r = -0,193$ ).

Os níveis séricos de VD associaram-se à presença de SM apenas nos participantes sem EH ( $p < 0,001$ ), não havendo associação significativa nos que tinham EH ( $p=0,065$ ) (Tabela XVIII).

Não foi encontrada correlação entre a VD sérica e a ingestão da VD, medida pelo QFA ( $r=0,075$ ;  $p=0,383$ ) (Figura 4).

Não foi encontrada relação entre a abstinência ou a ingestão de álcool, a VD sérica e a presença ou ausência de EH ( $p=0,340$ ) (Tabela XIX).

Não foi encontrada correlação entre a atividade física (AF) e a EH ( $p=0,619$ ) nos 789 participantes. A correlação entre a AF e a VD não teve significado estatístico no grupo global ( $p=0,316$ ), nem nos participantes com VD  $\leq 20$  ng/ml, VD: 21-29 ng/ml, ou VD  $\geq 30$  ng/ml ( $p=0,454$ ). De igual modo, a análise separada nos participantes com e sem EH não obteve significado estatístico (respetivamente  $p=0,682$  e  $p=0,193$ ).

**Tabela XVIII. Correlação entre a vitamina D sérica (ng/ml) e a síndrome metabólica, na presença ou ausência, de EH**

EH	SM	n	VD (média)	DP	EP (média)	<i>p</i>
Não	Não	462	26,89	10,383	0,483	0,001
	Sim	46	21,69	8,555	1,261	
Sim	Não	168	25,95	9,01	0,695	0,065
	Sim	110	23,95	8,395	0,8	

Legenda: EH: EH, SM: síndrome metabólica, VD: vitamina D sérica (ng/ml), DP: desvio padrão, EP: erro padrão (média)

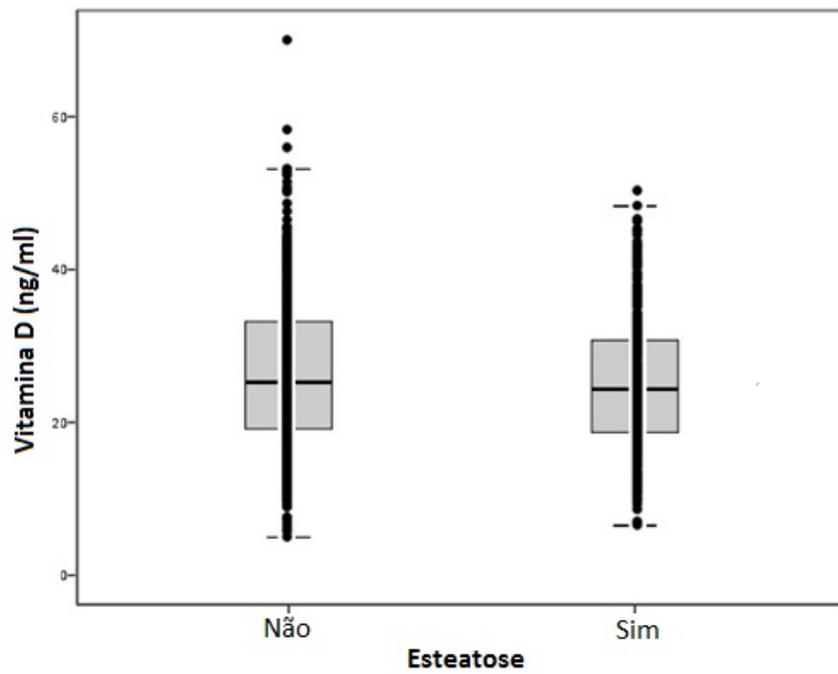


Figura 3. Correlação entre a EH e a VD sérica ( $p=0,071$ )

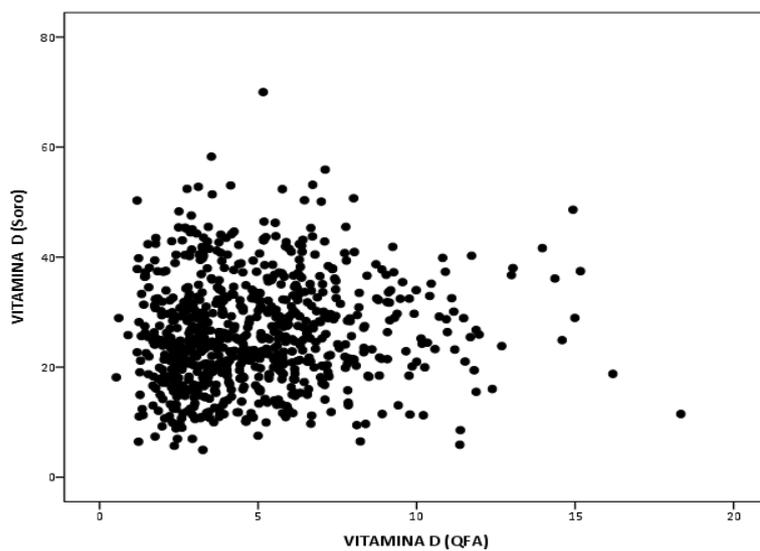


Figura 4. Correlação entre a VD sérica e a ingerida (QFA),  $r=0,075$  ( $p=0,383$ )

**Tabela XIX. Correlação entre a vitamina D sérica EH e o álcool consumido**

Álcool consumido	Esteatose		Deficiência de Vitamina D		
		n	n	%	p
Sem consumo	Não	186	59	31,7%	0,340
	Sim	57	22	38,6%	
M: 0-20g/d; H: 0-30g/d	Não	172	48	27,9%	0,463
	Sim	82	27	32,9%	
M: >20g/d; H: > 30g/d	Não	149	35	23,4%	0,891
	Sim	139	34	24,4%	

**Legenda:** Vitamina D sérica, consumo alcoólico e EH, em apenas 785 participantes. Deficiência de Vitamina D: < 20 ng/ml. M: mulheres, H: homens.

### 4.3. Discussão

Como o fígado intervém na regulação da homeostase dos glúcidos e dos lípidos e à VD tem sido atribuída participação na secreção pancreática de insulina e à sua sensibilidade, níveis normais de VD séricos têm sido referidos como necessários para o controle mais eficaz do SM, da DM2 e conseqüentemente, do FGNA, para o qual são conhecidos fatores de risco.

Os resultados do nosso estudo, no entanto, sugerem que na nossa população níveis baixos de VD não se associam a maior prevalência de EH, nem a hipovitaminose D se associa à obesidade, contrariamente ao identificado em algumas publicações (329, 649, 650). Por outro lado, na nossa população, independentemente da presença ou não de EH, não foram detetados níveis inferiores da VD nas diferentes estações do ano (num país com mais de 2500 horas de sol por ano), nem correlação entre a hipovitaminose D e os níveis de exercício físico.

Em anos recentes a VD ganhou interesse crescente, pela sua associação a outras condições clínicas além do metabolismo ósseo (651-653) e por estudos epidemiológicos que sinalizaram uma deficiência, de tipo pandémico, em largas faixas da população em geral, incluindo a europeia (654, 655). Apesar das diferenças nos desenhos e amostras dos estudos, métodos de doseamento ou sazonalidade, é questionável que uma faixa tão importante da população tenha hipovitaminose D tão marcada. Além disso, os valores da VD foram inicialmente recomendados para o caso do metabolismo cálcico e ósseo, não sendo consensual se são os mais adequados para outras patologias (656). Esta questão assume ainda mais importância porque um diagnóstico errado de hipovitaminose D e a conseqüente suplementação, se bem que raramente, pode originar efeitos secundários. Entre estes inclui-se hipercalcémia, hiperfosfatemia, supressão da hormona paratiroide,

hipercalcúria ou litíase renal e por outro lado, a recomendação de aumento da exposição solar aumenta o risco de cancro da pele (657).

Apesar de associação da hipovitaminose D (pelos critérios da sociedade americana de Endocrinologia) ao FGND e seus fatores de risco, o IOM não encontrou evidência suficiente para defender a suplementação com VD, com intuito de prevenir ou atrasar a evolução da DM, do SM ou da IR, apesar das associações relatadas entre o FGNA, SM ou DM (366, 367). Falta esclarecer se essas associações são casuais, se correspondem a um conjunto de fatores de risco, ou são apenas consequência de doença hepática crónica. De acordo com as definições do IOM, 28% dos nossos participantes estariam em risco de deficiência e 7,2% já com deficiência (< 12 ng/ml). Contudo, mesmo considerando o limiar mais baixo, não encontramos associação entre a hipovitaminose D e a EH (p=0,587).

Outro resultado interessante foi a ausência de associação entre a VD sérica e a ingestão de VD, segundo o QFA. Possíveis explicações poderão estar no efeito da exposição solar, sobreposto à ingestão alimentar, ou na informação prestada, sendo conhecida a subnotificação dos questionários alimentares, sobretudo em obesos (642-644).

A relevância do nosso estudo deve-se ao facto termos estudado um grande grupo populacional considerado saudável, num país com elevado número de horas de sol. Quanto aos pontos de maior fraqueza, são a possível menor fiabilidade dos dados recolhidos pelos QFA e do uso da ecografia abdominal para deteção da EH. Além disso, é sempre difícil generalizar dados duma população supostamente saudável para doentes que procurem a ajuda médica por terem EH.

#### **4.4. Conclusões**

Os resultados do nosso estudo não evidenciaram a existência duma correlação entre os níveis da vitamina D sérica, nomeadamente a hipovitaminose, e a presença de EH na nossa população adulta. De igual modo, não foi demonstrada relação entre os níveis séricos e a ingestão de vitamina D, medidos pelo Questionário de Frequência Alimentar.

Necessariamente estes resultados deverão ser confirmados em diferentes populações, embora sugiram não haver vantagem na suplementação de VD no contexto da eventual prevenção da EH, não devendo descurar-se a possibilidade de efeitos secundários.

## 5. Análise das causas de EH nos participantes sem consumo alcoólico

Da análise dos 834 participantes da amostra, constatou-se que uma parte importante (526, 63%) reportou ausência de consumo alcoólico ou consumos baixos, inferiores a 20 g/dia nas mulheres, ou 30 g/dia nos homens, valores reconhecidos como os limites máximos diários admitidos no conceito de FGNA (535). Dada a dimensão deste subgrupo, foi feita uma análise com objetivo de clarificar as causas de EH nesses participantes e de analisar possíveis diferenças em relação ao grupo total (tabelas XX, XXI, XXII, XXIII e XXIV).

### 5.1. Resultados

Nos 526 participantes sem consumo excessivo de álcool foi detetada EH em 151, 28,71% (IC 95%: 24,84%-32,57%), 31,2%, após ajustamento para a idade, sexo e região no grupo total. O sexo masculino registou uma prevalência de 37,06%, superior à do feminino, que foi de 23,71%. Foi detetada uma progressão da prevalência da EH com a idade, com 15,0% dos 18 aos 34 anos, 32,39% dos 35 aos 64 e 37,91%, acima dos 65 anos.

A presença da EH associou-se de forma evidente à presença de SM (EH em 20,99% na sua ausência *vs* 60,61% quando esteve presente,  $p < 0,001$ ) e aos eventos habitualmente associados à SM (Tabela XX). Foi o caso, nomeadamente, do perímetro da cintura abdominal, maior sobretudo nos homens (17,01% *vs* 42,80%) e a pressão arterial elevada, em ambos os sexos. Registou-se uma subida marcada da prevalência de EH em indivíduos com IMC's mais elevados:  $< 25 \text{ kg/m}^2$  - 11,33%,  $25\text{-}30 \text{ kg/m}^2$  - 30,95% e  $> 30 \text{ kg/m}^2$  - 55,75%.

A EH não mostrou relação com a atividade física, embora houvesse tendência para maiores prevalências associadas a níveis mais altos de AF.

A EH esteve associada estatisticamente aos hábitos tabágicos, mas não foi detetada associação à toma de medicações potencialmente esteatogénicas.

Em termos nutricionais, apenas foi encontrada associação significativa com a menor ingestão de cafeína.

Laboratorialmente, houve associação marcada a glicemia acima dos 100 mg/dl, a ALT  $> 30 \text{ U/L}$  nas mulheres e  $> 40 \text{ U/L}$  nos homens (26,14% e 59,52% respetivamente), a trigliceridemia acima dos 150 mg/dl, a HDL abaixo dos limites normais (M  $< 50$ , H  $< 40 \text{ mg/dl}$ ), a HOMA-IR sugestivo de insulino resistência e a uma relação ApoB/ApoA1, descrita como associada a um risco cardiovascular maior: em todos  $p < 0,001$ .

**Tabela XX. Esteatose hepática e as variáveis qualitativas nos participantes sem consumo alcoólico**

Grupos etários	n	Prevalência	IC 95	p	OR	IC 95
18-34 anos	160	15,00%	9,47% - 20,53%	<0,001	0,332	0,000 - 0,788
35-64 anos	213	32,39%	26,11% - 38,68%		1,350	1,226 - 1,474
≥ 65 anos	153	37,91%	30,22% - 45,6%		1,838	1,586 - 2,09
Sexo	n	Prevalência	IC 95	p	OR	IC 95
Feminino	329	23,71%	19,11% - 28,3%	0,001	0,528	0,146 - 0,91
Masculino	197	37,06%	30,31% - 43,8%		1,894	1,509 - 2,279
P. cintura (cm)	n	Prevalência	IC 95	p	OR	IC 95
H <102, M <88	288	17,01%	12,67% - 21,35%	<0,001	0,274	0,000 - 0,665
H ≥102, M ≥88	236	42,80%	36,48% - 49,11%		3,649	3,26 - 4,038
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	n	Prevalência	IC 95	p	OR	IC 95
< 25	203	11,33%	6,97% - 15,69%	<0,001	0,195	0,000 - 0,576
25-30	210	30,95%	24,7% - 37,21%		1,199	1,157 - 1,241
> 30	113	55,75%	46,59%-64,91%		4,653	4,295 - 5,011
PAS elevada	n	Prevalência	IC 95	p	OR	IC 95
<130 mm Hg	315	20,32%	15,87% - 24,76%	<0,001	0,363	0,000 - 0,745
≥130 mm Hg	211	41,23%	34,59% - 47,87%		2,752	2,368 - 3,136
PAD elevada	n	Prevalência	IC 95	p	OR	IC 95
< 85 mm Hg	358	23,46%	19,07% - 27,85%	<0,001	0,462	0,072 - 0,852
≥ 85 mm Hg	168	39,88%	32,48% - 47,29%		2,164	1,768 - 2,56
Ativ. física	n	Prevalência	IC 95	p	OR	IC 95
Ligeira	225	28,44%	22,55% - 34,34%	0,535	-	
Moderada	191	26,70%	20,43% - 32,98%		-	
Intensa	110	32,73%	23,96% - 41,5%		-	
H. <sup>os</sup> tabágicos	n	Prevalência	IC 95	p	OR	IC 95
Nunca fumou	333	24,32%	19,72% - 28,93%	0,017	0,565	0,214 - 0,916
Ex-Fumador	102	32,35%	23,27% - 41,43%		1,240	1,108 - 1,372
F. <sup>or</sup> ocasional	26	42,31%	23,32% - 61,3%		1,886	1,496 - 2,276
Fumador	65	40,00%	28,09% - 51,91%		1,792	1,434 - 2,15
M esteatogênica	n	Prevalência	IC 95	p	OR	IC 95
Não	505	28,12%	24,2% - 32,04%	0,144	-	
Sim	21	42,86%	21,69% - 64,02%		-	
Glicémia (mg/dl)	n	Prevalência	IC 95	p	OR	IC 95
<100	413	22,52%	18,49% - 26,55%	<0,001	0,276	0,000 - 0,697
>100	113	51,33%	42,11% - 60,54%		3,629	3,193 - 4,065

**Tabela XX. Esteatose hepática e as variáveis qualitativas nos participantes sem consumo alcoólico (cont.)**

AST (U/L)	n	Prevalência	IC 95	p	OR	IC 95
M ≤ 29, H ≤ 39	508	28,15%	24,24% - 32,06%	0,174	-	
M >30, H > 40	16	43,75%	19,44% - 68,06%		-	
ALT (U/L)	n	Prevalência	IC 95	p	OR	IC 95
M ≤ 29, H ≤ 39	482	26,14%	22,22% - 30,06%	<0,001	0,241	0,000 - 0,85
M >30, H > 40	42	59,52%	44,68% - 74,37%		4,155	3,511 - 4,799
TG (mg/dl)	n	Prevalência	IC 95	p	OR	IC 95
< 150	445	22,92%	19,02% - 26,83%	<0,001	0,198	0,000 - 0,668
> 150	80	60,00%	49,26% - 70,74%		5,044	4,551 - 5,537
HDL (mg/dl)	n	Prevalência	IC 95	p	OR	IC 95
M > 50, H > 40	399	22,56%	18,46% - 26,66%	<0,001	0,315	0,000 - 0,725
M < 50, H < 40	127	48,03%	39,34% - 56,72%		3,173	2,751 - 3,595
HOMA-IR	n	Prevalência	IC 95	p	OR	IC 95
<2,5	333	18,02%	13,89% - 22,15%	<0,001	0,215	0,000 - 0,613
>2,5	166	50,60%	43% - 58,21%		4,661	4,256 - 5,066
ApoB/ApoA1	n	Prevalência	IC 95	p	OR	IC 95
Risco baixo	208	16,35%	11,32% - 21,37%	<0,001	0,336	0,000 - 0,747
Risco moderado	96	32,29%	22,94% - 41,65%		1,232	1,153 - 1,311
Risco elevado	222	38,74%	32,33% - 45,15%		2,325	2,007 - 2,643
SM	n	Prevalência	IC 95	p	OR	IC 95
Não	424	20,99%	17,11% - 24,87%	<0,001	0,173	0,000 - 0,61
Sim	99	60,61%	50,98% - 70,23%		5,791	5,333 - 6,249

**Legenda:** n: número, IC95: intervalo de confiança 95%, OR: *Odds ratio*, nível de significância:  $p < 0,05$ , P. cintura: perímetro da cintura, IMC: índice de massa corporal ( $\text{kg/m}^2$ ), PAS: pressão arterial sistólica, PAD: pressão arterial diastólica, Ativ. Física: Atividade física, H.<sup>os</sup> tabágicos: Hábitos tabágicos, F.<sup>or</sup>: Fumador, M esteatogênica: Medicação potencialmente esteatogênica, AST: aspartato aminotransferase, ALT: alanina aminotransferase, TG: Triglicerídeos, HDL: colesterol lipoproteínas de alta densidade, HOMA-IR (*Homeostatic Model Assessment, insulin resistance*): método para cálculo da resistência à insulina: insulina jejum ( $\mu\text{U/mL}$ )  $\times$  glicemia jejum ( $\text{mmol/L}$ )/22,5. HOMA-IR  $\geq 2,5$  indicativo de insulino resistência. ApoB: apolipoproteína B, ApoA1: apolipoproteína A1, ApoB/ApoA1: fator de risco para doença coronária - intermédio (homens: 0,7-0,89; mulheres: 0,6-0,79), alto (homens: 0,9-1,1; mulheres: 0,8-1,0), SM: síndrome metabólica.

**Tabela XXI. Relação entre a presença de EH e as variáveis quantitativas Participantes sem consumo alcoólico (homens e mulheres)**

Variável	EH	n	Média (ep)	IC 95%	p
Idade (anos)	não	375	46,53 (0,91)	-11,68 a -5,66	<0,001
	sim	151	55,2 (1,23)		
IMC	não	375	25,71 (0,22)	-4,69 a -3	<0,001
	sim	151	29,55 (0,4)		
PAS	não	375	122,16 (1,04)	-14,64 a -7,12	<0,001
	sim	151	133,04 (1,58)		
PAD	não	375	77,6 (0,55)	-7,68 a -3,66	<0,001
	sim	151	83,26 (0,83)		
Albuminemia (g/dl)	não	375	39,81(0,21)	-1,08 a 0,27	0,237
	sim	151	40,21(0,27)		
Creatininemia (mg/dl)	não	375	0,74 (0,01)	-0,06 a 0,03	0,470
	sim	151	0,76 (0,02)		
Glicose (mg/dl)	não	375	90,19 (1,07)	-14,69 a -5,88	<0,001
	sim	151	100,48 (1,96)		
Insulinemia $\mu$ UI/ml	não	355	9,22 (0,26)	-5,99 a -3,17	<0,001
	sim	144	13,8 (0,67)		
Col-Total (mg/dl)	não	375	194,7 (1,77)	-12,51 a 1,22	0,107
	sim	151	200,35 (3,31)		
HDL (mg/dl)	não	375	60,01 (0,79)	7,55 a 12,78	<0,001
	sim	151	49,84 (1,07)		
LDL (mg/dl)	não	375	118,95 (1,56)	-14,17 a -0,21	0,044
	sim	151	126,14 (3,18)		
TG (mg/dl)	não	375	89,8 (2,1)	-76,88 a -38,47	<0,001
	sim	151	147,48 (9,5)		
AST (U/L)	não	374	19,39 (0,49)	-3,02 a 0,26	0,099
	sim	150	20,77 (0,51)		
ALT (U/L)	não	373	17,58 (0,46)	-8,83 a -4,04	<0,001
	sim	151	24,01 (1,13)		
GGT (U/L)	não	375	17,21 (0,78)	-18,11 a -9,39	<0,001
	sim	151	30,96 (2,07)		
Calorias	não	366	2473,97 (41,6)	-217,17 a 104,76	0,493
	sim	148	2530,17(77,61)		
Proteínas (g)	não	366	108,49 (1,93)	-9,62 a 5,09	0,546
	sim	148	110,75 (3,45)		
Hid. Carbono (g)	não	366	294,13 (5,53)	-18,2 a 23,29	0,809
	sim	148	291,58 (9,41)		
Gordura total (g)	não	366	97,77 (2,03)	-10,78 a 6,54	0,630
	sim	148	99,89 (3,9)		
GS (g)	não	366	27,13(0,56)	-3,35 a 1,98	0,613
	sim	148	27,81 (1,23)		
GMI (g)	não	366	47,39 (1,14)	-4,9 a 4,23	0,885
	sim	148	47,73 (2,02)		
GPI (g)	não	366	15,42 (0,35)	-2,6 a 0,74	0,273
	sim	148	16,35 (0,77)		

**Tabela XXI. Relação entre a presença de EH e as variáveis quantitativas Participantes sem consumo alcoólico (homens e mulheres) (cont.)**

Variável	EH	n	Média (ep)	IC 95%	p
Cafeína (mg)	não	não	366 (3,05)	71,03(3,05)	0,047
	sim	sim	148 (4,95)	82,45(4,95)	
Vitamina C (mg)	não	366	187,55 (6,67)	-5,12 a 39,65	0,130
	sim	148	170,29 (6,99)		
Vitamina D (µg)	não	366	4,67 (0,13)	-0,42 a 0,55	0,789
	sim	148	4,6 (0,2)		
Vitamina E (mg)	não	366	12,68 (0,29)	-1,59 a 0,65	0,411
	sim	148	13,14 (0,55)		
Fibra Alimentar (g)	não	366	29,78 (0,68)	-1,01 a 3,78	0,256
	sim	148	28,4 (0,92)		
Fibra insolúvel (g)	não	366	18,6 (0,47)	-0,66 a 2,64	0,240
	sim	148	17,61 (0,63)		
Fibra solúvel (g)	não	366	7,87 (0,21)	-0,45 a 1,03	0,441
	sim	148	7,58 (0,29)		
AG Omega3 (g)	não	366	1,63 (0,03)	-0,17 a 0,07	0,450
	sim	148	1,68 (0,05)		
AG Omega 6 (g)	não	366	11,94 (0,3)	-2,32 a 0,66	0,273
	sim	148	12,77 (0,7)		
AG Trans	não	366	1,1 (0,03)	-0,13 a 0,11	0,848
	sim	148	1,11 (0,06)		
Frutose (g)	não	366	34,54 (1,17)	-2,64 a 5,72	0,469
	sim	148	33 (1,68)		

**Legenda:** ep=erro padrão, n: número, IC95: intervalo de confiança 95%, OR: *Odds ratio*, nível de significância:  $p < 0,05$ , IMC: índice de massa corporal, PAS: pressão arterial sistólica, PAD: pressão arterial diastólica, Col-Total: Colesterol total, HDL: lipoproteínas de alta densidade (“*high density lipoproteins*”) LDL: lipoproteínas de baixa densidade (“*low density lipoproteins*”), TG: triglicerídeos, AST: aspartato aminotransferase, ALT: alanina aminotransferase, GGT: gama glutamil transferase, Hid. Carbono: hidratos de carbono, GS: gorduras saturadas, GPI: gorduras polinsaturadas, GMI: gorduras monoinsaturadas, AG Omega3: ácidos gordos Omega 3, AG Omega6: ácidos gordos Omega 6.

Algumas variáveis apresentaram pontos de corte diferentes entre homens e mulheres, sendo analisadas em separado. Em relação ao sexo feminino, encontrou-se associação entre a EH, o peso, a cintura, a Apo A1, a Apo B e a relação Apo B/Apo A1. No sexo masculino apenas se encontrou associação com significado estatístico da EH com o peso, a cintura e a Apo B.

**Tabela XXII. Associação da presença de EH e as variáveis quantitativas (mulheres sem consumo alcoólico)**

Variável	EH	n	Média (ep)	IC 95%	p
Álcool (g/dia)	não	251	3,04 (0,34)	-1,73 a 1,06	0,636
	sim	78	3,38 (0,63)		
ApoB	não	251	109,29 (2,54)	-26,84 a -6,37	0,002
	sim	78	125,9 (4,49)		
ApoA1	não	251	145,57 (2,79)	6,16 a 28,2	0,002
	sim	78	128,38 (4,49)		
ApoB/ApoA1	não	251	0,93 (0,05)	-0,44 a -0,07	0,008
	sim	78	1,19 (0,09)		
Peso (kg)	não	251	64,76 (0,71)	-15,06 a -7,67	<0,001
	sim	78	76,13 (1,72)		
Altura (m)	não	251	1,59 (0)	-0,01 a 0,03	0,270
	sim	78	1,58 (0,01)		
Cintura (cm)	não	251	87,09 (0,78)	-16,11 a -9,72	<0,001
	sim	78	100 (1,45)		

*ep*=erro padrão

**Tabela XXIII. Associação da presença de EH e as variáveis quantitativas (homens sem consumo alcoólico)**

Variável	EH	n	Média (ep)	IC 95%	p
Álcool (g/dia)	não	124	7,13 (0,69)	-3,3 a 1,22	0,364
	sim	73	8,17 (0,92)		
ApoB	não	124	113,05 (3,41)	-24,44 a -3,52	0,009
	sim	73	127,03 (3,77)		
ApoA1	não	124	123,52 (3,13)	-0,25 a 17,48	0,057
	sim	73	114,9 (3,22)		
ApoB/ApoA1	não	124	1,07 (0,06)	-0,3 a 0,03	0,097
	sim	73	1,21 (0,06)		
Peso (Kg)	não	124	73,99 (1,04)	-12,53 a -5,47	<0,001
	sim	73	82,98 (1,53)		
Altura (m)	não	124	1,7 (0,01)	-0,03 a 0,02	0,798
	sim	73	1,71 (0,01)		
Cintura (cm)	não	123	91,78 (0,91)	-12,92 a -6,91	<0,001
	sim	72	101,69 (1,24)		

*ep*=erro padrão

Na regressão logística foram incluídas todas as variáveis que mostraram associação ou diferença estatisticamente significativa nos valores médios pelos métodos anteriormente utilizados. Sempre que a variável foi medida em termos quantitativos e qualitativos, optou-se pela utilização da variável qualitativa (por exemplo a razão ApoB/ApoA1). Assim, as variáveis analisadas foram: idade (grupos etários), sexo, consumo alcoólico (g/dia),

ApoB/ApoA1, glicemia (> 100 mg/dl), IR, tabaco, ALT, obesidade, TAS elevada, TAD elevada, cintura, trigliceridemia, HDL, SM, LDL, GGT e cafeína.

O modelo de regressão logística é válido e os dados ajustam-se bem ao mesmo (teste de Hosmer-Lemeshow:  $p = 0,918$ ), explicando as variáveis descritas na tabela seguinte 45,4% da presença de EH ( $R^2$  de Nagelkerke = 0,454). As variáveis não incluídas na tabela não deverão ser consideradas como fatores preditores de risco de EH; os valores de *odds ratio* poderão diferir dos anteriormente apresentados (análise bivariada), já que os apresentados agora estão ajustados para o efeito conjunto das várias variáveis identificadas.

Da análise multivariada (regressão logística), os valores mais elevados de IMC destacou-se como o maior fator de risco para EH, associando-se acima de 25 kg/m<sup>2</sup> a um OR de 5,763, mas com proporções mais elevadas ainda, se superior a 30 kg/m<sup>2</sup>, (OR de 28,412). Os triglicéridos acima de 150 mg/dl e o colesterol HDL baixo (inferior a 40 mg/dl no sexo masculino e 50 no feminino) associaram-se significativamente à presença de EH. Das enzimas hepáticas, a GGT foi o único índice bioquímico com associação estatística a EH nos participantes sem consumo alcoólico ou com baixo consumo.

**Tabela XXIV. Fatores de risco de EH**  
**Análise multivariável (regressão logística)**  
**Participantes sem consumo alcoólico (homens e mulheres)**

	p	OR ajustado	IC 95% para OR	
			Inferior	Superior
IMC < 25 (kg/m <sup>2</sup> )	< 0,001			
IMC 25-30(kg/m <sup>2</sup> )	0,001	5,763	1,991	16,679
IMC (>30kg/m <sup>2</sup> )	< 0,001	28,412	8,720	92,570
TG ≥ 150 mg/dl	0,013	3,903	1,332	11,443
HDL <40H <50M	0,002	3,701	1,638	8,361
GGT	0,004	1,026	1,008	1,045

## 5.2. Discussão

Da análise deste subgrupo de 526 participantes sem consumo alcoólico, ou com consumo inferior a 20 g/dia nas mulheres e 30 g/dia nos homens, foi encontrada uma prevalência de EH de 28,71% (IC95% 24,8 a 32,5%), 31,2%, após ajustamento para a idade, sexo e região no grupo total. Relativamente à distribuição por sexos, o masculino também foi o que teve maior prevalência, neste subgrupo (37,06 vs 23,71%).

Em relação à idade registou-se um aumento progressivo da EH, que se aproximou dos 38% acima dos 65 anos.

De igual modo, nos participantes sem consumo alcoólico marcado, houve uma forte associação com a SM, com EH em 60,61% dos participantes com SM vs apenas 20,99% na sua ausência.

Também nesta análise não se registou associação com o exercício físico (até se verificou mesmo uma tendência para mais EH em participantes com maior exercício físico), mas houve uma associação positiva com os hábitos tabágicos.

Em termos nutricionais, apenas foi encontrada maior associação da EH com a menor ingestão de cafeína, o que constituiu outra particularidade deste subgrupo.

Laboratorialmente, a EH associou-se sobretudo aos eventos da SM: glicemia acima dos 100 mg/dl, trigliceridemia acima de 150 mg/dl, HOMA-IR compatível com IR, relação ApoB/ApoA1 elevada e colesterol HDL inferior ao normal.

Da análise de multivariáveis, os fatores com significado estatístico foram: excesso de peso e a obesidade (IMC 25-30 e > 30 kg/m<sup>2</sup> respetivamente), colesterol HDL baixo e trigliceridemia acima de 150 mg/dl. Das enzimas hepáticas, apenas a GGT teve associação estatística à EH.



## **Capítulo 4**

### **DISCUSSÃO**

A doença hepática crónica, nas suas várias etiologias, condiciona morbidade significativa, compromete o prognóstico vital dos doentes e implica gastos relevantes. Apesar desta evidência, comprovada diariamente na clínica, a sua importância atual em Portugal não tem sido devidamente realçada.

A nível global, o peso económico e social (“*burden*” na designação na literatura de língua anglófona e hoje amplamente usado) da doença hepática tem-se vindo a acentuar progressivamente. A Organização Mundial de Saúde (OMS) prevê que entre 2015 e 2030 a mortalidade por cirrose hepática aumente mais de 15% e a devida ao CHC aumente cerca de 43% (658). Esse fato reflete-se já em estatísticas nacionais, como as recentemente publicadas nos EUA, onde de 2003 a 2012 se registou um aumento significativo de internamentos por doença hepática e suas consequências (peritonite bacteriana, encefalopatia, etc.), com reflexo nos gastos económicos (659).

A EH surge associada principalmente ao consumo de álcool ou em contexto de FGNA e também neste caso os dados conhecidos apontam para um aumento do número de internamentos e do consumo de recursos.

Relativamente ao consumo de álcool, há evidência do seu aumento a nível mundial. A OMS tem relatado um crescendo do *burden* mundial, que em 2012 era já responsável por 5,9% de todas as mortes e por 5,1% do *burden* global, medido em DALYs (“*Disability-adjusted life years*”, soma do número de anos perdidos devido a mortalidade precoce e do número de anos vividos sem saúde, devido á doença) (660). Recentemente, a OMS estabeleceu a meta de diminuir o consumo global em 10% até 2025 (661), mas a realidade atual aponta para um aumento. Entre 1990 e 2017 o consumo anual global *per capita* nos adultos aumentou de 5,9 (IC95% 5,8-6,1) para 6,5 litros (6,0-6,9) e as previsões apontam para um aumento até aos 7,6 litros (6,5-10,2) em 2030 (662).

Sendo o consumo de álcool muito prevalente a nível mundial, há diferenças regionais importantes, motivadas por fatores económicos, religiosos, ou pela implementação de políticas locais, sobretudo nas últimas décadas, tentando controlar a situação.

Na Europa, o consumo tem variado também nos diferentes países e ao longo do tempo. Apesar do registo duma diminuição global do consumo *per capita* entre 2000 e 2017 de cerca de 12% (662), inclusive com o contributo de medidas governamentais, o consumo médio na Europa continua a ser muito relevante, de cerca de 10 litros por pessoa, por ano (662). Neste âmbito, destaca-se a iniciativa governamental, levada a cabo na Escócia em

2018 (“*Alcohol Framework 2018: Preventing Harm. Next steps on changing our relationship with alcohol*”), estendida depois a Gales. O aumento do preço da unidade de álcool (8 g) (*Minimum Unit Pricing - MUP*), traduziu-se já em resultados promissores com redução da venda de bebidas alcoólicas (663, 664).

Em Portugal os estudos são escassos. Apesar de no relatório de 2014 da OMS (dados referentes a 2010) ser referida uma tendência para o decréscimo do consumo de álcool *per capita* em Portugal, os consumos médios anuais são ainda extremamente elevados (22,6 litros de álcool *per capita*, sendo 27,1 nos homens e 16,4 nas mulheres) (660). Nos últimos anos foram publicadas algumas análises dos internamentos por cirrose hepática em Portugal. Em 2015, num estudo dos internamentos por cirrose descompensada entre 1993 e 2008, apesar dum decréscimo na mortalidade por cirrose hepática de todas as causas, com valores próximos da média europeia, a DHA continuou a ser a principal etiologia, responsável por 84% dos casos, 75% dos quais do sexo masculino (versus 59% de homens nos internamentos por cirrose “não alcoólica”). Registou-se um aumento dos internamentos por DHA nos homens de meia idade (acrécimo de 45% entre os 40 e os 54 anos), falecendo os doentes, em média, duas décadas mais cedo relativamente à população em geral (60,5 *versus* 80 anos), (665). Noutra estudo, referente aos internamentos por cirrose hepática no período de 2003 a 2012, apesar de reportada uma diminuição dos internamentos por cirrose hepática na globalidade (de 77,6% para 71,6%) e nos de etiologia alcoólica, o álcool continuou a ser o maior responsável, sendo essa etiologia encontrada em 76,0% dos internamentos e estando também presente em 81,6% da totalidade, contabilizando os casos em que se associou a outras etiologias como as hepatites virais crónicas (645).

Todos estes fatos concorrem para que a DHA tenha atualmente em Portugal um peso incontornável, económica e socialmente, como aliás já foi descrito em 2010 (646).

Relativamente ao FGNA e à EHNA, apesar da prática clínica dos últimos anos prenunciar um aumento da incidência também entre nós, não existiam dados que permitissem conhecer a realidade nacional, ou planear estratégias preventivas. Embora com muitos doentes em fases avançadas, os dados conhecidos de morbilidade e mortalidade não reproduzem entre nós, tal como a nível europeu, a realidade de outros países sobretudo dos Estados Unidos da América. Mesmo admitido um viés, pelo défice de reporte duma patologia sobretudo do âmbito da clínica hepatológica e aparentemente ainda pouco

percecionada ao nível dos cuidados primários, pelas limitações das classificações de doenças em uso e pela mortalidade sobretudo cardiovascular, a realidade relatada noutras regiões parece ter uma dimensão superior do que a verificada entre nós.

Apesar de vastos, os dados de outros países ou regiões não podem ser extrapolados para a população portuguesa, pelas diferenças étnicas, sociais, de hábitos nutricionais ou de exercício físico, entre outras razões, relativamente a outras zonas do globo.

Este é o primeiro estudo feito em Portugal que procurou estimar a prevalência da EH e identificar os seus fatores de risco. Contribuindo para o conhecimento da realidade portuguesa, pode servir de base para delinear estratégias de prevenção e ser ponto de comparação com trabalhos futuros.

Apesar de inferior à previsão inicial, baseada na prevalência estimada a nível global, uma prevalência estimada de 17% na população adulta e um aumento previsível de casos num futuro próximo, muitos evoluindo para fases avançadas da doença, justificam uma atenção crescente para esta entidade, que de ignorada durante muitos anos, está a caminho de se tornar predominante na hepatologia. Para isso concorre também o aumento da prevalência do FGNA na população infantil e adolescente e nos adultos jovens (75), em crescendo a nível global, alicerçado no crescimento da prevalência de fatores como a sobrenutrição, a diabetes ou a obesidade (666). Quando atingirem a idade adulta muitos deles evoluirão para fases avançadas da doença, com todo o espectro de possíveis consequências, hepáticas e extra hepáticas, com aumento dos riscos cardíaco, metabólico e neoplásico (667).

Apesar disso, o número de casos em fase mais adiantada da doença ainda não demonstra uma dimensão tão grave como noutras regiões. Na nossa amostra, apesar de apenas ter sido possível avaliar a elasticidade hepática em menos de metade dos participantes, a presença de valores indicativos de fibrose apenas foi encontrada numa percentagem diminuta. Embora estes valores devam ser interpretados com cuidado, são concordantes com os registos clínicos conhecidos e a experiência, por exemplo, da transplantação hepática. Os hábitos alcoólicos, preocupantemente elevados reportados na nossa população, o sedentarismo e os hábitos nutricionais, cada vez menos típicos da dieta mediterrânica e substituídos por dietas menos saudáveis, entre outros, poderão alterar esta realidade a curto prazo.

Além do aumento de novos diagnósticos, acrescem outros aspetos que acentuam a sua importância. É o caso do CHC, mesmo na ausência de cirrose, cuja incidência tem crescido no contexto do FGNA. Desde os primeiros relatos (668) tem-se vindo a acumular evidência de que o FGNA é fator de risco para CHC, sendo mesmo o que mais cresceu nos últimos anos (669, 670). A obesidade, a diabetes, a gordura visceral, os eventos associados à SM (671), ou os aspetos genéticos (672-675), todos têm sido referidos como cofatores, devendo merecer maior atenção na determinação do risco associado a estes doentes, apesar de não estar definida ainda uma estratégia de rastreio.

Além da doença hepática, o FGNA assume relevo também pela conhecida morbidade e mortalidade cardiovascular, refletindo o caráter sistémico da doença e os distúrbios metabólicos associados, aos quais é imperioso atender ao orientar estes doentes.

Acerca dos fatores de risco encontrados na nossa população, apesar de alguma semelhança com o descrito na literatura, há aspetos particulares. A associação com a DM, de elevada prevalência entre nós, com a obesidade e com o excesso de peso, presentes em cerca de dois terços da nossa amostra, com a SM e os seus eventos e com a HTA são indicativos da população alvo onde devem ser efetuados esforços para a deteção precoce da doença.

Os nossos dados confirmam a associação do consumo de álcool de forma excessiva com a EH. No entanto e atendendo à fisiopatologia conhecida da EH, seria expectável encontrar associação com alguns aspetos nutricionais na nossa população. Em primeiro lugar, a análise dos dados obtidos não demonstrou relação entre o aporte calórico e a EH, na amostra global, incluindo todos os participantes, ou apenas no subgrupo com consumo de álcool inferior aos limites habitualmente referidos na definição de FGNA.

A análise da relação entre a ingestão de macro ou micronutrientes e a presença de EH também não devolveu qualquer significado, com destaque natural para aqueles mais focados nas dietas recomendadas nestes doentes. A ingestão dos carboidratos em geral, de gorduras, saturadas ou insaturadas, de proteínas, ou doutros, como as fibras ou as vitaminas, destacando a vitamina D, não mostraram associação com a EH. Mesmo a ingestão de frutose, largamente referenciada como ainda mais esteatogénica do que os açúcares tradicionais, apenas teve algum significado, de modo inesperado, nos participantes sem esteatose. O fato de não constar do questionário de frequência alimentar, tal como descrito inicialmente, tendo sido acrescentado posteriormente, pode

eventualmente ajudar a entender esse achado. Além disso, apesar do seu inegável valor, é conhecida a dificuldade destes questionários em reportar com exatidão os padrões alimentares dos entrevistados, por alguma falta de objetividade, particularmente em indivíduos obesos.

Apesar de em Portugal a dieta tradicional ser predominantemente do tipo mediterrânico, na nossa amostra não teve a proteção expectável para o aparecimento de EH. Para isso deve-se ter em conta um possível viés de representatividade devido à taxa de aceitação em participar no estudo, que abrangeu muitas zonas urbanas, o que pode também ter influenciado os resultados.

Embora puramente especulativo, os aspetos genéticos poderão no futuro vir a revelar-se importantes nesta área.

Finalmente devemos salientar a falta de associação com o exercício físico, sendo de realçar que uma percentagem importante dos participantes relatou pouca mobilidade física.

Além destes aspetos sanitários, é reconhecido também ao FGNA um peso económico cada vez maior, pelo aumento dos recursos necessários ao seu tratamento, em crescendo nos últimos anos e que se preveem aumentem consideravelmente num futuro próximo, nomeadamente se nada for feito (676).

Por tudo isto, é cada vez mais premente atentar nesta patologia, com uma prevenção dirigida aos grupos de maior risco, evitando o seu incremento futuro entre nós, à semelhança da realidade atual doutras regiões, onde afeta largas faixas da população e consume recursos escassos e preciosos. Para isso, o conhecimento da nossa realidade assume particular importância, pelos números e pelos fatores de risco encontrados, para os quais deverá ser dirigida a atenção e uma estratégia de prevenção. É também importante realçar que as enzimas hepáticas não apresentaram níveis significativamente mais elevados nos doentes com esteatose, levando a questionar o interesse em usar os níveis de aminotransferases, por exemplo a ALT, como marcador de doença hepática, e para o despiste de FGNA.

A nível da prevenção primária, é fundamental o controle da obesidade, do excesso de peso e da diabetes, mantendo e encorajando uma alimentação mais saudável,

tradicionalmente de cariz mediterrânico, e ainda a implementação de programas de atividade física regular.



## **Capítulo 5**

### CONCLUSÕES

O presente estudo foi o primeiro realizado em Portugal com o objetivo de estimar a prevalência e conhecer os fatores de risco da EH na população adulta portuguesa, avaliando a sua relevância no âmbito das doenças hepáticas crónicas. Encontrámos uma elevada prevalência global de EH, que ajustada à idade, região e sexo, foi de 37,8%.

Após exclusão de consumo alcoólico excessivo e de hepatites virais, a prevalência da EH foi de apenas 17%, correspondendo à prevalência estimada do FGNA, que apesar de elevada, é inferior aos dados conhecidos até ao momento, incluindo os europeus, que estimam valores de cerca de 25%.

Nos fatores de risco, salientamos, em primeiro lugar, a idade e o sexo: os participantes com EH são 10 anos mais velhos, em média, e o sexo masculino tem uma prevalência de cerca do dobro do sexo feminino (45,6% vs 25,6%).

O consumo alcoólico exagerado foi uma causa importante de EH na população adulta portuguesa, destacando-se a associação de consumo alcoólico e obesidade em muitos dos nossos participantes. Se os consumos ligeiros se associaram a menor risco de EH, os consumos exagerados aumentaram esse risco. Deve salientar-se que o aparente efeito protetor da ingestão de pequenas quantidades de álcool pode resultar de estilos de vida mais saudáveis adotados por esses participantes. Por isso, não devem ser ignorados os efeitos nefastos do consumo alcoólico, quer a nível hepático, quer na mortalidade global. No grupo estudado não foi possível demonstrar qualquer associação dos vários níveis de exercício físico, incluindo a sua ausência, ou dos hábitos tabágicos à presença de EH.

A ingestão calórica total e os fatores nutricionais não se associaram à presença de esteatose hepática nos nossos participantes. Este facto poderá estar relacionado com um viés de informação num estudo populacional e/ou com o fato da variável FGNA ter sido “construída” e não corresponder a um diagnóstico clínico. Sendo a dieta mediterrânica muito prevalente na nossa população, a ausência de efeito estatístico protetor para o aparecimento de EH poderá significar que outros fatores de risco se terão sobreposto à dieta na nossa população.

Valores baixos ou muito baixos de VD sérica não se evidenciaram como fator de risco para EH na nossa população adulta, contrariando dados sugeridos por outros estudos.

Constituíram-se, no entanto, como fatores de risco significativo para EH, o excesso de peso, a obesidade, a DM2 e a hipertensão arterial. De notar, que no grupo global, 2/3 dos nossos participantes terem excesso de peso (42,9%) ou obesidade (23%).

A presença de DM2 em 9,4% dos participantes (sendo a prevalência estimada na população adulta portuguesa de 9,8%) e um teste de HOMA positivo em 34,7% da amostra poderão sugerir a existência de fatores genéticos, que merecem esclarecimento no futuro.

Valores elevados de glicemia, colesterolemia, trigliceridemia, relação ApoB/ApoA1 (fator de risco intermédio ou alto para doença coronária), ALT e GGT, ou valores baixos de colesterol HDL, associaram-se a EH.

Nos 366 participantes em que foi possível avaliar a elastografia hepática transitória, a média dos valores foi de 5,1 kPa, com valores superiores a 8 kPa (risco intermédio) apenas em 9 (8 homens e 1 mulher), não tendo sido encontrado nenhum doente com um valor superior a 10 kPa (risco elevado).

Apesar do número elevado de casos de EHNA observado, o número de mortes ou transplantes hepáticos atribuídos à doença foi de apenas 2% do total no período em que decorreu o estudo. Esta discrepância pode resultar dum viés de identificação ou de codificação da doença, ou de uma menor sensibilidade para esta patologia (particularmente ao nível dos cuidados primários, semelhante ao relatado na Europa). Existe também a possibilidade que a preponderância da morbi-mortalidade cardiovascular nestes doentes (antecedendo em anos a doença hepática avançada), leve a uma redução relativa do número de casos avançados.

Face ao aumento acentuado da prevalência dos fatores de risco, prevemos um crescimento importante do número de novos casos de EH e EHNA em Portugal nos próximos anos. Perante a escassez de soluções terapêuticas, a sua deteção precoce torna-se decisiva para melhorar o prognóstico dos doentes. Nesse sentido, o rastreio dos grupos de risco assume particular importância. O nosso estudo contribuiu para o conhecimento da realidade nacional e dos principais grupos de risco, facilitando e orientando a implementação de estratégias preventivas.

É primordial aumentar o foco nesta patologia, cuja prevalência entre nós é já muito significativa, como demonstrámos, prevendo-se o seu aumento, com um impacto muito forte na saúde pública. Sendo os fatores de risco para a EH os mesmos que condicionam a morbilidade e mortalidade cardiovasculares, quer na população em geral, quer nos doentes com EHNA, a sua prevenção terá ainda maior relevo, cabendo aos cuidados primários de saúde um papel decisivo na prevenção e identificação precoce dos casos.

São também extremamente importantes as medidas de saúde pública que reduzam a prevalência de obesidade e de diabetes, assim como o consumo de álcool de risco.

## Apêndice

Comparação entre os participantes dos estudos Fígado gordo (FG) e e\_Cor

### Idade

	n	Mínima	Máxima	Média	Desvio Padrão	p
e-COR	1689	18,00	79,00	50,14	18,312	0,566
FG	834	18,00	79,00	49,80	17,16	

### Sexo

	FG	e_Cor	p
n (%)			0.644
Feminio	394 (47,2%)	837 (49.6%)	
Masculio	440 (52,8%)	852 (50.4%)	
<b>Total</b>	<b>834 (100.0%)</b>	<b>1689 (100.0%)</b>	

### Ingestão de álcool

(Moderado: M< 20g/dia, H<30g/dia; Excessivo: M>20g/dia, H>30g/dia)

	FG		e_Cor		p
	Frequência (n)	Percentagem (%)	Frequência (n)	Percentagem (%)	
Inexistente	301	36,1	628	37,2	0,945
Moderado	441	52,9	890	52,7	
Excessivo	92	11,0	171	10,1	
<b>Total</b>	<b>834</b>	<b>100</b>	<b>1689</b>	<b>100</b>	

### Hábitos tabágicos

	FG		e_Cor		p
	Frequência (n)	Percentagem (%)	Frequência (n)	Percentagem (%)	
Ex-fumador	197	23,6	376	22,3	0,941
Fumador	134	16,1	291	17,2	
Fumador ocasional	50	6,0	84	5,0	
Nunca fumou	453	54,3	938	55,5	
<b>Total</b>	<b>834</b>	<b>100</b>	<b>1689</b>	<b>100</b>	

**Resistência à insulina (Teste de HOMA)**

	FG		e_Cor		p
	Frequência (n)	Percentagem (%)	Frequência (n)	Percentagem (%)	
<2,5	505	60,5	1008	59,7	0,680
>2,5	289	34,7	626	37,1	
Omisso	40	4,8	55	3,2	
<b>Total</b>	834	100,0	1689	100,0	

**Índice de Massa Corporal (kg/m<sup>2</sup>)**

	FG		e_Cor		p
	Frequência (n)	Percentagem (%)	Frequência (n)	Percentagem (%)	
<25	283	33,9	620	36,7	0,832
25-30	358	42,9	683	40,4	
>30	192	23,0	385	22,8	
<b>Total</b>	834	99,9	1688	99,9	
Omisso	1	0,1	1	0,1	
<b>Total</b>	835	100,0	1689	100,0	

**Tensão arterial sistólica**

	FG		e_Cor		p
	Frequência (n)	Percentagem (%)	Frequência (n)	Percentagem (%)	
< 130 mmHg	415	49,8	832	54,7	0,920
≥ 130 mmHg	419	50,2	857	45,3	
<b>Total</b>	834	100	1689	100	

**Tensão arterial diastólica**

	FG		e_Cor		p
	Frequência (n)	Percentagem (%)	Frequência (n)	Percentagem (%)	
<85 mm Hg	541	64,9	1135	67,2	0,625
≥85 mm Hg	292	35	553	32,7	
Omisso	1	0,1	1	0,1	
<b>Total</b>	834	100	1689	100	

**Perímetro da cintura (cm)**

	FG		e_Cor		p
	Frequência	Percentagem	Frequência	Percentagem	
	(n)	(%)	(n)	(%)	
<b>H&lt;102,M&lt;88</b>	483	58,1	948	56,1	0,718
<b>H&gt;102,M&gt;88</b>	349	41,9	737	43,6	
<b>Omisso</b>	2		4	0,3	
<b>Total</b>	834	100	1689	100	

**Triglicerídeos**

	FG		e_Cor		p
	Frequência	Percentagem	Frequência	Percentagem	
	(n)	(%)	(n)	(%)	
<b>&lt;150mg/dl</b>	681	81,7	1402	83	0,728
<b>&gt;150mg/dl</b>	152	18,2	286	16,9	
<b>Omisso</b>	1	0,1	1	0,1	
<b>Total</b>	834	100	1689	100	

**Colesterol HDL diminuído**

	FG		e_Cor		p
	Frequência	Percentagem	Frequência	Percentagem	
	(n)	(%)	(n)	(%)	
<b>H&gt;40,M&lt;50</b>	655	78,5	1349	79,9	0,740
<b>H&gt;40,M&gt;50</b>	179	21,5	340	20,1	
<b>Total</b>	834	100	1689	100	

**Glicemia**

	FG		e_Cor		p
	Frequência	Percentagem	Frequência	Percentagem	
	(n)	(%)	(n)	(%)	
<b>&lt;110mg/dl</b>	728	87,3	1458	86,3	0,778
<b>&gt;110mg/dl</b>	106	12,7	231	13,7	
<b>Total</b>	834	100	1689	100	

**Presença de síndrome metabólica**

	FG		e_Cor		p
	Frequência	Percentagem	Frequência	Percentagem	
	(n)	(%)	(n)	(%)	
<b>Não</b>	664	79,6	1357	80,3	0,864
<b>Sim</b>	167	20,0	327	19,4	
<b>Omisso</b>	3	0,4	5	0,3	
<b>Total</b>	834	100	1689	100	

**AST (Aspartato aminotransferase)**

	FG		e_Cor		p
	Frequência	Percentagem	Frequência	Percentagem	
	(n)	(%)	(n)	(%)	
<b>M&lt;30,H&lt;40</b>	800	95,9	1612	95,7	0,788
<b>M≥30,H≥40</b>	31	3,7	72	4,3	
<b>Omisso</b>	3	0,4	5	0,3	
<b>Total</b>	834	100	1689	100	

**ALT (Alanina aminotransferase)**

	FG		e_Cor		p
	Frequência	Percentagem	Frequência	Percentagem	
	(n)	(%)	(n)	(%)	
<b>M&lt;30,H&lt;40</b>	752	90,2	1526	95,7	0,966
<b>M≥30,H≥40</b>	80	9,6	160	4,3	
<b>Omisso</b>	2	0,2	3	0,2	
<b>Total</b>	834	100	1689	100	

**Atividade física**

	FG		e_Cor		p
	Frequência	Percentagem	Frequência	Percentagem	
	(n)	(%)	(n)	(%)	
<b>1</b>	354	42,4	667	39,5	0,935
<b>2</b>	301	36,1	635	37,6	
<b>3</b>	179	21,5	386	22,9	
<b>Total</b>	834	100	1689	100	

## **Bibliografia:**

1. Wolf DC: Evaluation of the Size, Shape, and Consistency of the Liver. In: Walker HK, Hall WD, Hurst JW, eds. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. Boston: Butterworths Copyright © 1990, Butterworth Publishers, a division of Reed Publishing. 1990.
2. Kuntz E KH-D. Biochemistry and Functions of the Liver. In: *Hepatology Textbook and Atlas*: Springer, Berlin, Heidelberg, 2008.
3. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2467-2474.
4. Kwiterovich PO, Jr., Sloan HR, Fredrickson DS. Glycolipids and other lipid constituents of normal human liver. *J Lipid Res* 1970;11:322-330.
5. Szczepaniak LS, Nurenberg P, Leonard D, Browning JD, Reingold JS, Grundy S, Hobbs HH, et al. Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;288:E462-468.
6. Frerichs FTv. *A clinical treatise on diseases of the liver*. London : New Sydenham Society, 1860-1861, pags 278-314.
7. Addison T. Observations on fatty degeneration of the liver. *Guy's Hosp Rep* 1836;1:476-485.
8. Burt AD, Lackner C, Tiniakos DG. Diagnosis and Assessment of NAFLD: Definitions and Histopathological Classification. *Semin Liver Dis* 2015;35:207-220.
9. Volzke H. Multicausality in fatty liver disease: is there a rationale to distinguish between alcoholic and non-alcoholic origin? *World J Gastroenterol* 2012;18:3492-3501.
10. Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C, Karim R, et al. NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology* 2002;35:373-379.
11. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, Natale S, et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* 2003;37:917-923.
12. Anstee QM, McPherson S, Day CP. How big a problem is non-alcoholic fatty liver disease? *BMJ* 2011;343:d3897.
13. Cusi K. Role of insulin resistance and lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis* 2009;13:545-563.
14. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 2010;52:1836-1846.
15. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999;116:1413-1419.
16. Dam-Larsen S, Franzmann M, Andersen IB, Christoffersen P, Jensen LB, Sorensen TI, Becker U, et al. Long term prognosis of fatty liver: risk of chronic liver disease and death. *Gut* 2004;53:750-755.
17. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;41:1313-1321.
18. Brunt EM. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology* 2010;16:5286.
19. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980;55:434-438.

20. Bhalal N, Angulo P, van der Poorten D, Lee E, Hui JM, Saracco G, Adams LA, et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease with advanced fibrosis or cirrhosis: an international collaborative study. *Hepatology* 2011;54:1208-1216.
21. Caldwell S, Argo C. The natural history of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis* 2010;28:162-168.
22. Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, Mullany EC, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet* 2014;384:766-781.
23. Sookoian S, Pirola CJ. Non-alcoholic fatty liver disease is strongly associated with carotid atherosclerosis: a systematic review. *J Hepatol* 2008;49:600-607.
24. Lin YC, Lo HM, Chen JD. Sonographic fatty liver, overweight and ischemic heart disease. *World J Gastroenterol* 2005;11:4838-4842.
25. Ekstedt M, Franzen LE, Mathiesen UL, Thorelius L, Holmqvist M, Bodemar G, Kechagias S. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology* 2006;44:865-873.
26. Day CP. Natural history of NAFLD: remarkably benign in the absence of cirrhosis. *Gastroenterology* 2005;129:375-378.
27. Adams LA, Lymp JF, St. Sauver J, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, Angulo P. The Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Population-Based Cohort Study. *Gastroenterology* 2005;129:113-121.
28. Angulo P, Kleiner DE, Dam-Larsen S, Adams LA, Bjornsson ES, Charatchoenwittaya P, Mills PR, et al. Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 2015;149:389-397.e310.
29. Ekstedt M, Hagstrom H, Nasr P, Fredrikson M, Stal P, Kechagias S, Hultcrantz R. Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatology* 2015;61:1547-1554.
30. Chavez-Tapia NN, Uribe M, Ponciano-Rodriguez G, Medina-Santillan R, Mendez-Sanchez N. New insights into the pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol* 2009;8 Suppl 1:S9-17.
31. Abrams GA, Kunde SS, Lazenby AJ, Clements RH. Portal fibrosis and hepatic steatosis in morbidly obese subjects: A spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2004;40:475-483.
32. Charlton MR, Burns JM, Pedersen RA, Watt KD, Heimbach JK, Dierkhising RA. Frequency and outcomes of liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis in the United States. *Gastroenterology* 2011;141:1249-1253.
33. Suzuki A, Angulo P, Lymp J, St Sauver J, Muto A, Okada T, Lindor K. Chronological development of elevated aminotransferases in a nonalcoholic population. *Hepatology* 2005;41:64-71.
34. Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, Nakagawa T, Taniguchi H, Fujii K, Omatsu T, et al. The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Intern Med* 2005;143:722-728.
35. Whalley S, Puvanachandra P, Desai A, Kennedy H. Hepatology outpatient service provision in secondary care: a study of liver disease incidence and resource costs. *Clin Med* 2007;7:119-124.
36. Lee JY, Kim KM, Lee SG, Yu E, Lim YS, Lee HC, Chung YH, et al. Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease in potential living liver donors in Korea: a review of 589 consecutive liver biopsies in a single center. *J Hepatol* 2007;47:239-244.

37. Minervini MI, Ruppert K, Fontes P, Volpes R, Vizzini G, de Vera ME, Gruttadauria S, et al. Liver biopsy findings from healthy potential living liver donors: reasons for disqualification, silent diseases and correlation with liver injury tests. *J Hepatol* 2009;50:501-510.
38. Ryan CK, Johnson LA, Germin BI, Marcos A. One hundred consecutive hepatic biopsies in the workup of living donors for right lobe liver transplantation. *Liver Transpl* 2002;8:1114-1122.
39. Tran TT, Changsri C, Shackleton CR, Poordad FF, Nissen NN, Colquhoun S, Geller SA, et al. Living donor liver transplantation: histological abnormalities found on liver biopsies of apparently healthy potential donors. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21:381-383.
40. Marcos A, Fisher RA, Ham JM, Olzinski AT, Shiffman ML, Sanyal AJ, Luketic VA, et al. Selection and outcome of living donors for adult to adult right lobe transplantation. *Transplantation* 2000;69:2410-2415.
41. Nadalin S, Malago M, Valentin-Gamazo C, Testa G, Baba HA, Liu C, Fruhauf NR, et al. Preoperative donor liver biopsy for adult living donor liver transplantation: risks and benefits. *Liver Transpl* 2005;11:980-986.
42. Ground KE. Liver pathology in aircrew. *Aviat Space Environ Med* 1982;53:14-18.
43. Amarapurkar A, Ghansar T. Fatty liver: experience from western India. *Ann Hepatol* 2007;6:37-40.
44. Zois CD. Steatosis and steatohepatitis in postmortem material from Northwestern Greece. *World Journal of Gastroenterology* 2010;16:3944.
45. Caballeria L, Pera G, Auladell MA, Toran P, Munoz L, Miranda D, Aluma A, et al. Prevalence and factors associated with the presence of nonalcoholic fatty liver disease in an adult population in Spain. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010;22:24-32.
46. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology* 2005;42:44-52.
47. Amarapurkar D, Kamani P, Patel N, Gupte P, Kumar P, Agal S, Baijal R, et al. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease: population based study. *Ann Hepatol* 2007;6:161-163.
48. Williams CD, Stengel J, Asike MI, Torres DM, Shaw J, Contreras M, Landt CL, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology* 2011;140:124-131.
49. Lazo M, Hernaez R, Eberhardt MS, Bonekamp S, Kamel I, Guallar E, Koteish A, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the United States: the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Am J Epidemiol* 2013;178:38-45.
50. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 2004;40:1387-1395.
51. Das K, Das K, Mukherjee PS, Ghosh A, Ghosh S, Mridha AR, Dhibar T, et al. Nonobese population in a developing country has a high prevalence of nonalcoholic fatty liver and significant liver disease. *Hepatology* 2010;51:1593-1602.
52. Omagari K, Kadokawa Y, Masuda J, Egawa I, Sawa T, Hazama H, Ohba K, et al. Fatty liver in non-alcoholic non-overweight Japanese adults: incidence and clinical characteristics. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:1098-1105.
53. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 2016;64:73-84.
54. Fan JG, Zhu J, Li XJ, Chen L, Li L, Dai F, Li F, et al. Prevalence of and risk factors for fatty liver in a general population of Shanghai, China. *J Hepatol* 2005;43:508-514.

55. Lonardo A, Lombardini S, Scaglioni F, Ballestri S, Verrone AM, Bertolotti M, Carulli L, et al. Fatty liver, carotid disease and gallstones: a study of age-related associations. *World J Gastroenterol* 2006;12:5826-5833.
56. Wang Z, Xu M, Hu Z, Hultstrom M, Lai E. Sex-specific prevalence of fatty liver disease and associated metabolic factors in Wuhan, south central China. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2014;26:1015-1021.
57. Zelber-Sagi S, Nitzan-Kaluski D, Halpern Z, Oren R. Prevalence of primary non-alcoholic fatty liver disease in a population-based study and its association with biochemical and anthropometric measures. *Liver Int* 2006;26:856-863.
58. Chen CH, Huang MH, Yang JC, Nien CK, Yang CC, Yeh YH, Yueh SK. Prevalence and risk factors of nonalcoholic fatty liver disease in an adult population of taiwan: metabolic significance of nonalcoholic fatty liver disease in nonobese adults. *J Clin Gastroenterol* 2006;40:745-752.
59. Foster T, Anania FA, Li D, Katz R, Budoff M. The prevalence and clinical correlates of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in African Americans: the multiethnic study of atherosclerosis (MESA). *Dig Dis Sci* 2013;58:2392-2398.
60. Park SH, Jeon WK, Kim SH, Kim HJ, Park DI, Cho YK, Sung IK, et al. Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease among Korean adults. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21:138-143.
61. Wang Z, Xu M, Peng J, Jiang L, Hu Z, Wang H, Zhou S, et al. Prevalence and associated metabolic factors of fatty liver disease in the elderly. *Exp Gerontol* 2013;48:705-709.
62. Lonardo A, Nascimbeni F, Ballestri S, Fairweather D, Win S, Than TA, Abdelmalek MF, et al. Sex Differences in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: State of the Art and Identification of Research Gaps. *Hepatology* 2019;70:1457-1469.
63. Hagström H, Tynelius P, Rasmussen F. High BMI in late adolescence predicts future severe liver disease and hepatocellular carcinoma: a national, population-based cohort study in 1.2 million men. *Gut* 2018;67:1536-1542.
64. Schwimmer JB, Behling C, Newbury R, Deutsch R, Nievergelt C, Schork NJ, Lavine JE. Histopathology of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;42:641-649.
65. Schwimmer JB, Pardee PE, Lavine JE, Blumkin AK, Cook S. Cardiovascular risk factors and the metabolic syndrome in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Circulation* 2008;118:277-283.
66. Kelishadi R, Cook SR, Adibi A, Faghihimani Z, Ghatrehsamani S, Beihaghi A, Salehi H, et al. Association of the components of the metabolic syndrome with non-alcoholic fatty liver disease among normal-weight, overweight and obese children and adolescents. *Diabetol Metab Syndr* 2009;1:29.
67. Barshop NJ, Francis CS, Schwimmer JB, Lavine JE. Nonalcoholic fatty liver disease as a comorbidity of childhood obesity. *Ped Health* 2009;3:271-281.
68. Gokce S, Atbinici Z, Aycan Z, Cinar HG, Zorlu P. The relationship between pediatric nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk factors and increased risk of atherosclerosis in obese children. *Pediatr Cardiol* 2013;34:308-315.
69. Giorgio V, Prono F, Graziano F, Nobili V. Pediatric non alcoholic fatty liver disease: old and new concepts on development, progression, metabolic insight and potential treatment targets. *BMC Pediatr* 2013;13:40.
70. Alisi A, Feldstein AE, Villani A, Raponi M, Nobili V. Pediatric nonalcoholic fatty liver disease: a multidisciplinary approach. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012;9:152-161.
71. Fraser A, Longnecker MP, Lawlor DA. Prevalence of elevated alanine aminotransferase among US adolescents and associated factors: NHANES 1999-2004. *Gastroenterology* 2007;133:1814-1820.
72. Schwimmer JB, Deutsch R, Kahen T, Lavine JE, Stanley C, Behling C. Prevalence of fatty liver in children and adolescents. *Pediatrics* 2006;118:1388-1393.

73. Widhalm K, Ghods E. Nonalcoholic fatty liver disease: a challenge for pediatricians. *Int J Obes (Lond)* 2010;34:1451-1467.
74. Chan DF, Li AM, Chu WC, Chan MH, Wong EM, Liu EK, Chan IH, et al. Hepatic steatosis in obese Chinese children. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004;28:1257-1263.
75. Zhang X, Wu M, Liu Z, Yuan H, Wu X, Shi T, Chen X, et al. Increasing prevalence of NAFLD/NASH among children, adolescents and young adults from 1990 to 2017: a population-based observational study. *BMJ Open* 2021;11:e042843.
76. Paik JM, Kabbara K, Eberly KE, Younossi Y, Henry L, Younossi ZM. Global burden of NAFLD and chronic liver disease among adolescents and young adults. *Hepatology* 2021.
77. Ciardullo S, Monti T, Perseghin G. Prevalence of Liver Steatosis and Fibrosis Detected by Transient Elastography in Adolescents in the 2017-2018 National Health and Nutrition Examination Survey. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2021;19:384-390.e381.
78. Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2004;24:3-20.
79. Silverman JF, O'Brien KF, Long S, Leggett N, Khazanie PG, Pories WJ, Norris HT, et al. Liver pathology in morbidly obese patients with and without diabetes. *Am J Gastroenterol* 1990;85:1349-1355.
80. Silverman JF, Pories WJ, Caro JF. Liver pathology in diabetes mellitus and morbid obesity. Clinical, pathological, and biochemical considerations. *Pathol Annu* 1989;24 Pt 1:275-302.
81. Sugioka G, Porta EA, Hartroft WS. Early changes in livers of rats fed choline-deficient diets at four levels of protein. *Am J Pathol* 1969;57:431-455.
82. Cheung O, Sanyal AJ. Abnormalities of lipid metabolism in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis* 2008;28:351-359.
83. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998;114:842-845.
84. Koliwad SK, Streeper RS, Monetti M, Cornelissen I, Chan L, Terayama K, Naylor S, et al. DGAT1-dependent triacylglycerol storage by macrophages protects mice from diet-induced insulin resistance and inflammation. *The Journal of Clinical Investigation* 2010;120:756-767.
85. Yamaguchi K, Yang L, McCall S, Huang J, Yu XX, Pandey SK, Bhanot S, et al. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2007;45:1366-1374.
86. Choi SS, Diehl AM. Hepatic triglyceride synthesis and nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Lipidol* 2008;19:295-300.
87. Li ZZ, Berk M, McIntyre TM, Feldstein AE. Hepatic lipid partitioning and liver damage in nonalcoholic fatty liver disease: role of stearoyl-CoA desaturase. *J Biol Chem* 2009;284:5637-5644.
88. Paton CM, Ntambi JM. Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;297:E28-37.
89. Chalasani N, Wilson L, Kleiner DE, Cummings OW, Brunt EM, Unalp A. Relationship of steatosis grade and zonal location to histological features of steatohepatitis in adult patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2008;48:829-834.
90. Fabbrini E, Mohammed BS, Magkos F, Korenblat KM, Patterson BW, Klein S. Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2008;134:424-431.
91. Han S, Liang CP, Westerterp M, Senokuchi T, Welch CL, Wang Q, Matsumoto M, et al. Hepatic insulin signaling regulates VLDL secretion and atherogenesis in mice. *J Clin Invest* 2009;119:1029-1041.
92. Davenport JR, Yoder BK. An incredible decade for the primary cilium: a look at a once-forgotten organelle. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;289:F1159-1169.

93. Schwarz JM, Linfoot P, Dare D, Aghajanian K. Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets. *Am J Clin Nutr* 2003;77:43-50.
94. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2005;115:1343-1351.
95. Larter CZ, Yeh MM, Van Rooyen DM, Teoh NC, Brooling J, Hou JY, Williams J, et al. Roles of adipose restriction and metabolic factors in progression of steatosis to steatohepatitis in obese, diabetic mice. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24:1658-1668.
96. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *Journal of Clinical Investigation* 2004;114:147-152.
97. Ip E, Farrell GC, Robertson G, Hall P, Kirsch R, Leclercq I. Central role of PPARalpha-dependent hepatic lipid turnover in dietary steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2003;38:123-132.
98. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 2002;109:1125-1131.
99. Araya J, Rodrigo R, Videla LA, Thielemann L, Orellana M, Pettinelli P, Poniachik J. Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n - 6/n - 3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci (Lond)* 2004;106:635-643.
100. Shimomura I, Shimano H, Korn BS, Bashmakov Y, Horton JD. Nuclear sterol regulatory element-binding proteins activate genes responsible for the entire program of unsaturated fatty acid biosynthesis in transgenic mouse liver. *J Biol Chem* 1998;273:35299-35306.
101. Koo SH, Dutcher AK, Towle HC. Glucose and insulin function through two distinct transcription factors to stimulate expression of lipogenic enzyme genes in liver. *J Biol Chem* 2001;276:9437-9445.
102. Stoeckman AK, Towle HC. The role of SREBP-1c in nutritional regulation of lipogenic enzyme gene expression. *J Biol Chem* 2002;277:27029-27035.
103. Shimomura I, Bashmakov Y, Ikemoto S, Horton JD, Brown MS, Goldstein JL. Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:13656-13661.
104. Foretz M, Guichard C, Ferre P, Foufelle F. Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:12737-12742.
105. Shimomura I, Bashmakov Y, Horton JD. Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. *J Biol Chem* 1999;274:30028-30032.
106. Yahagi N, Shimano H, Hasty AH, Matsuzaka T, Ide T, Yoshikawa T, Amemiya-Kudo M, et al. Absence of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) ameliorates fatty livers but not obesity or insulin resistance in Lep(ob)/Lep(ob) mice. *J Biol Chem* 2002;277:19353-19357.
107. Horton JD, Shah NA, Warrington JA, Anderson NN, Park SW, Brown MS, Goldstein JL. Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:12027-12032.
108. McGarry JD, Mannaerts GP, Foster DW. A possible role for malonyl-CoA in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis. *J Clin Invest* 1977;60:265-270.
109. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 1994;79:1147-1156.
110. Edvardsson U, Bergstrom M, Alexandersson M, Bamberg K, Ljung B, Dahllof B. Rosiglitazone (BRL49653), a PPARgamma-selective agonist, causes peroxisome proliferator-like liver effects in obese mice. *J Lipid Res* 1999;40:1177-1184.

111. Chao L, Marcus-Samuels B, Mason MM, Moitra J, Vinson C, Arioglu E, Gavrilova O, et al. Adipose tissue is required for the antidiabetic, but not for the hypolipidemic, effect of thiazolidinediones. *J Clin Invest* 2000;106:1221-1228.
112. Hardie DG. Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology* 2003;144:5179-5183.
113. Argo CK, Northup PG, Al-Osaimi AM, Caldwell SH. Systematic review of risk factors for fibrosis progression in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2009;51:371-379.
114. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004;114:1752-1761.
115. Ruhl CE, Everhart JE. Trunk fat is associated with increased serum levels of alanine aminotransferase in the United States. *Gastroenterology* 2010;138:1346-1356.
116. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002;346:1221-1231.
117. Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 2006;43:S99-S112.
118. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001;120:1183-1192.
119. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1963;1:785-789.
120. Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, Slezak LA, et al. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest* 1999;103:253-259.
121. Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D, Goodyear LJ, et al. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 1999;48:1270-1274.
122. Cline GW, Petersen KF, Krssak M, Shen J, Hundal RS, Trajanoski Z, Inzucchi S, et al. Impaired glucose transport as a cause of decreased insulin-stimulated muscle glycogen synthesis in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 1999;341:240-246.
123. Kumashiro N, Erion DM, Zhang D, Kahn M, Beddow SA, Chu X, Still CD, et al. Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:16381-16385.
124. Magkos F, Su X, Bradley D, Fabbri E, Conte C, Eagon JC, Varela JE, et al. Intrahepatic diacylglycerol content is associated with hepatic insulin resistance in obese subjects. *Gastroenterology* 2012;142:1444-1446 e1442.
125. Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, Bergeron R, et al. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem* 2002;277:50230-50236.
126. Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, Shulman GI. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest* 1996;97:2859-2865.
127. Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Lehrke M, Hendler RE, Shulman GI. Reversal of nonalcoholic hepatic steatosis, hepatic insulin resistance, and hyperglycemia by moderate weight reduction in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2005;54:603-608.
128. Stanton MC, Chen SC, Jackson JV, Rojas-Triana A, Kinsley D, Cui L, Fine JS, et al. Inflammatory Signals shift from adipose to liver during high fat feeding and influence the development of steatohepatitis in mice. *J Inflamm (Lond)* 2011;8:8.
129. Lanthier N, Molendi-Coste O, Cani PD, van Rooijen N, Horsmans Y, Leclercq IA. Kupffer cell depletion prevents but has no therapeutic effect on metabolic and inflammatory changes induced by a high-fat diet. *FASEB J* 2011;25:4301-4311.

130. Li Z, Yang S, Lin H, Huang J, Watkins PA, Moser AB, Desimone C, et al. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2003;37:343-350.
131. Lin HZ, Yang SQ, Chuckaree C, Kuhajda F, Ronnet G, Diehl AM. Metformin reverses fatty liver disease in obese, leptin-deficient mice. *Nat Med* 2000;6:998-1003.
132. Clementi AH, Gaudy AM, van Rooijen N, Pierce RH, Mooney RA. Loss of Kupffer cells in diet-induced obesity is associated with increased hepatic steatosis, STAT3 signaling, and further decreases in insulin signaling. *Biochim Biophys Acta* 2009;1792:1062-1072.
133. Fan JG, Li F, Cai XB, Peng YD, Ao QH, Gao Y. Effects of nonalcoholic fatty liver disease on the development of metabolic disorders. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22:1086-1091.
134. Adams LA, Waters OR, Knuiman MW, Elliott RR, Olynyk JK. NAFLD as a risk factor for the development of diabetes and the metabolic syndrome: an eleven-year follow-up study. *Am J Gastroenterol* 2009;104:861-867.
135. Blüher M, Michael MD, Peroni OD, Ueki K, Carter N, Kahn BB, Kahn CR. Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. *Dev Cell* 2002;3:25-38.
136. Reddy JK, Rao MS. Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G852-858.
137. Koch L, Wunderlich FT, Seibler J, Konner AC, Hampel B, Irlenbusch S, Brabant G, et al. Central insulin action regulates peripheral glucose and fat metabolism in mice. *J Clin Invest* 2008;118:2132-2147.
138. Saito T, Misawa K, Kawata S. 1. Fatty liver and non-alcoholic steatohepatitis. *Intern Med* 2007;46:101-103.
139. Kotronen A, Juurinen L, Tiikkainen M, Vehkavaara S, Yki-Jarvinen H. Increased liver fat, impaired insulin clearance, and hepatic and adipose tissue insulin resistance in type 2 diabetes. *Gastroenterology* 2008;135:122-130.
140. Kotronen A, Vehkavaara S, Seppala-Lindroos A, Bergholm R, Yki-Jarvinen H. Effect of liver fat on insulin clearance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;293:E1709-1715.
141. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003;112:1821-1830.
142. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003;112:1796-1808.
143. Maher JJ, Leon P, Ryan JC. Beyond insulin resistance: Innate immunity in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2008;48:670-678.
144. Lorenzo M, Fernandez-Veledo S, Vila-Bedmar R, Garcia-Guerra L, De Alvaro C, Nieto-Vazquez I. Insulin resistance induced by tumor necrosis factor-alpha in myocytes and brown adipocytes. *J Anim Sci* 2008;86:E94-104.
145. Abiru S, Migita K, Maeda Y, Daikoku M, Ito M, Ohata K, Nagaoka S, et al. Serum cytokine and soluble cytokine receptor levels in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int* 2006;26:39-45.
146. Larter CZ, Farrell GC. Insulin resistance, adiponectin, cytokines in NASH: Which is the best target to treat? *J Hepatol* 2006;44:253-261.
147. Satapathy SK, Garg S, Chauhan R, Sakhuja P, Malhotra V, Sharma BC, Sarin SK. Beneficial effects of tumor necrosis factor-alpha inhibition by pentoxifylline on clinical, biochemical, and metabolic parameters of patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2004;99:1946-1952.
148. Adams LA, Zein CO, Angulo P, Lindor KD. A pilot trial of pentoxifylline in nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2004;99:2365-2368.

149. Park EJ, Lee JH, Yu GY, He G, Ali SR, Holzer RG, Osterreicher CH, et al. Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell* 2010;140:197-208.
150. Malhi H, Bronk SF, Werneburg NW, Gores GJ. Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis. *J Biol Chem* 2006;281:12093-12101.
151. Gao Z, Zhang X, Zuberi A, Hwang D, Quon MJ, Lefevre M, Ye J. Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 2004;18:2024-2034.
152. Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, Romanelli AJ, et al. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* 2004;279:32345-32353.
153. Samuel VT, Liu ZX, Wang A, Beddow SA, Geisler JG, Kahn M, Zhang XM, et al. Inhibition of protein kinase Cepsilon prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2007;117:739-745.
154. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, Shoelson SE. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* 2005;11:183-190.
155. Feldstein AE, Canbay A, Guicciardi ME, Higuchi H, Bronk SF, Gores GJ. Diet associated hepatic steatosis sensitizes to Fas mediated liver injury in mice. *J Hepatol* 2003;39:978-983.
156. Malhi H, Barreyro FJ, Isomoto H, Bronk SF, Gores GJ. Free fatty acids sensitise hepatocytes to TRAIL mediated cytotoxicity. *Gut* 2007;56:1124-1131.
157. Das UN. Biological significance of essential fatty acids. *J Assoc Physicians India* 2006;54:309-319.
158. Dentin R, Benhamed F, Pegorier JP, Fougere F, Viollet B, Vaulont S, Girard J, et al. Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. *J Clin Invest* 2005;115:2843-2854.
159. Feldstein AE, Lopez R, Tamimi TA, Yerian L, Chung YM, Berk M, Zhang R, et al. Mass spectrometric profiling of oxidized lipid products in human nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *J Lipid Res* 2010;51:3046-3054.
160. Cortez-Pinto H, Jesus L, Barros H, Lopes C, Moura MC, Camilo ME. How different is the dietary pattern in non-alcoholic steatohepatitis patients? *Clin Nutr* 2006;25:816-823.
161. Parker HM, Johnson NA, Burdon CA, Cohn JS, O'Connor HT, George J. Omega-3 supplementation and non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* 2012;56:944-951.
162. Neuschwander-Tetri BA. Nontriglyceride hepatic lipotoxicity: the new paradigm for the pathogenesis of NASH. *Curr Gastroenterol Rep* 2010;12:49-56.
163. Neuschwander-Tetri BA. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology* 2010;52:774-788.
164. Mari M, Caballero F, Colell A, Morales A, Caballeria J, Fernandez A, Enrich C, et al. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metab* 2006;4:185-198.
165. Puri P, Baillie RA, Wiest MM, Mirshahi F, Choudhury J, Cheung O, Sargeant C, et al. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2007;46:1081-1090.
166. Duncan RE, El-Sohemy A, Archer MC. Regulation of HMG-CoA reductase in MCF-7 cells by genistein, EPA, and DHA, alone and in combination with mevastatin. *Cancer Lett* 2005;224:221-228.
167. Caballero F, Fernandez A, De Lacy AM, Fernandez-Checa JC, Caballeria J, Garcia-Ruiz C. Enhanced free cholesterol, SREBP-2 and StAR expression in human NASH. *J Hepatol* 2009;50:789-796.

168. Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF, Rydzewski R, Burgart LJ, et al. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- $\alpha$  expression via a lysosomal pathway. *Hepatology* 2004;40:185-194.
169. Page KA, Chan O, Arora J, Belfort-Deaguiar R, Dzuira J, Roehmholdt B, Cline GW, et al. Effects of fructose vs glucose on regional cerebral blood flow in brain regions involved with appetite and reward pathways. *Jama* 2013;309:63-70.
170. Luo S, Monterosso JR, Sarpelleh K, Page KA. Differential effects of fructose versus glucose on brain and appetitive responses to food cues and decisions for food rewards. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112:6509-6514.
171. Tappy L, Le KA. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol Rev* 2010;90:23-46.
172. Abdelmalek MF, Lazo M, Horska A, Bonekamp S, Lipkin EW, Balasubramanyam A, Bantle JP, et al. Higher dietary fructose is associated with impaired hepatic adenosine triphosphate homeostasis in obese individuals with type 2 diabetes. *Hepatology* 2012;56:952-960.
173. Ackerman Z, Oron-Herman M, Grozovski M, Rosenthal T, Pappo O, Link G, Sela BA. Fructose-induced fatty liver disease: hepatic effects of blood pressure and plasma triglyceride reduction. *Hypertension* 2005;45:1012-1018.
174. Davail S, Rideau N, Bernadet MD, Andre JM, Guy G, Hoo-Paris R. Effects of dietary fructose on liver steatosis in overfed mule ducks. *Horm Metab Res* 2005;37:32-35.
175. Tappy L, Le KA. Does fructose consumption contribute to non-alcoholic fatty liver disease? *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2012;36:554-560.
176. Vos MB, Lavine JE. Dietary fructose in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2013;57:2525-2531.
177. Wei Y, Wang D, Pagliassotti MJ. Saturated fatty acid-mediated endoplasmic reticulum stress and apoptosis are augmented by trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid in liver cells. *Mol Cell Biochem* 2007;303:105-113.
178. Wei Y, Wang D, Topczewski F, Pagliassotti MJ. Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;291:E275-281.
179. Wang D, Wei Y, Pagliassotti MJ. Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis. *Endocrinology* 2006;147:943-951.
180. Puri P, Mirshahi F, Cheung O, Natarajan R, Maher JW, Kellum JM, Sanyal AJ. Activation and dysregulation of the unfolded protein response in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2008;134:568-576.
181. Farrell GC, van Rooyen D, Gan L, Chitturi S. NASH is an Inflammatory Disorder: Pathogenic, Prognostic and Therapeutic Implications. *Gut Liver* 2012;6:149-171.
182. Mari M, Fernandez-Checa JC. Sphingolipid signalling and liver diseases. *Liver Int* 2007;27:440-450.
183. Morales A, Lee H, Goni FM, Kolesnick R, Fernandez-Checa JC. Sphingolipids and cell death. *Apoptosis* 2007;12:923-939.
184. Caldwell SH, Redick JA, Chang CY, Davis CA, Argo CK, Al Osaimi KA. Enlarged hepatocytes in NAFLD examined with osmium fixation: does microsteatosis underlie cellular ballooning in NASH? *Am J Gastroenterol* 2006;101:1677-1678.
185. Ikura Y, Ohsawa M, Suekane T, Fukushima H, Itabe H, Jomura H, Nishiguchi S, et al. Localization of oxidized phosphatidylcholine in nonalcoholic fatty liver disease: impact on disease progression. *Hepatology* 2006;43:506-514.
186. Pan M, Cederbaum AI, Zhang YL, Ginsberg HN, Williams KJ, Fisher EA. Lipid peroxidation and oxidant stress regulate hepatic apolipoprotein B degradation and VLDL production. *J Clin Invest* 2004;113:1277-1287.

187. Robertson G, Leclercq I, Farrell GC. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G1135-1139.
188. Leonarduzzi G, Scavazza A, Biasi F, Chiarpotto E, Camandola S, Vogel S, Dargel R, et al. The lipid peroxidation end product 4-hydroxy-2,3-nonenal up-regulates transforming growth factor beta1 expression in the macrophage lineage: a link between oxidative injury and fibrosclerosis. *Faseb j* 1997;11:851-857.
189. Li Z, Berk M, McIntyre TM, Gores GJ, Feldstein AE. The lysosomal-mitochondrial axis in free fatty acid-induced hepatic lipotoxicity. *Hepatology* 2008;47:1495-1503.
190. Basaranoglu M, Basaranoglu G, Sentürk H. From fatty liver to fibrosis: A tale of "second hit". *World Journal of Gastroenterology : WJG* 2013;19:1158-1165.
191. Seki S, Kitada T, Yamada T, Sakaguchi H, Nakatani K, Wakasa K. In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases. *Journal of Hepatology*;37:56-62.
192. Bradbury MW, Berk PD. Lipid metabolism in hepatic steatosis. *Clinics in Liver Disease*;8:639-671.
193. Lieber CS. CYP2E1: from ASH to NASH. *Hepatology* 2004;28:1-11.
194. Anderson ER, Shah YM. Iron homeostasis in the liver. *Compr Physiol* 2013;3:315-330.
195. Guyader D, Jacquelinet C, Moirand R, Turlin B, Mendler MH, Chaperon J, David V, et al. Noninvasive prediction of fibrosis in C282Y homozygous hemochromatosis. *Gastroenterology* 1998;115:929-936.
196. Angelucci E, Brittenham GM, McLaren CE, Ripalti M, Baronciani D, Giardini C, Galimberti M, et al. Hepatic iron concentration and total body iron stores in thalassemia major. *N Engl J Med* 2000;343:327-331.
197. Fargion S, Dongiovanni P, Guzzo A, Colombo S, Valenti L, Fracanzani AL. Iron and insulin resistance. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;22 Suppl 2:61-63.
198. Rajpathak SN, Crandall JP, Wylie-Rosett J, Kabat GC, Rohan TE, Hu FB. The role of iron in type 2 diabetes in humans. *Biochim Biophys Acta* 2009;1790:671-681.
199. Mendler MH, Turlin B, Moirand R, Jouanolle AM, Sapey T, Guyader D, Le Gall JY, et al. Insulin resistance-associated hepatic iron overload. *Gastroenterology* 1999;117:1155-1163.
200. Valenti L, Swinkels DW, Burdick L, Dongiovanni P, Tjalsma H, Motta BM, Bertelli C, et al. Serum ferritin levels are associated with vascular damage in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2011;21:568-575.
201. Bugianesi E, Manzini P, D'Antico S, Vanni E, Longo F, Leone N, Massarenti P, et al. Relative contribution of iron burden, HFE mutations, and insulin resistance to fibrosis in nonalcoholic fatty liver. *Hepatology* 2004;39:179-187.
202. Ruhl CE, Everhart JE. Joint effects of body weight and alcohol on elevated serum alanine aminotransferase in the United States population. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005;3:1260-1268.
203. Barisani D, Pelucchi S, Mariani R, Galimberti S, Trombini P, Fumagalli D, Meneveri R, et al. Hcpidin and iron-related gene expression in subjects with Dysmetabolic Hepatic Iron Overload. *J Hepatol* 2008;49:123-133.
204. Turlin B, Mendler MH, Moirand R, Guyader D, Guillygomarc'h A, Deugnier Y. Histologic features of the liver in insulin resistance-associated iron overload. A study of 139 patients. *Am J Clin Pathol* 2001;116:263-270.
205. Dongiovanni P, Fracanzani AL, Fargion S, Valenti L. Iron in fatty liver and in the metabolic syndrome: a promising therapeutic target. *J Hepatol* 2011;55:920-932.
206. Isom HC, McDevitt EI, Moon MS. Elevated hepatic iron: a confounding factor in chronic hepatitis C. *Biochim Biophys Acta* 2009;1790:650-662.
207. Lundvall O, Weinfeld A, Lundin P. Iron stores in alcohol abusers. I. Liver iron. *Acta Med Scand* 1969;185:259-269.

208. Bozzini C, Girelli D, Olivieri O, Martinelli N, Bassi A, De Matteis G, Tenuti I, et al. Prevalence of body iron excess in the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2005;28:2061-2063.
209. Valenti L, Dongiovanni P, Fracanzani AL, Santorelli G, Fatta E, Bertelli C, Taioli E, et al. Increased susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease in heterozygotes for the mutation responsible for hereditary hemochromatosis. *Dig Liver Dis* 2003;35:172-178.
210. Powell LW. Normal human iron storage and its relation to ethanol consumption. *Australas Ann Med* 1966;15:110-115.
211. Kowdley KV, Belt P, Wilson LA, Yeh MM, Neuschwander-Tetri BA, Chalasani N, Sanyal AJ, et al. Serum ferritin is an independent predictor of histologic severity and advanced fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2012;55:77-85.
212. Pietrangelo A. Metals, oxidative stress, and hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 1996;16:13-30.
213. Sorrentino P, D'Angelo S, Ferbo U, Micheli P, Bracigliano A, Vecchione R. Liver iron excess in patients with hepatocellular carcinoma developed on non-alcoholic steato-hepatitis. *J Hepatol* 2009;50:351-357.
214. Stal P, Broome U, Scheynius A, Befrits R, Hultcrantz R. Kupffer cell iron overload induces intercellular adhesion molecule-1 expression on hepatocytes in genetic hemochromatosis. *Hepatology* 1995;21:1308-1316.
215. Fujita N, Miyachi H, Tanaka H, Takeo M, Nakagawa N, Kobayashi Y, Iwasa M, et al. Iron overload is associated with hepatic oxidative damage to DNA in nonalcoholic steatohepatitis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18:424-432.
216. Pietrangelo A. Iron in NASH, chronic liver diseases and HCC: how much iron is too much? *J Hepatol* 2009;50:249-251.
217. Pietrangelo A. Hemochromatosis gene modifies course of hepatitis C viral infection. *Gastroenterology* 2003;124:1509-1523.
218. Valenti L, Fracanzani AL, Bugianesi E, Dongiovanni P, Galmozzi E, Vanni E, Canavesi E, et al. HFE genotype, parenchymal iron accumulation, and liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2010;138:905-912.
219. Nelson JE, Wilson L, Brunt EM, Yeh MM, Kleiner DE, Unalp-Arida A, Kowdley KV. Relationship between the pattern of hepatic iron deposition and histological severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2011;53:448-457.
220. Deguti MM, Sipahi AM, Gayotto LC, Palacios SA, Bittencourt PL, Goldberg AC, Laudanna AA, et al. Lack of evidence for the pathogenic role of iron and HFE gene mutations in Brazilian patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Braz J Med Biol Res* 2003;36:739-745.
221. Nelson JE, Brunt EM, Kowdley KV. Lower serum hepcidin and greater parenchymal iron in nonalcoholic fatty liver disease patients with C282Y HFE mutations. *Hepatology* 2012;56:1730-1740.
222. Eigenbrodt ML, McCashland TM, Dy RM, Clark J, Galati J. Heterozygous alpha 1-antitrypsin phenotypes in patients with end stage liver disease. *Am J Gastroenterol* 1997;92:602-607.
223. Graziadei IW, Joseph JJ, Wiesner RH, Therneau TM, Batts KP, Porayko MK. Increased risk of chronic liver failure in adults with heterozygous alpha1-antitrypsin deficiency. *Hepatology* 1998;28:1058-1063.
224. Valenti L, Dongiovanni P, Piperno A, Fracanzani AL, Maggioni M, Rametta R, Loria P, et al. Alpha 1-antitrypsin mutations in NAFLD: high prevalence and association with altered iron metabolism but not with liver damage. *Hepatology* 2006;44:857-864.
225. Vecchi C, Montosi G, Zhang K, Lamberti I, Duncan SA, Kaufman RJ, Pietrangelo A. ER stress controls iron metabolism through induction of hepcidin. *Science* 2009;325:877-880.
226. Valenti L, Canavesi E, Galmozzi E, Dongiovanni P, Rametta R, Maggioni P, Maggioni M, et al. Beta-globin mutations are associated with parenchymal siderosis and fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2010;53:927-933.

227. Lapenna D, Pierdomenico SD, Ciofani G, Uchino S, Neri M, Giamberardino MA, Cuccurullo F. Association of body iron stores with low molecular weight iron and oxidant damage of human atherosclerotic plaques. *Free Radic Biol Med* 2007;42:492-498.
228. Sullivan JL. Macrophage iron, hepcidin, and atherosclerotic plaque stability. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007;232:1014-1020.
229. Salonen JT, Tuomainen TP, Salonen R, Lakka TA, Nyssonen K. Donation of blood is associated with reduced risk of myocardial infarction. The Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *Am J Epidemiol* 1998;148:445-451.
230. Zacharski LR, Chow BK, Howes PS, Shamayeva G, Baron JA, Dalman RL, Malenka DJ, et al. Reduction of iron stores and cardiovascular outcomes in patients with peripheral arterial disease: a randomized controlled trial. *JAMA* 2007;297:603-610.
231. Facchini FS, Hua NW, Stoohs RA. Effect of iron depletion in carbohydrate-intolerant patients with clinical evidence of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002;122:931-939.
232. Valenti L, Fracanzani AL, Fargion S. Effect of iron depletion in patients with nonalcoholic fatty liver disease without carbohydrate intolerance. *Gastroenterology* 2003;124:866; author reply 866-867.
233. Fernandez-Real JM, Lopez-Bermejo A, Ricart W. Iron stores, blood donation, and insulin sensitivity and secretion. *Clin Chem* 2005;51:1201-1205.
234. Piperno A, Vergani A, Salvioni A, Trombini P, Vigano M, Riva A, Zoppo A, et al. Effects of venesections and restricted diet in patients with the insulin-resistance hepatic iron overload syndrome. *Liver Int* 2004;24:471-476.
235. Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P, Bugianesi E, Marchesini G, Manzini P, Vanni E, et al. Iron depletion by phlebotomy improves insulin resistance in patients with nonalcoholic fatty liver disease and hyperferritinemia: evidence from a case-control study. *Am J Gastroenterol* 2007;102:1251-1258.
236. Freedland ES. Role of a critical visceral adipose tissue threshold (CVATT) in metabolic syndrome: implications for controlling dietary carbohydrates: a review. *Nutr Metab (Lond)* 2004;1:12.
237. Mirza MS. Obesity, Visceral Fat, and NAFLD: Querying the Role of Adipokines in the Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *ISRN Gastroenterol* 2011;2011:592404.
238. Bjorntorp P. Metabolic implications of body fat distribution. *Diabetes Care* 1991;14:1132-1143.
239. Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 2000;21:697-738.
240. Weston SR, Leyden W, Murphy R, Bass NM, Bell BP, Manos MM, Terrault NA. Racial and ethnic distribution of nonalcoholic fatty liver in persons with newly diagnosed chronic liver disease. *Hepatology* 2005;41:372-379.
241. Montague CT, Prins JB, Sanders L, Zhang J, Sewter CP, Digby J, Byrne CD, et al. Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes. *Diabetes* 1998;47:1384-1391.
242. Marin P, Andersson B, Ottosson M, Olbe L, Chowdhury B, Kvist H, Holm G, et al. The morphology and metabolism of intraabdominal adipose tissue in men. *Metabolism* 1992;41:1242-1248.
243. Wahrenberg H, Lonnqvist F, Arner P. Mechanisms underlying regional differences in lipolysis in human adipose tissue. *J Clin Invest* 1989;84:458-467.
244. Richelsen B, Pedersen SB, Moller-Pedersen T, Bak JF. Regional differences in triglyceride breakdown in human adipose tissue: effects of catecholamines, insulin, and prostaglandin E2. *Metabolism* 1991;40:990-996.
245. Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and

- subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 2004;145:2273-2282.
246. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2548-2556.
247. Kim JY, van de Wall E, Laplante M, Azzara A, Trujillo ME, Hofmann SM, Schraw T, et al. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J Clin Invest* 2007;117:2621-2637.
248. Tilg H, Hotamisligil GS. Nonalcoholic fatty liver disease: Cytokine-adipokine interplay and regulation of insulin resistance. *Gastroenterology* 2006;131:934-945.
249. Lihn AS, Bruun JM, He G, Pedersen SB, Jensen PF, Richelsen B. Lower expression of adiponectin mRNA in visceral adipose tissue in lean and obese subjects. *Mol Cell Endocrinol* 2004;219:9-15.
250. Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin? *Hepatology* 2004;40:46-54.
251. Procaccini C, Galgani M, De Rosa V, Carbone F, La Rocca C, Ranucci G, Iorio R, et al. Leptin: the prototypic adipocytokine and its role in NAFLD. *Curr Pharm Des* 2010;16:1902-1912.
252. Shimabukuro M, Koyama K, Chen G, Wang MY, Trieu F, Lee Y, Newgard CB, et al. Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:4637-4641.
253. Czaja MJ. Liver injury in the setting of steatosis: crosstalk between adipokine and cytokine. *Hepatology* 2004;40:19-22.
254. Janke J, Engeli S, Gorzelniak K, Luft FC, Sharma AM. Resistin gene expression in human adipocytes is not related to insulin resistance. *Obes Res* 2002;10:1-5.
255. Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest* 1995;95:2111-2119.
256. Sabio G, Das M, Mora A, Zhang Z, Jun JY, Ko HJ, Barrett T, et al. A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance. *Science* 2008;322:1539-1543.
257. Moschen AR, Molnar C, Geiger S, Graziadei I, Ebenbichler CF, Weiss H, Kaser S, et al. Anti-inflammatory effects of excessive weight loss: potent suppression of adipose interleukin 6 and tumour necrosis factor alpha expression. *Gut* 2010;59:1259-1264.
258. Miyake Y, Yamamoto K. Role of gut microbiota in liver diseases. *Hepatol Res* 2013;43:139-146.
259. Miura K, Seki E, Ohnishi H, Brenner DA. Role of toll-like receptors and their downstream molecules in the development of nonalcoholic Fatty liver disease. *Gastroenterol Res Pract* 2010;2010:362847.
260. Wree A, Broderick L, Canbay A, Hoffman HM, Feldstein AE. From NAFLD to NASH to cirrhosis-new insights into disease mechanisms. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013;10:627-636.
261. Miura K, Ohnishi H. Role of gut microbiota and Toll-like receptors in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2014;20:7381-7391.
262. Rivera CA, Adegboyega P, van Rooijen N, Tagalicud A, Allman M, Wallace M. Toll-like receptor-4 signaling and Kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2007;47:571-579.
263. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007;56:1761-1772.
264. Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, Prada PO, Hirabara SM, Schenka AA, Araujo EP, et al. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007;56:1986-1998.

265. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 2006;116:3015-3025.
266. Poggi M, Bastelica D, Gual P, Iglesias MA, Gremeaux T, Knauf C, Peiretti F, et al. C3H/HeJ mice carrying a toll-like receptor 4 mutation are protected against the development of insulin resistance in white adipose tissue in response to a high-fat diet. *Diabetologia* 2007;50:1267-1276.
267. Pussinen PJ, Havulinna AS, Lehto M, Sundvall J, Salomaa V. Endotoxemia is associated with an increased risk of incident diabetes. *Diabetes Care* 2011;34:392-397.
268. Harte AL, da Silva NF, Creely SJ, McGee KC, Billyard T, Youssef-Elabd EM, Tripathi G, et al. Elevated endotoxin levels in non-alcoholic fatty liver disease. *J Inflamm (Lond)* 2010;7:15.
269. Miura K, Kodama Y, Inokuchi S, Schnabl B, Aoyama T, Ohnishi H, Olefsky JM, et al. Toll-like receptor 9 promotes steatohepatitis by induction of interleukin-1beta in mice. *Gastroenterology* 2010;139:323-334 e327.
270. Gabele E, Dostert K, Hofmann C, Wiest R, Scholmerich J, Hellerbrand C, Obermeier F. DSS induced colitis increases portal LPS levels and enhances hepatic inflammation and fibrogenesis in experimental NASH. *J Hepatol* 2011;55:1391-1399.
271. Erridge C, Samani NJ. Saturated fatty acids do not directly stimulate Toll-like receptor signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:1944-1949.
272. Szabo G, Velayudham A, Romics L, Jr., Mandrekar P. Modulation of non-alcoholic steatohepatitis by pattern recognition receptors in mice: the role of toll-like receptors 2 and 4. *Alcohol Clin Exp Res* 2005;29:140S-145S.
273. Miura K, Yang L, van Rooijen N, Brenner DA, Ohnishi H, Seki E. Toll-like receptor 2 and palmitic acid cooperatively contribute to the development of nonalcoholic steatohepatitis through inflammasome activation in mice. *Hepatology* 2013;57:577-589.
274. Rivera CA, Gaskin L, Allman M, Pang J, Brady K, Adegboyega P, Pruitt K. Toll-like receptor-2 deficiency enhances non-alcoholic steatohepatitis. *BMC Gastroenterol* 2010;10:52.
275. Vijay-Kumar M, Sanders CJ, Taylor RT, Kumar A, Aitken JD, Sitaraman SV, Neish AS, et al. Deletion of TLR5 results in spontaneous colitis in mice. *J Clin Invest* 2007;117:3909-3921.
276. Vijay-Kumar M, Aitken JD, Carvalho FA, Cullender TC, Mwangi S, Srinivasan S, Sitaraman SV, et al. Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science* 2010;328:228-231.
277. Szabo G, Csak T. Inflammasomes in liver diseases. *J Hepatol* 2012;57:642-654.
278. Kamari Y, Shaish A, Vax E, Shemesh S, Kandel-Kfir M, Arbel Y, Olteanu S, et al. Lack of interleukin-1alpha or interleukin-1beta inhibits transformation of steatosis to steatohepatitis and liver fibrosis in hypercholesterolemic mice. *J Hepatol* 2011;55:1086-1094.
279. Henao-Mejia J, Elinav E, Jin C, Hao L, Mehal WZ, Strowig T, Thaiss CA, et al. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature* 2012;482:179-185.
280. Henao-Mejia J, Elinav E, Strowig T, Flavell RA. Inflammasomes: far beyond inflammation. *Nat Immunol* 2012;13:321-324.
281. Salles J, Tardif N, Landrier JF, Mothe-Satney I, Guillet C, Boue-Vaysse C, Combaret L, et al. TNFalpha gene knockout differentially affects lipid deposition in liver and skeletal muscle of high-fat-diet mice. *J Nutr Biochem* 2012;23:1685-1693.
282. Kremer M, Thomas E, Milton RJ, Perry AW, van Rooijen N, Wheeler MD, Zacks S, et al. Kupffer cell and interleukin-12-dependent loss of natural killer T cells in hepatosteatosis. *Hepatology* 2010;51:130-141.
283. Tajiri K, Shimizu Y, Tsuneyama K, Sugiyama T. Role of liver-infiltrating CD3+CD56+ natural killer T cells in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009;21:673-680.

284. Lichtman SN, Keku J, Schwab JH, Sartor RB. Hepatic injury associated with small bowel bacterial overgrowth in rats is prevented by metronidazole and tetracycline. *Gastroenterology* 1991;100:513-519.
285. Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:15718-15723.
286. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010;464:59-65.
287. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006;444:1027-1031.
288. Turnbaugh PJ, Gordon JI. The core gut microbiome, energy balance and obesity. *J Physiol* 2009;587:4153-4158.
289. Backhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:979-984.
290. Wigg AJ, Roberts-Thomson IC, Dymock RB, McCarthy PJ, Grose RH, Cummins AG. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2001;48:206-211.
291. Luther J, Garber JJ, Khalili H, Dave M, Bale SS, Jindal R, Motola DL, et al. Hepatic Injury in Nonalcoholic Steatohepatitis Contributes to Altered Intestinal Permeability. *CMGH Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 2015;1:222-232.e222.
292. Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 2005;307:1915-1920.
293. Mouzaki M, Comelli EM, Arendt BM, Bonengel J, Fung SK, Fischer SE, McGilvray ID, et al. Intestinal microbiota in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2013;58:120-127.
294. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 2006;444:1022-1023.
295. Jumpertz R, Le DS, Turnbaugh PJ, Trinidad C, Bogardus C, Gordon JI, Krakoff J. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. *Am J Clin Nutr* 2011;94:58-65.
296. Shen J, Obin MS, Zhao L. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Mol Aspects Med* 2013;34:39-58.
297. Ge H, Li X, Weiszmann J, Wang P, Baribault H, Chen JL, Tian H, et al. Activation of G protein-coupled receptor 43 in adipocytes leads to inhibition of lipolysis and suppression of plasma free fatty acids. *Endocrinology* 2008;149:4519-4526.
298. Neish AS. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* 2009;136:65-80.
299. Vance DE. Role of phosphatidylcholine biosynthesis in the regulation of lipoprotein homeostasis. *Curr Opin Lipidol* 2008;19:229-234.
300. Corbin KD, Zeisel SH. Choline metabolism provides novel insights into nonalcoholic fatty liver disease and its progression. *Curr Opin Gastroenterol* 2012;28:159-165.
301. Spencer MD, Hamp TJ, Reid RW, Fischer LM, Zeisel SH, Fodor AA. Association between composition of the human gastrointestinal microbiome and development of fatty liver with choline deficiency. *Gastroenterology* 2011;140:976-986.
302. Csak T, Velayudham A, Hritz I, Petrasek J, Levin I, Lippai D, Catalano D, et al. Deficiency in myeloid differentiation factor-2 and toll-like receptor 4 expression attenuates nonalcoholic

- steatohepatitis and fibrosis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011;300:G433-441.
303. Caricilli AM, Picardi PK, de Abreu LL, Ueno M, Prada PO, Ropelle ER, Hirabara SM, et al. Gut microbiota is a key modulator of insulin resistance in TLR 2 knockout mice. *PLoS Biol* 2011;9:e1001212.
304. Derrien M, Vaughan EE, Plugge CM, de Vos WM. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004;54:1469-1476.
305. Shin NR, Lee JC, Lee HY, Kim MS, Whon TW, Lee MS, Bae JW. An increase in the *Akkermansia* spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Gut* 2014;63:727-735.
306. Zhu L, Baker SS, Gill C, Liu W, Alkhouri R, Baker RD, Gill SR. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology* 2013;57:601-609.
307. Burcelin R, Garidou L, Pomie C. Immuno-microbiota cross and talk: the new paradigm of metabolic diseases. *Semin Immunol* 2012;24:67-74.
308. Brun P, Castagliuolo I, Di Leo V, Buda A, Pinzani M, Palu G, Martines D. Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;292:G518-525.
309. Ruan X, Shi H, Xia G, Xiao Y, Dong J, Ming F, Wang S. Encapsulated *Bifidobacteria* reduced bacterial translocation in rats following hemorrhagic shock and resuscitation. *Nutrition* 2007;23:754-761.
310. Fei N, Zhao L. An opportunistic pathogen isolated from the gut of an obese human causes obesity in germfree mice. *ISME J* 2013;7:880-884.
311. Muccioli GG, Naslain D, Backhed F, Reigstad CS, Lambert DM, Delzenne NM, Cani PD. The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. *Mol Syst Biol* 2010;6:392.
312. Dapito DH, Mencin A, Gwak GY, Pradere JP, Jang MK, Mederacke I, Caviglia JM, et al. Promotion of hepatocellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4. *Cancer Cell* 2012;21:504-516.
313. Yoshimoto S, Loo TM, Atarashi K, Kanda H, Sato S, Oyadomari S, Iwakura Y, et al. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature* 2013;499:97-101.
314. Shin HS, Park SY, Lee do K, Kim SA, An HM, Kim JR, Kim MJ, et al. Hypocholesterolemic effect of sonication-killed *Bifidobacterium longum* isolated from healthy adult Koreans in high cholesterol fed rats. *Arch Pharm Res* 2010;33:1425-1431.
315. Okubo H, Sakoda H, Kushiyama A, Fujishiro M, Nakatsu Y, Fukushima T, Matsunaga Y, et al. *Lactobacillus casei* strain Shirota protects against nonalcoholic steatohepatitis development in a rodent model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2013;305:G911-918.
316. Wagnerberger S, Spruss A, Kanuri G, Stahl C, Schroder M, Vetter W, Bischoff SC, et al. *Lactobacillus casei* Shirota protects from fructose-induced liver steatosis: a mouse model. *J Nutr Biochem* 2013;24:531-538.
317. Esposito E, Iacono A, Bianco G, Autore G, Cuzzocrea S, Vajro P, Canani RB, et al. Probiotics reduce the inflammatory response induced by a high-fat diet in the liver of young rats. *J Nutr* 2009;139:905-911.
318. Putaala H, Salusjarvi T, Nordstrom M, Saarinen M, Ouweland AC, Bech Hansen E, Rautonen N. Effect of four probiotic strains and *Escherichia coli* O157:H7 on tight junction integrity and cyclo-oxygenase expression. *Res Microbiol* 2008;159:692-698.
319. Donato KA, Gareau MG, Wang YJ, Sherman PM. *Lactobacillus rhamnosus* GG attenuates interferon- $\gamma$  and tumour necrosis factor- $\alpha$ -induced barrier dysfunction and pro-inflammatory signalling. *Microbiology* 2010;156:3288-3297.

320. Cesaro C, Tiso A, Del Prete A, Cariello R, Tuccillo C, Cotticelli G, Del Vecchio Blanco C, et al. Gut microbiota and probiotics in chronic liver diseases. *Dig Liver Dis* 2011;43:431-438.
321. Frazier TH, DiBaise JK, McClain CJ. Gut microbiota, intestinal permeability, obesity-induced inflammation, and liver injury. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2011;35:14S-20S.
322. Vajro P, Mandato C, Licenziati MR, Franzese A, Vitale DF, Lenta S, Caropreso M, et al. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in pediatric obesity-related liver disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2011;52:740-743.
323. Aller R, De Luis DA, Izaola O, Conde R, Gonzalez Sagrado M, Primo D, De La Fuente B, et al. Effect of a probiotic on liver aminotransferases in nonalcoholic fatty liver disease patients: a double blind randomized clinical trial. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2011;15:1090-1095.
324. Venkatraman A, Ramakrishna BS, Pulimood AB. Butyrate hastens restoration of barrier function after thermal and detergent injury to rat distal colon in vitro. *Scand J Gastroenterol* 1999;34:1087-1092.
325. Endo H, Nioka M, Kobayashi N, Tanaka M, Watanabe T. Butyrate-producing probiotics reduce nonalcoholic fatty liver disease progression in rats: new insight into the probiotics for the gut-liver axis. *PLoS One* 2013;8:e63388.
326. IOM (Institute of Medicine). 2011. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Washington, DC: The National Academies Press.
327. Henry HL. Regulation of vitamin D metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011;25:531-541.
328. Adams JS, Hewison M. Update in vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:471-478.
329. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007;357:266-281.
330. Bookout AL, Jeong Y, Downes M, Yu RT, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell* 2006;126:789-799.
331. DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 2004;80:1689s-1696s.
332. Nagpal S, Na S, Rathnachalam R. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocr Rev* 2005;26:662-687.
333. Van Belle TL, Gysemans C, Mathieu C. Vitamin D in autoimmune, infectious and allergic diseases: a vital player? *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011;25:617-632.
334. Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, Ochoa MT, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 2006;311:1770-1773.
335. Smolders J, Menheere P, Thewissen M, Peelen E, Tervaert JW, Hupperts R, Damoiseaux J. Regulatory T cell function correlates with serum 25-hydroxyvitamin D, but not with 1,25-dihydroxyvitamin D, parathyroid hormone and calcium levels in patients with relapsing remitting multiple sclerosis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010;121:243-246.
336. von Essen MR, Kongsbak M, Schjerling P, Olgaard K, Odum N, Geisler C. Vitamin D controls T cell antigen receptor signaling and activation of human T cells. *Nat Immunol* 2010;11:344-349.
337. De Haes P, Garmyn M, Degreef H, Vantieghem K, Bouillon R, Segaert S. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits ultraviolet B-induced apoptosis, Jun kinase activation, and interleukin-6 production in primary human keratinocytes. *J Cell Biochem* 2003;89:663-673.
338. Lappe JM, Travers-Gustafson D, Davies KM, Recker RR, Heaney RP. Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: results of a randomized trial. *Am J Clin Nutr* 2007;85:1586-1591.
339. Fisher L, Fisher A. Vitamin D and parathyroid hormone in outpatients with noncholestatic chronic liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007;5:513-520.

340. Zittermann A, Iodice S, Pilz S, Grant WB, Bagnardi V, Gandini S. Vitamin D deficiency and mortality risk in the general population: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Am J Clin Nutr* 2012;95:91-100.
341. Pilz S, Tomaschitz A, Marz W, Drechsler C, Ritz E, Zittermann A, Cavalier E, et al. Vitamin D, cardiovascular disease and mortality. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2011;75:575-584.
342. Campbell IT, Jarrett RJ, Rutland P, Stimmler L. The plasma insulin and growth hormone response to oral glucose: diurnal and seasonal observations in the Antarctic. *Diabetologia* 1975;11:147-150.
343. Campbell IT, Jarrett RJ, Keen H. Diurnal and seasonal variation in oral glucose tolerance: studies in the Antarctic. *Diabetologia* 1975;11:139-145.
344. Mitri J, Muraru MD, Pittas AG. Vitamin D and type 2 diabetes: a systematic review. *Eur J Clin Nutr* 2011;65:1005-1015.
345. Zeitz U, Weber K, Soegiarto DW, Wolf E, Balling R, Erben RG. Impaired insulin secretory capacity in mice lacking a functional vitamin D receptor. *Faseb j* 2003;17:509-511.
346. Maestro B, Davila N, Carranza MC, Calle C. Identification of a Vitamin D response element in the human insulin receptor gene promoter. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;84:223-230.
347. Li T, Owsley E, Matozel M, Hsu P, Novak CM, Chiang JY. Transgenic expression of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase in the liver prevents high-fat diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *Hepatology* 2010;52:678-690.
348. Pittas AG, Lau J, Hu FB, Dawson-Hughes B. The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:2017-2029.
349. Al-Daghri NM, Al-Attas OS, Alokail MS, Alkharfy KM, Al-Othman A, Draz HM, Yakout SM, et al. Hypovitaminosis D associations with adverse metabolic parameters are accentuated in patients with Type 2 diabetes mellitus: a body mass index-independent role of adiponectin? *J Endocrinol Invest* 2013;36:1-6.
350. Vaidya A, Williams JS, Forman JP. The independent association between 25-hydroxyvitamin D and adiponectin and its relation with BMI in two large cohorts: the NHS and the HPFS. *Obesity (Silver Spring)* 2012;20:186-191.
351. Engeli S, Schling P, Gorzelnik K, Boschmann M, Janke J, Ailhaud G, Teboul M, et al. The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome? *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:807-825.
352. Li YC, Kong J, Wei M, Chen ZF, Liu SQ, Cao LP. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest* 2002;110:229-238.
353. Cheng Q, Boucher BJ, Leung PS. Modulation of hypovitaminosis D-induced islet dysfunction and insulin resistance through direct suppression of the pancreatic islet renin-angiotensin system in mice. *Diabetologia* 2013;56:553-562.
354. Leung PS. The Potential Protective Action of Vitamin D in Hepatic Insulin Resistance and Pancreatic Islet Dysfunction in Type 2 Diabetes Mellitus. *Nutrients* 2016;8:147.
355. Chiu KC, Chu A, Go VL, Saad MF. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. *Am J Clin Nutr* 2004;79:820-825.
356. Ford ES, Ajani UA, McGuire LC, Liu S. Concentrations of serum vitamin D and the metabolic syndrome among U.S. adults. *Diabetes Care* 2005;28:1228-1230.
357. Kilkinen A, Knekt P, Aro A, Rissanen H, Marniemi J, Heliovaara M, Impivaara O, et al. Vitamin D status and the risk of cardiovascular disease death. *Am J Epidemiol* 2009;170:1032-1039.
358. Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, Jacques PF, Ingelsson E, Lanier K, Benjamin EJ, et al. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation* 2008;117:503-511.
359. Nagpal J, Pande JN, Bhartia A. A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of the short-term effect of vitamin D3 supplementation on insulin sensitivity in apparently healthy, middle-aged, centrally obese men. *Diabet Med* 2009;26:19-27.

360. von Hurst PR, Stonehouse W, Coad J. Vitamin D supplementation reduces insulin resistance in South Asian women living in New Zealand who are insulin resistant and vitamin D deficient - a randomised, placebo-controlled trial. *Br J Nutr* 2010;103:549-555.
361. Palomer X, Gonzalez-Clemente JM, Blanco-Vaca F, Mauricio D. Role of vitamin D in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab* 2008;10:185-197.
362. Petta S, Camma C, Scazzone C, Tripodo C, Di Marco V, Bono A, Cabibi D, et al. Low vitamin D serum level is related to severe fibrosis and low responsiveness to interferon-based therapy in genotype 1 chronic hepatitis C. *Hepatology* 2010;51:1158-1167.
363. Lange CM, Bojunga J, Ramos-Lopez E, von Wagner M, Hassler A, Vermehren J, Herrmann E, et al. Vitamin D deficiency and a CYP27B1-1260 promoter polymorphism are associated with chronic hepatitis C and poor response to interferon-alfa based therapy. *J Hepatol* 2011;54:887-893.
364. Barchetta I, Angelico F, Del Ben M, Baroni MG, Pozzilli P, Morini S, Cavallo MG. Strong association between non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and low 25(OH) vitamin D levels in an adult population with normal serum liver enzymes. *BMC Med* 2011;9:85.
365. Black LJ, Jacoby P, She Ping-Delfos WC, Mori TA, Beilin LJ, Olynyk JK, Ayonrinde OT, et al. Low serum 25-hydroxyvitamin D concentrations associate with non-alcoholic fatty liver disease in adolescents independent of adiposity. *J Gastroenterol Hepatol* 2014;29:1215-1222.
366. Eliades M, Spyrou E, Agrawal N, Lazo M, Brancati FL, Potter JJ, Koteish AA, et al. Meta-analysis: vitamin D and non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2013;38:246-254.
367. Wang X, Li W, Zhang Y, Yang Y, Qin G. Association between vitamin D and non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: results from a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* 2015;8:17221-17234.
368. Targher G, Bertolini L, Scala L, Cigolini M, Zenari L, Falezza G, Arcaro G. Associations between serum 25-hydroxyvitamin D3 concentrations and liver histology in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2007;17:517-524.
369. Potter JJ, Liu X, Koteish A, Mezey E. 1,25-dihydroxyvitamin D3 and its nuclear receptor repress human alpha1 (I) collagen expression and type I collagen formation. *Liver Int* 2013;33:677-686.
370. Bril F, Maximos M, Portillo-Sanchez P, Biernacki D, Lomonaco R, Subbarayan S, Correa M, et al. Relationship of vitamin D with insulin resistance and disease severity in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2015;62:405-411.
371. Anty R, Hastier A, Canivet CM, Patouraux S, Schneck AS, Ferrari-Panaia P, Ben-Amor I, et al. Severe Vitamin D Deficiency Is Not Associated with Liver Damage in Morbidly Obese Patients. *Obes Surg* 2016;26:2138-2143.
372. Patel YA, Henao R, Moylan CA, Guy CD, Piercy DL, Diehl AM, Abdelmalek MF. Vitamin D is Not Associated With Severity in NAFLD: Results of a Paired Clinical and Gene Expression Profile Analysis. *Am J Gastroenterol* 2016;111:1591-1598.
373. Nakano T, Cheng YF, Lai CY, Hsu LW, Chang YC, Deng JY, Huang YZ, et al. Impact of artificial sunlight therapy on the progress of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *J Hepatol* 2011;55:415-425.
374. Kwok RM, Torres DM, Harrison SA. Vitamin D and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): is it more than just an association? *Hepatology* 2013;58:1166-1174.
375. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, Murad MH, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:1911-1930.
376. Ratziu V, Bellentani S, Cortez-Pinto H, Day C, Marchesini G. A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. *J Hepatol* 2010;53:372-384.
377. Schwimmer JB, Celedon MA, Lavine JE, Salem R, Campbell N, Schork NJ, Shieh-morteza M, et al. Heritability of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2009;136:1585-1592.

378. Caldwell SH, Harris DM, Patrie JT, Hespeneide EE. Is NASH underdiagnosed among African Americans? *Am J Gastroenterol* 2002;97:1496-1500.
379. Browning JD, Kumar KS, Saboorian MH, Thiele DL. Ethnic differences in the prevalence of cryptogenic cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2004;99:292-298.
380. Amarapurkar DN, Hashimoto E, Lesmana LA, Sollano JD, Chen PJ, Goh KL. How common is non-alcoholic fatty liver disease in the Asia-Pacific region and are there local differences? *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22:788-793.
381. Wang WY, Barratt BJ, Clayton DG, Todd JA. Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns. *Nat Rev Genet* 2005;6:109-118.
382. Hirschhorn JN, Gajdos ZK. Genome-wide association studies: results from the first few years and potential implications for clinical medicine. *Annu Rev Med* 2011;62:11-24.
383. Anstee QM, Day CP. The genetics of NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013;10:645-655.
384. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, Boerwinkle E, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet* 2008;40:1461-1465.
385. Victor RG, Haley RW, Willett DL, Peshock RM, Vaeth PC, Leonard D, Basit M, et al. The Dallas Heart Study: a population-based probability sample for the multidisciplinary study of ethnic differences in cardiovascular health. *Am J Cardiol* 2004;93:1473-1480.
386. Speliotes EK, Yerges-Armstrong LM, Wu J, Hernaez R, Kim LJ, Palmer CD, Gudnason V, et al. Genome-wide association analysis identifies variants associated with nonalcoholic fatty liver disease that have distinct effects on metabolic traits. *PLoS Genet* 2011;7:e1001324.
387. Feitosa MF, Wojczynski MK, North KE, Zhang Q, Province MA, Carr JJ, Borecki IB. The ERLIN1-CHUK-CWF19L1 gene cluster influences liver fat deposition and hepatic inflammation in the NHLBI Family Heart Study. *Atherosclerosis* 2013;228:175-180.
388. Kollerits B, Coassin S, Kiechl S, Hunt SC, Paulweber B, Willeit J, Brandstatter A, et al. A common variant in the adiponutrin gene influences liver enzyme values. *J Med Genet* 2010;47:116-119.
389. Valenti L, Al-Serri A, Daly AK, Galmozzi E, Rametta R, Dongiovanni P, Nobili V, et al. Homozygosity for the patatin-like phospholipase-3/adiponutrin I148M polymorphism influences liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010;51:1209-1217.
390. Kotronen A, Johansson LE, Johansson LM, Roos C, Westerbacka J, Hamsten A, Bergholm R, et al. A common variant in PNPLA3, which encodes adiponutrin, is associated with liver fat content in humans. *Diabetologia* 2009;52:1056-1060.
391. Sookoian S, Castano GO, Burgueno AL, Gianotti TF, Rosselli MS, Pirola CJ. A nonsynonymous gene variant in the adiponutrin gene is associated with nonalcoholic fatty liver disease severity. *J Lipid Res* 2009;50:2111-2116.
392. Rotman Y, Koh C, Zmuda JM, Kleiner DE, Liang TJ. The association of genetic variability in patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3) with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010;52:894-903.
393. Valenti L, Alisi A, Galmozzi E, Bartuli A, Del Menico B, Alterio A, Dongiovanni P, et al. I148M patatin-like phospholipase domain-containing 3 gene variant and severity of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010;52:1274-1280.
394. Santoro N, Kursawe R, D'Adamo E, Dykas DJ, Zhang CK, Bale AE, Cali AM, et al. A common variant in the patatin-like phospholipase 3 gene (PNPLA3) is associated with fatty liver disease in obese children and adolescents. *Hepatology* 2010;52:1281-1290.
395. Liu YL, Patman GL, Leathart JB, Piguet AC, Burt AD, Dufour JF, Day CP, et al. Carriage of the PNPLA3 rs738409 C >G polymorphism confers an increased risk of non-alcoholic fatty liver disease associated hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2014;61:75-81.

396. Hassan MM, Kaseb A, Etzel CJ, El-Serag H, Spitz MR, Chang P, Hale KS, et al. Genetic variation in the PNPLA3 gene and hepatocellular carcinoma in USA: risk and prognosis prediction. *Mol Carcinog* 2013;52 Suppl 1:E139-147.
397. Kantartzis K, Peter A, Machicao F, Machann J, Wagner S, Konigsrainer I, Konigsrainer A, et al. Dissociation between fatty liver and insulin resistance in humans carrying a variant of the patatin-like phospholipase 3 gene. *Diabetes* 2009;58:2616-2623.
398. Speliotes EK, Butler JL, Palmer CD, Voight BF, Consortium G, Consortium MI, Nash CRN, et al. PNPLA3 variants specifically confer increased risk for histologic nonalcoholic fatty liver disease but not metabolic disease. *Hepatology* 2010;52:904-912.
399. Huang Y, He S, Li JZ, Seo YK, Osborne TF, Cohen JC, Hobbs HH. A feed-forward loop amplifies nutritional regulation of PNPLA3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:7892-7897.
400. Wilson PA, Gardner SD, Lambie NM, Commans SA, Crowther DJ. Characterization of the human patatin-like phospholipase family. *J Lipid Res* 2006;47:1940-1949.
401. Lake AC, Sun Y, Li JL, Kim JE, Johnson JW, Li D, Revett T, et al. Expression, regulation, and triglyceride hydrolase activity of Adiponutrin family members. *J Lipid Res* 2005;46:2477-2487.
402. Huang Y, Cohen JC, Hobbs HH. Expression and characterization of a PNPLA3 protein isoform (I148M) associated with nonalcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* 2011;286:37085-37093.
403. Pirazzi C, Adiels M, Burza MA, Mancina RM, Levin M, Stahlman M, Taskinen MR, et al. Patatin-like phospholipase domain-containing 3 (PNPLA3) I148M (rs738409) affects hepatic VLDL secretion in humans and in vitro. *J Hepatol* 2012;57:1276-1282.
404. Salameh H, Raff E, Erwin A, Seth D, Nischalke HD, Falletti E, Burza MA, et al. PNPLA3 Gene Polymorphism Is Associated With Predisposition to and Severity of Alcoholic Liver Disease. *Am J Gastroenterol* 2015;110:846-856.
405. Beer NL, Tribble ND, McCulloch LJ, Roos C, Johnson PR, Orho-Melander M, Gloyn AL. The P446L variant in GCKR associated with fasting plasma glucose and triglyceride levels exerts its effect through increased glucokinase activity in liver. *Hum Mol Genet* 2009;18:4081-4088.
406. Tan HL, Zain SM, Mohamed R, Rampal S, Chin KF, Basu RC, Cheah PL, et al. Association of glucokinase regulatory gene polymorphisms with risk and severity of non-alcoholic fatty liver disease: an interaction study with adiponutrin gene. *J Gastroenterol* 2014;49:1056-1064.
407. Palmer ND, Musani SK, Yerges-Armstrong LM, Feitosa MF, Bielak LF, Hernaez R, Kahali B, et al. Characterization of european ancestry nonalcoholic fatty liver disease-associated variants in individuals of african and hispanic descent. *Hepatology* 2013;58:966-975.
408. Dong H, Wang J, Li C, Hirose A, Nozaki Y, Takahashi M, Ono M, et al. The phosphatidylethanolamine N-methyltransferase gene V175M single nucleotide polymorphism confers the susceptibility to NASH in Japanese population. *J Hepatol* 2007;46:915-920.
409. Song J, da Costa KA, Fischer LM, Kohlmeier M, Kwock L, Wang S, Zeisel SH. Polymorphism of the PEMT gene and susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *FASEB J* 2005;19:1266-1271.
410. Musso G, Bo S, Cassader M, De Michieli F, Gambino R. Impact of sterol regulatory element-binding factor-1c polymorphism on incidence of nonalcoholic fatty liver disease and on the severity of liver disease and of glucose and lipid dysmetabolism. *Am J Clin Nutr* 2013;98:895-906.
411. Musso G, Cassader M, Bo S, De Michieli F, Gambino R. Sterol regulatory element-binding factor 2 (SREBF-2) predicts 7-year NAFLD incidence and severity of liver disease and lipoprotein and glucose dysmetabolism. *Diabetes* 2013;62:1109-1120.
412. Al-Serri A, Anstee QM, Valenti L, Nobili V, Leathart JB, Dongiovanni P, Patch J, et al. The SOD2 C47T polymorphism influences NAFLD fibrosis severity: evidence from case-control and intra-familial allele association studies. *J Hepatol* 2012;56:448-454.

413. Namikawa C, Shu-Ping Z, Vyselaar JR, Nozaki Y, Nemoto Y, Ono M, Akisawa N, et al. Polymorphisms of microsomal triglyceride transfer protein gene and manganese superoxide dismutase gene in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2004;40:781-786.
414. Miele L, Beale G, Patman G, Nobili V, Leathart J, Grieco A, Abate M, et al. The Kruppel-like factor 6 genotype is associated with fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2008;135:282-291 e281.
415. Yoneda M, Hotta K, Nozaki Y, Endo H, Uchiyama T, Mawatari H, Iida H, et al. Association between angiotensin II type 1 receptor polymorphisms and the occurrence of nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2009;29:1078-1085.
416. Zain SM, Mohamed Z, Mahadeva S, Rampal S, Basu RC, Cheah PL, Salim A, et al. Susceptibility and gene interaction study of the angiotensin II type 1 receptor (AGTR1) gene polymorphisms with non-alcoholic fatty liver disease in a multi-ethnic population. *PLoS One* 2013;8:e58538.
417. Yokohama S, Yoneda M, Haneda M, Okamoto S, Okada M, Aso K, Hasegawa T, et al. Therapeutic efficacy of an angiotensin II receptor antagonist in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2004;40:1222-1225.
418. Tokushige K, Hashimoto E, Noto H, Yatsuji S, Taniai M, Torii N, Shiratori K. Influence of adiponectin gene polymorphisms in Japanese patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* 2009;44:976-982.
419. Swellam M, Hamdy N. Association of nonalcoholic fatty liver disease with a single nucleotide polymorphism on the gene encoding leptin receptor. *IUBMB Life* 2012;64:180-186.
420. Zeybel M, Hardy T, Wong YK, Mathers JC, Fox CR, Gackowska A, Oakley F, et al. Multigenerational epigenetic adaptation of the hepatic wound-healing response. *Nat Med* 2012;18:1369-1377.
421. Rinella ME. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. *Jama* 2015;313:2263-2273.
422. David K, Kowdley KV, Unalp A, Kanwal F, Brunt EM, Schwimmer JB. Quality of life in adults with nonalcoholic fatty liver disease: baseline data from the nonalcoholic steatohepatitis clinical research network. *Hepatology* 2009;49:1904-1912.
423. Dan AA, Kallman JB, Wheeler A, Younoszai Z, Collantes R, Bondini S, Gerber L, et al. Health-related quality of life in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;26:815-820.
424. Bravo AA, Sheth SG, Chopra S. Liver biopsy. *N Engl J Med* 2001;344:495-500.
425. McGill DB, Rakela J, Zinsmeister AR, Ott BJ. A 21-year experience with major hemorrhage after percutaneous liver biopsy. *Gastroenterology* 1990;99:1396-1400.
426. Van Thiel DH, Gavaler JS, Wright H, Tzakis A. Liver biopsy. Its safety and complications as seen at a liver transplant center. *Transplantation* 1993;55:1087-1090.
427. Vuppalanchi R, Unalp A, Van Natta ML, Cummings OW, Sandrasegaran KE, Hameed T, Tonascia J, et al. Effects of liver biopsy sample length and number of readings on sampling variability in nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009;7:481-486.
428. Merriman RB, Ferrell LD, Patti MG, Weston SR, Pabst MS, Aouizerat BE, Bass NM. Correlation of paired liver biopsies in morbidly obese patients with suspected nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2006;44:874-880.
429. Fracanzani AL, Valenti L, Bugianesi E, Andreoletti M, Colli A, Vanni E, Bertelli C, et al. Risk of severe liver disease in nonalcoholic fatty liver disease with normal aminotransferase levels: a role for insulin resistance and diabetes. *Hepatology* 2008;48:792-798.
430. Mofrad P, Contos MJ, Haque M, Sargeant C, Fisher RA, Luketic VA, Sterling RK, et al. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. *Hepatology* 2003;37:1286-1292.

431. Amarapurkar DN, Patel ND. Clinical spectrum and natural history of non-alcoholic steatohepatitis with normal alanine aminotransferase values. *Trop Gastroenterol* 2004;25:130-134.
432. Maximos M, Bril F, Portillo Sanchez P, Lomonaco R, Orsak B, Biernacki D, Suman A, et al. The role of liver fat and insulin resistance as determinants of plasma aminotransferase elevation in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2015;61:153-160.
433. Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1999;30:1356-1362.
434. Haring R, Wallaschofski H, Nauck M, Dorr M, Baumeister SE, Volzke H. Ultrasonographic hepatic steatosis increases prediction of mortality risk from elevated serum gamma-glutamyl transpeptidase levels. *Hepatology* 2009;50:1403-1411.
435. Ghouri N, Preiss D, Sattar N. Liver enzymes, nonalcoholic fatty liver disease, and incident cardiovascular disease: a narrative review and clinical perspective of prospective data. *Hepatology* 2010;52:1156-1161.
436. Tahan V, Canbakan B, Balci H, Dane F, Akin H, Can G, Hatemi I, et al. Serum gamma-glutamyltranspeptidase distinguishes non-alcoholic fatty liver disease at high risk. *Hepatogastroenterology* 2008;55:1433-1438.
437. Saverymuttu SH, Joseph AE, Maxwell JD. Ultrasound scanning in the detection of hepatic fibrosis and steatosis. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1986;292:13-15.
438. Palmentieri B, de Sio I, La Mura V, Masarone M, Vecchione R, Bruno S, Torella R, et al. The role of bright liver echo pattern on ultrasound B-mode examination in the diagnosis of liver steatosis. *Dig Liver Dis* 2006;38:485-489.
439. Hamaguchi M, Kojima T, Itoh Y, Harano Y, Fujii K, Nakajima T, Kato T, et al. The severity of ultrasonographic findings in nonalcoholic fatty liver disease reflects the metabolic syndrome and visceral fat accumulation. *Am J Gastroenterol* 2007;102:2708-2715.
440. Strauss S, Gavish E, Gottlieb P, Katsnelson L. Interobserver and intraobserver variability in the sonographic assessment of fatty liver. *AJR Am J Roentgenol* 2007;189:W320-323.
441. Mottin CC, Moretto M, Padoin AV, Swarowsky AM, Toneto MG, Glock L, Repetto G. The role of ultrasound in the diagnosis of hepatic steatosis in morbidly obese patients. *Obes Surg* 2004;14:635-637.
442. Solhjoo E, Mansour-Ghanaei F, Moulaei-Langorudi R, Joukar F. Comparison of portal vein doppler indices and hepatic vein doppler waveform in patients with nonalcoholic fatty liver disease with healthy control. *Hepat Mon* 2011;11:740-744.
443. Mohammadinia AR, Bakhtavar K, Ebrahimi-Daryani N, Habibollahi P, Keramati MR, Fereshtehnejad SM, Abdollahzade S. Correlation of hepatic vein Doppler waveform and hepatic artery resistance index with the severity of nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Ultrasound* 2010;38:346-352.
444. Fierbinteanu-Braticевичi C, Dina I, Petrisor A, Tribus L, Negreanu L, Carstoiu C. Noninvasive investigations for non alcoholic fatty liver disease and liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2010;16:4784-4791.
445. Park SH, Kim PN, Kim KW, Lee SW, Yoon SE, Park SW, Ha HK, et al. Macrovesicular hepatic steatosis in living liver donors: use of CT for quantitative and qualitative assessment. *Radiology* 2006;239:105-112.
446. Fishbein M, Castro F, Cheruku S, Jain S, Webb B, Gleason T, Stevens WR. Hepatic MRI for fat quantitation: its relationship to fat morphology, diagnosis, and ultrasound. *J Clin Gastroenterol* 2005;39:619-625.
447. McPherson S, Jonsson JR, Cowin GJ, O'Rourke P, Clouston AD, Volp A, Horsfall L, et al. Magnetic resonance imaging and spectroscopy accurately estimate the severity of steatosis provided the stage of fibrosis is considered. *J Hepatol* 2009;51:389-397.
448. Boursier J, Cales P. Controlled attenuation parameter (CAP): a new device for fast evaluation of liver fat? *Liver Int* 2012;32:875-877.

449. Sasso M, Beaugrand M, de Ledinghen V, Douvin C, Marcellin P, Poupon R, Sandrin L, et al. Controlled attenuation parameter (CAP): a novel VCTE guided ultrasonic attenuation measurement for the evaluation of hepatic steatosis: preliminary study and validation in a cohort of patients with chronic liver disease from various causes. *Ultrasound Med Biol* 2010;36:1825-1835.
450. Carvalhana S, Leitao J, Alves AC, Bourbon M, Cortez-Pinto H. How good is controlled attenuation parameter and fatty liver index for assessing liver steatosis in general population: correlation with ultrasound. *Liver Int* 2014;34:e111-117.
451. Poynard T, Ratzu V, Naveau S, Thabut D, Charlotte F, Messous D, Capron D, et al. The diagnostic value of biomarkers (SteatoTest) for the prediction of liver steatosis. *Comp Hepatol* 2005;4:10.
452. Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, Masutti F, Passalacqua M, Castiglione A, Tiribelli C. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol* 2006;6:33.
453. Calori G, Lattuada G, Ragogna F, Garancini MP, Crosignani P, Villa M, Bosi E, et al. Fatty liver index and mortality: the Cremona study in the 15th year of follow-up. *Hepatology* 2011;54:145-152.
454. Kotronen A, Peltonen M, Hakkarainen A, Sevastianova K, Bergholm R, Johansson LM, Lundbom N, et al. Prediction of non-alcoholic fatty liver disease and liver fat using metabolic and genetic factors. *Gastroenterology* 2009;137:865-872.
455. Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Predictors of Nonalcoholic Steatohepatitis and Liver Fibrosis in the Severely Obese. *Gastroenterology* 2001;121:91-100.
456. Poynard T, Ratzu V, Charlotte F, Messous D, Munteanu M, Imbert-Bismut F, Massard J, et al. Diagnostic value of biochemical markers (NashTest) for the prediction of non alcoholic steato hepatitis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol* 2006;6:34.
457. Younossi ZM, Jarrar M, Nugent C, Randhawa M, Afendy M, Stepanova M, Rafiq N, et al. A novel diagnostic biomarker panel for obesity-related nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Obes Surg* 2008;18:1430-1437.
458. Younossi ZM, Page S, Rafiq N, Birerdinc A, Stepanova M, Hossain N, Afendy A, et al. A biomarker panel for non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and NASH-related fibrosis. *Obes Surg* 2011;21:431-439.
459. Anty R, Iannelli A, Patouraux S, Bonnafous S, Lavallard VJ, Senni-Buratti M, Amor IB, et al. A new composite model including metabolic syndrome, alanine aminotransferase and cytokeratin-18 for the diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2010;32:1315-1322.
460. Tamimi TI, Elgouhari HM, Alkhoury N, Yerian LM, Berk MP, Lopez R, Schauer PR, et al. An apoptosis panel for nonalcoholic steatohepatitis diagnosis. *J Hepatol* 2011;54:1224-1229.
461. Bugianesi E, Pagotto U, Manini R, Vanni E, Gastaldelli A, de lasio R, Gentilcore E, et al. Plasma adiponectin in nonalcoholic fatty liver is related to hepatic insulin resistance and hepatic fat content, not to liver disease severity. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:3498-3504.
462. Jarrar MH, Baranova A, Collantes R, Ranard B, Stepanova M, Bennett C, Fang Y, et al. Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;27:412-421.
463. Haukeland JW, Damas JK, Konopski Z, Loberg EM, Haaland T, Goverud I, Torjesen PA, et al. Systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2. *J Hepatol* 2006;44:1167-1174.
464. Musso G, Gambino R, Cassader M, Pagano G. Meta-analysis: natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. *Ann Med* 2011;43:617-649.

465. Yilmaz Y, Dolar E, Ulukaya E, Akgoz S, Keskin M, Kiyici M, Aker S, et al. Soluble forms of extracellular cytokeratin 18 may differentiate simple steatosis from nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 2007;13:837-844.
466. Iijima H, Moriyasu F, Tsuchiya K, Suzuki S, Yoshida M, Shimizu M, Sasaki S, et al. Decrease in accumulation of ultrasound contrast microbubbles in non-alcoholic steatohepatitis. *Hepato Res* 2007;37:722-730.
467. Ballestri S, Lonardo A, Romagnoli D, Carulli L, Losi L, Day CP, Loria P. Ultrasonographic fatty liver indicator, a novel score which rules out NASH and is correlated with metabolic parameters in NAFLD. *Liver Int* 2012;32:1242-1252.
468. Suzuki K, Kirikoshi H, Yoneda M, Mawatari H, Fujita K, Nozaki Y, Takahashi H, et al. Measurement of spleen volume is useful for distinguishing between simple steatosis and early-stage non-alcoholic steatohepatitis. *Hepato Res* 2010;40:693-700.
469. Park GJ, Wiseman E, George J, Katelaris PH, Seow F, Fung C, Ngu MC. Non-invasive estimation of liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease using the 13 C-caffeine breath test. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26:1411-1416.
470. Suzuki A, Angulo P, Lymp J, Li D, Satomura S, Lindor K. Hyaluronic acid, an accurate serum marker for severe hepatic fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2005;25:779-786.
471. Sakugawa H, Nakayoshi T, Kobashigawa K, Yamashiro T, Maeshiro T, Miyagi S, Shiroma J, et al. Clinical usefulness of biochemical markers of liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2005;11:255-259.
472. Angulo P, Hui JM, Marchesini G, Bugianesi E, George J, Farrell GC, Enders F, et al. The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology* 2007;45:846-854.
473. McPherson S, Stewart SF, Henderson E, Burt AD, Day CP. Simple non-invasive fibrosis scoring systems can reliably exclude advanced fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* 2010;59:1265-1269.
474. Ratziu V, Giral P, Charlotte F, Bruckert E, Thibault V, Theodorou I, Khalil L, et al. Liver fibrosis in overweight patients. *Gastroenterology* 2000;118:1117-1123.
475. Harrison SA, Oliver D, Arnold HL, Gogia S, Neuschwander-Tetri BA. Development and validation of a simple NAFLD clinical scoring system for identifying patients without advanced disease. *Gut* 2008;57:1441-1447.
476. Rosenberg WMC, Voelker M, Thiel R, Becka M, Burt A, Schuppan D, Hubscher S, et al. Serum markers detect the presence of liver fibrosis: A cohort study. *Gastroenterology* 2004;127:1704-1713.
477. Ratziu V, Massard J, Charlotte F, Messous D, Imbert-Bismut F, Bonyhay L, Tahiri M, et al. Diagnostic value of biochemical markers (FibroTest-FibroSURE) for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol* 2006;6:6.
478. Cales P, Laine F, Boursier J, Deugnier Y, Moal V, Oberti F, Hunault G, et al. Comparison of blood tests for liver fibrosis specific or not to NAFLD. *J Hepatol* 2009;50:165-173.
479. Barr J, Vazquez-Chantada M, Alonso C, Perez-Cormenzana M, Mayo R, Galan A, Caballeria J, et al. Liquid chromatography-mass spectrometry-based parallel metabolic profiling of human and mouse model serum reveals putative biomarkers associated with the progression of nonalcoholic fatty liver disease. *J Proteome Res* 2010;9:4501-4512.
480. Barr J, Caballeria J, Martinez-Arranz I, Dominguez-Diez A, Alonso C, Muntane J, Perez-Cormenzana M, et al. Obesity-dependent metabolic signatures associated with nonalcoholic fatty liver disease progression. *J Proteome Res* 2012;11:2521-2532.
481. Ebinuma H, Saito H, Komuta M, Ojio K, Wakabayashi K, Usui S, Chu PS, et al. Evaluation of liver fibrosis by transient elastography using acoustic radiation force impulse: comparison with Fibroscan((R)). *J Gastroenterol* 2011;46:1238-1248.

482. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988;37:1595-1607.
483. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 2009;120:1640-1645.
484. Reaven GM. The metabolic syndrome: is this diagnosis necessary? *Am J Clin Nutr* 2006;83:1237-1247.
485. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998;15:539-553.
486. Grundy SM, Hansen B, Smith SC, Jr., Cleeman JI, Kahn RA. Clinical management of metabolic syndrome: report of the American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute/American Diabetes Association conference on scientific issues related to management. *Circulation* 2004;109:551-556.
487. Alberti KGMM, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome—a new worldwide definition. *The Lancet* 2005;366:1059-1062.
488. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 2005;112:2735-2752.
489. Byrne CD. Dorothy Hodgkin Lecture 2012: non-alcoholic fatty liver disease, insulin resistance and ectopic fat: a new problem in diabetes management. *Diabet Med* 2012;29:1098-1107.
490. Byrne CD, Targher G. Ectopic fat, insulin resistance, and nonalcoholic fatty liver disease: implications for cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014;34:1155-1161.
491. Anstee QM, Targher G, Day CP. Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013;10:330-344.
492. Lonardo A, Ballestri S, Marchesini G, Angulo P, Loria P. Nonalcoholic fatty liver disease: a precursor of the metabolic syndrome. *Dig Liver Dis* 2015;47:181-190.
493. Argo CK, Caldwell SH. Epidemiology and natural history of non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis* 2009;13:511-531.
494. Lonardo A, Bellini M, Tartoni P, Tondelli E. The bright liver syndrome. Prevalence and determinants of a "bright" liver echopattern. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1997;29:351-356.
495. Hou XH, Zhu YX, Lu HJ, Chen HF, Li Q, Jiang S, Xiang KS, et al. Non-alcoholic fatty liver disease's prevalence and impact on alanine aminotransferase associated with metabolic syndrome in the Chinese. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26:722-730.
496. Mannisto VT, Simonen M, Soininen P, Tiainen M, Kangas AJ, Kaminska D, Venesmaa S, et al. Lipoprotein subclass metabolism in nonalcoholic steatohepatitis. *J Lipid Res* 2014;55:2676-2684.
497. Machado M, Marques-Vidal P, Cortez-Pinto H. Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery. *J Hepatol* 2006;45:600-606.
498. Zelber-Sagi S, Lotan R, Shlomai A, Webb M, Harrari G, Buch A, Nitzan Kaluski D, et al. Predictors for incidence and remission of NAFLD in the general population during a seven-year prospective follow-up. *J Hepatol* 2012;56:1145-1151.
499. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 2003;348:1625-1638.

500. Singh S, Allen AM, Wang Z, Prokop LJ, Murad MH, Loomba R. Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver vs nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2015;13:643-654.e641-649; quiz e639-640.
501. van der Poorten D, Samer CF, Ramezani-Moghadam M, Coulter S, Kacevska M, Schrijnders D, Wu LE, et al. Hepatic fat loss in advanced nonalcoholic steatohepatitis: are alterations in serum adiponectin the cause? *Hepatology* 2013;57:2180-2188.
502. Ulucan S, Katlandur H, Kaya Z. Epicardial fat and liver disease; the contribution of cardio autonomic nervous system function. *J Hepatol* 2015;62:1214.
503. Pagadala MR, McCullough AJ. Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: not all about body mass index. *Am J Gastroenterol* 2012;107:1859-1861.
504. Messier V, Karelis AD, Robillard ME, Bellefeuille P, Brochu M, Lavoie JM, Rabasa-Lhoret R. Metabolically healthy but obese individuals: relationship with hepatic enzymes. *Metabolism* 2010;59:20-24.
505. Sung KC, Wild SH, Byrne CD. Development of new fatty liver, or resolution of existing fatty liver, over five years of follow-up, and risk of incident hypertension. *J Hepatol* 2014;60:1040-1045.
506. Targher G, Byrne CD. Clinical Review: Nonalcoholic fatty liver disease: a novel cardiometabolic risk factor for type 2 diabetes and its complications. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:483-495.
507. Kotronen A, Juurinen L, Hakkarainen A, Westerbacka J, Corner A, Bergholm R, Yki-Jarvinen H. Liver fat is increased in type 2 diabetic patients and underestimated by serum alanine aminotransferase compared with equally obese nondiabetic subjects. *Diabetes Care* 2008;31:165-169.
508. Portillo-Sanchez P, Bril F, Maximos M, Lomonaco R, Biernacki D, Orsak B, Subbarayan S, et al. High Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Normal Plasma Aminotransferase Levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100:2231-2238.
509. Ryysy L, Hakkinen AM, Goto T, Vehkavaara S, Westerbacka J, Halavaara J, Yki-Jarvinen H. Hepatic fat content and insulin action on free fatty acids and glucose metabolism rather than insulin absorption are associated with insulin requirements during insulin therapy in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2000;49:749-758.
510. Michelotti GA, Machado MV, Diehl AM. NAFLD, NASH and liver cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013;10:656-665.
511. Zoppini G, Fedeli U, Gennaro N, Saugo M, Targher G, Bonora E. Mortality from chronic liver diseases in diabetes. *Am J Gastroenterol* 2014;109:1020-1025.
512. Adams LA, Harmsen S, St Sauver JL, Charatcharoenwitthaya P, Enders FB, Therneau T, Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease increases risk of death among patients with diabetes: a community-based cohort study. *Am J Gastroenterol* 2010;105:1567-1573.
513. Targher G, Bertolini L, Rodella S, Tessari R, Zenari L, Lippi G, Arcaro G. Nonalcoholic fatty liver disease is independently associated with an increased incidence of cardiovascular events in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2007;30:2119-2121.
514. Targher G, Day CP, Bonora E. Risk of cardiovascular disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2010;363:1341-1350.
515. Afzali A, Weiss NS, Boyko EJ, Ioannou GN. Association between serum uric acid level and chronic liver disease in the United States. *Hepatology* 2010;52:578-589.
516. Lonardo A, Loria P, Leonardi F, Borsatti A, Neri P, Pulvirenti M, Verrone AM, et al. Fasting insulin and uric acid levels but not indices of iron metabolism are independent predictors of non-alcoholic fatty liver disease. A case-control study. *Dig Liver Dis* 2002;34:204-211.

517. Kuo CF, Yu KH, Luo SF, Chiu CT, Ko YS, Hwang JS, Tseng WY, et al. Gout and risk of non-alcoholic fatty liver disease. *Scand J Rheumatol* 2010;39:466-471.
518. Kovalic AJ, Satapathy SK. The Role of Nonalcoholic Fatty Liver Disease on Cardiovascular Manifestations and Outcomes. *Clin Liver Dis* 2018;22:141-174.
519. Henson JB, Simon TG, Kaplan A, Osganian S, Masia R, Corey KE. Advanced fibrosis is associated with incident cardiovascular disease in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2020;51:728-736.
520. Tamaki N, Higuchi M, Kurosaki M, Loomba R, Izumi N. Risk Difference of Liver-Related and Cardiovascular Events by Liver Fibrosis Status in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2022;20:1171-1173.e1172.
521. Mantovani A, Petracca G, Csermely A, Beatrice G, Bonapace S, Rossi A, Tilg H, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of new-onset heart failure: an updated meta-analysis of about 11 million individuals. *Gut* 2022.
522. Soderberg C, Stal P, Askling J, Glaumann H, Lindberg G, Marmur J, Hultcrantz R. Decreased survival of subjects with elevated liver function tests during a 28-year follow-up. *Hepatology* 2010;51:595-602.
523. Duell PB, Welty FK, Miller M, Chait A, Hammond G, Ahmad Z, Cohen DE, et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Cardiovascular Risk: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2022;42:e168-e185.
524. Byrne CD, Targher G. NAFLD as a driver of chronic kidney disease. *J Hepatol* 2020;72:785-801.
525. Ciardullo S, Ballabeni C, Trevisan R, Perseghin G. Liver Stiffness, Albuminuria and Chronic Kidney Disease in Patients with NAFLD: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomolecules* 2022;12.
526. Mantovani A, Petracca G, Beatrice G, Csermely A, Lonardo A, Schattenberg JM, Tilg H, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident chronic kidney disease: an updated meta-analysis. *Gut* 2022;71:156-162.
527. Jeong S, Oh YH, Choi S, Chang J, Kim SM, Son JS, Lee G, et al. Association of non-alcoholic fatty liver disease with incident dementia later in life among elder adults. *Clin Mol Hepatol* 2022;28:510-521.
528. Shang Y, Widman L, Hagström H. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Risk of Dementia: A Population-Based Cohort Study. *Neurology* 2022.
529. Forbes S, Taylor-Robinson SD, Patel N, Allan P, Walker BR, Johnston DG. Increased prevalence of non-alcoholic fatty liver disease in European women with a history of gestational diabetes. *Diabetologia* 2011;54:641-647.
530. Prikoszovich T, Winzer C, Schmid AI, Szendroedi J, Chmelik M, Pacini G, Krssak M, et al. Body and liver fat mass rather than muscle mitochondrial function determine glucose metabolism in women with a history of gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2011;34:430-436.
531. Bozkurt L, Gobl CS, Tura A, Chmelik M, Prikoszovich T, Kosi L, Wagner O, et al. Fatty liver index predicts further metabolic deteriorations in women with previous gestational diabetes. *PLoS One* 2012;7:e32710.
532. Ajmera VH, Gunderson EP, VanWagner LB, Lewis CE, Carr JJ, Terrault NA. Gestational Diabetes Mellitus Is Strongly Associated With Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Am J Gastroenterol* 2016;111:658-664.
533. De Souza LR, Berger H, Retnakaran R, Vlachou PA, Maguire JL, Nathens AB, Connelly PW, et al. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Early Pregnancy Predicts Dysglycemia in Mid-Pregnancy: Prospective Study. *Am J Gastroenterol* 2016;111:665-670.
534. Farrell G, Schattenberg JM, Leclercq I, Yeh MM, Goldin R, Teoh N, Schuppan D. Mouse Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: Toward Optimization of Their Relevance to Human Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology* 2019;69:2241-2257.

535. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2016;64:1388-1402.
536. Fildes A, Charlton J, Rudisill C, Littlejohns P, Prevost AT, Gulliford MC. Probability of an Obese Person Attaining Normal Body Weight: Cohort Study Using Electronic Health Records. *Am J Public Health* 2015;105:e54-59.
537. Promrat K, Kleiner DE, Niemeier HM, Jackvony E, Kearns M, Wands JR, Fava JL, et al. Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2010;51:121-129.
538. Thoma C, Day CP, Trenell MI. Lifestyle interventions for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease in adults: a systematic review. *J Hepatol* 2012;56:255-266.
539. Thomas EL, Brynes AE, Hamilton G, Patel N, Spong A, Goldin RD, Frost G, et al. Effect of nutritional counselling on hepatic, muscle and adipose tissue fat content and distribution in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2006;12:5813-5819.
540. de Luis DA, Aller R, Izaola O, Sagrado MG, Conde R, Gonzalez JM. Effect of a hypocaloric diet in transaminases in nonalcoholic fatty liver disease and obese patients, relation with insulin resistance. *Diabetes Res Clin Pract* 2008;79:74-78.
541. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, Charlton M, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology* 2012;55:2005-2023.
542. Vilar-Gomez E, Martinez-Perez Y, Calzadilla-Bertot L, Torres-Gonzalez A, Gra-Oramas B, Gonzalez-Fabian L, Friedman SL, et al. Weight Loss Through Lifestyle Modification Significantly Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* 2015;149:367-378.e365.
543. Keating SE, Hackett DA, Parker HM, O'Connor HT, Gerofi JA, Sainsbury A, Baker MK, et al. Effect of aerobic exercise training dose on liver fat and visceral adiposity. *J Hepatol* 2015;63:174-182.
544. Johnson NA, Sachinwalla T, Walton DW, Smith K, Armstrong A, Thompson MW, George J. Aerobic exercise training reduces hepatic and visceral lipids in obese individuals without weight loss. *Hepatology* 2009;50:1105-1112.
545. Sullivan S, Kirk EP, Mittendorfer B, Patterson BW, Klein S. Randomized trial of exercise effect on intrahepatic triglyceride content and lipid kinetics in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2012;55:1738-1745.
546. Hallsworth K, Fattakhova G, Hollingsworth KG, Thoma C, Moore S, Taylor R, Day CP, et al. Resistance exercise reduces liver fat and its mediators in non-alcoholic fatty liver disease independent of weight loss. *Gut* 2011;60:1278-1283.
547. Zelber-Sagi S, Buch A, Yeshua H, Vaisman N, Webb M, Harari G, Kis O, et al. Effect of resistance training on non-alcoholic fatty-liver disease a randomized-clinical trial. *World J Gastroenterol* 2014;20:4382-4392.
548. Bacchi E, Negri C, Targher G, Faccioli N, Lanza M, Zoppini G, Zanolin E, et al. Both resistance training and aerobic training reduce hepatic fat content in type 2 diabetic subjects with nonalcoholic fatty liver disease (the RAED2 Randomized Trial). *Hepatology* 2013;58:1287-1295.
549. Musso G, Gambino R, Cassader M, Pagano G. A meta-analysis of randomized trials for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010;52:79-104.
550. Franz MJ, VanWormer JJ, Crain AL, Boucher JL, Histon T, Caplan W, Bowman JD, et al. Weight-loss outcomes: a systematic review and meta-analysis of weight-loss clinical trials with a minimum 1-year follow-up. *J Am Diet Assoc* 2007;107:1755-1767.
551. Sheka AC, Adeyi O, Thompson J, Hameed B, Crawford PA, Ikramuddin S. Nonalcoholic Steatohepatitis: A Review. *Jama* 2020;323:1175-1183.
552. Liu X, Lazenby AJ, Clements RH, Jhala N, Abrams GA. Resolution of nonalcoholic steatohepatitis after gastric bypass surgery. *Obes Surg* 2007;17:486-492.

553. Barker KB, Palekar NA, Bowers SP, Goldberg JE, Pulcini JP, Harrison SA. Non-alcoholic steatohepatitis: effect of Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Am J Gastroenterol* 2006;101:368-373.
554. Lassailly G, Caiazzo R, Ntandja-Wandji LC, Gnemmi V, Baud G, Verkindt H, Ningarhari M, et al. Bariatric Surgery Provides Long-term Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis and Regression of Fibrosis. *Gastroenterology* 2020;159:1290-1301.e1295.
555. Mummadi RR, Kasturi KS, Chennareddygar S, Sood GK. Effect of bariatric surgery on nonalcoholic fatty liver disease: systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6:1396-1402.
556. Shah K, Stuffelbam A, Hilton TN, Sinacore DR, Klein S, Villareal DT. Diet and exercise interventions reduce intrahepatic fat content and improve insulin sensitivity in obese older adults. *Obesity (Silver Spring)* 2009;17:2162-2168.
557. Hardy T, Anstee QM, Day CP. Nonalcoholic fatty liver disease: new treatments. *Curr Opin Gastroenterol* 2015;31:175-183.
558. Yancy WS, Jr., Olsen MK, Guyton JR, Bakst RP, Westman EC. A low-carbohydrate, ketogenic diet versus a low-fat diet to treat obesity and hyperlipidemia: a randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 2004;140:769-777.
559. Tandler D, Lin S, Yancy WS, Jr., Mavropoulos J, Sylvestre P, Rockey DC, Westman EC. The effect of a low-carbohydrate, ketogenic diet on nonalcoholic fatty liver disease: a pilot study. *Dig Dis Sci* 2007;52:589-593.
560. Kirk E, Reeds DN, Finck BN, Mayurranjan SM, Patterson BW, Klein S. Dietary fat and carbohydrates differentially alter insulin sensitivity during caloric restriction. *Gastroenterology* 2009;136:1552-1560.
561. Ryan MC, Abbasi F, Lamendola C, Carter S, McLaughlin TL. Serum alanine aminotransferase levels decrease further with carbohydrate than fat restriction in insulin-resistant adults. *Diabetes Care* 2007;30:1075-1080.
562. Spadaro L, Magliocco O, Spampinato D, Piro S, Oliveri C, Alagona C, Papa G, et al. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Liver Dis* 2008;40:194-199.
563. Sofi F, Giangrandi I, Cesari F, Corsani I, Abbate R, Gensini GF, Casini A. Effects of a 1-year dietary intervention with n-3 polyunsaturated fatty acid-enriched olive oil on non-alcoholic fatty liver disease patients: a preliminary study. *Int J Food Sci Nutr* 2010;61:792-802.
564. Zhu FS, Liu S, Chen XM, Huang ZG, Zhang DW. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids from seal oils on nonalcoholic fatty liver disease associated with hyperlipidemia. *World J Gastroenterol* 2008;14:6395-6400.
565. Tanaka N, Sano K, Horiuchi A, Tanaka E, Kiyosawa K, Aoyama T. Highly purified eicosapentaenoic acid treatment improves nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol* 2008;42:413-418.
566. Capanni M, Calella F, Biagini MR, Genise S, Raimondi L, Bedogni G, Svegliati-Baroni G, et al. Prolonged n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation ameliorates hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a pilot study. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;23:1143-1151.
567. Sanyal AJ, Abdelmalek MF, Suzuki A, Cummings OW, Chojkier M. No significant effects of ethyl-eicosapentanoic acid on histologic features of nonalcoholic steatohepatitis in a phase 2 trial. *Gastroenterology* 2014;147:377-384.e371.
568. Zelber-Sagi S, Nitzan-Kaluski D, Goldsmith R, Webb M, Blendis L, Halpern Z, Oren R. Long term nutritional intake and the risk for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a population based study. *J Hepatol* 2007;47:711-717.
569. Kim CH, Kallman JB, Bai C, Pawloski L, Gewa C, Arsalla A, Sabatella ME, et al. Nutritional assessments of patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Obes Surg* 2010;20:154-160.

570. Saab S, Mallam D, Cox GA, 2nd, Tong MJ. Impact of coffee on liver diseases: a systematic review. *Liver Int* 2014;34:495-504.
571. Catalano D, Martines GF, Tonzuso A, Pirri C, Trovato FM, Trovato GM. Protective role of coffee in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Dig Dis Sci* 2010;55:3200-3206.
572. Anty R, Marjoux S, Iannelli A, Patouraux S, Schneck AS, Bonnafous S, Gire C, et al. Regular coffee but not espresso drinking is protective against fibrosis in a cohort mainly composed of morbidly obese European women with NAFLD undergoing bariatric surgery. *J Hepatol* 2012;57:1090-1096.
573. Molloy JW, Calcagno CJ, Williams CD, Jones FJ, Torres DM, Harrison SA. Association of coffee and caffeine consumption with fatty liver disease, nonalcoholic steatohepatitis, and degree of hepatic fibrosis. *Hepatology* 2012;55:429-436.
574. Zelber-Sagi S, Salomone F, Webb M, Lotan R, Yeshua H, Halpern Z, Santo E, et al. Coffee consumption and nonalcoholic fatty liver onset: a prospective study in the general population. *Transl Res* 2015;165:428-436.
575. Shim SG, Jun DW, Kim EK, Saeed WK, Lee KN, Lee HL, Lee OY, et al. Caffeine attenuates liver fibrosis via defective adhesion of hepatic stellate cells in cirrhotic model. *J Gastroenterol Hepatol* 2013;28:1877-1884.
576. Vitaglione P, Morisco F, Mazzone G, Amoruso DC, Ribecco MT, Romano A, Fogliano V, et al. Coffee reduces liver damage in a rat model of steatohepatitis: the underlying mechanisms and the role of polyphenols and melanoidins. *Hepatology* 2010;52:1652-1661.
577. Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, McCullough A, Diehl AM, Bass NM, Neuschwander-Tetri BA, et al. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2010;362:1675-1685.
578. Frohnert BI, Hui TY, Bernlohr DA. Identification of a functional peroxisome proliferator-responsive element in the murine fatty acid transport protein gene. *J Biol Chem* 1999;274:3970-3977.
579. Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, Morel CR, Subramanian V, Mukundan L, Red Eagle A, et al. Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* 2007;447:1116-1120.
580. Tonelli J, Li W, Kishore P, Pajvani UB, Kwon E, Weaver C, Scherer PE, et al. Mechanisms of early insulin-sensitizing effects of thiazolidinediones in type 2 diabetes. *Diabetes* 2004;53:1621-1629.
581. Galli A, Crabb DW, Ceni E, Salzano R, Mello T, Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, et al. Antidiabetic thiazolidinediones inhibit collagen synthesis and hepatic stellate cell activation in vivo and in vitro. *Gastroenterology* 2002;122:1924-1940.
582. Parola M, Muraca R, Dianzani U, Barrera G, Leonarduzzi G, Bendinelli P, Piccoletti R, et al. Vitamin E dietary supplementation inhibits transforming growth factor beta 1 gene expression in the rat liver. *FEBS Lett* 1992;308:267-270.
583. Morante M, Sandoval J, Gomez-Cabrera MC, Rodriguez JL, Pallardo FV, Vina JR, Torres L, et al. Vitamin E deficiency induces liver nuclear factor-kappaB DNA-binding activity and changes in related genes. *Free Radic Res* 2005;39:1127-1138.
584. Soden JS, Devereaux MW, Haas JE, Gumprich E, Dahl R, Gralla J, Traber MG, et al. Subcutaneous vitamin E ameliorates liver injury in an in vivo model of steatocholestasis. *Hepatology* 2007;46:485-495.
585. Lavine JE, Schwimmer JB, Van Natta ML, Molleston JP, Murray KF, Rosenthal P, Abrams SH, et al. Effect of vitamin E or metformin for treatment of nonalcoholic fatty liver disease in children and adolescents: the TONIC randomized controlled trial. *JAMA* 2011;305:1659-1668.
586. Miller ER, 3rd, Pastor-Barriuso R, Dalal D, Riemersma RA, Appel LJ, Guallar E. Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med* 2005;142:37-46.

587. Klein EA, Thompson IM, Jr., Tangen CM, Crowley JJ, Lucia MS, Goodman PJ, Minasian LM, et al. Vitamin E and the risk of prostate cancer: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *Jama* 2011;306:1549-1556.
588. Schurks M, Glynn RJ, Rist PM, Tzourio C, Kurth T. Effects of vitamin E on stroke subtypes: meta-analysis of randomised controlled trials. *Bmj* 2010;341:c5702.
589. Foster T, Budoff MJ, Saab S, Ahmadi N, Gordon C, Guerci AD. Atorvastatin and antioxidants for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease: the St Francis Heart Study randomized clinical trial. *Am J Gastroenterol* 2011;106:71-77.
590. Athyros VG, Tziomalos K, Gossios TD, Griva T, Anagnostis P, Kargiotis K, Pagourelis ED, et al. Safety and efficacy of long-term statin treatment for cardiovascular events in patients with coronary heart disease and abnormal liver tests in the Greek Atorvastatin and Coronary Heart Disease Evaluation (GREACE) Study: a post-hoc analysis. *Lancet* 2010;376:1916-1922.
591. Chalasani N, Aljadhey H, Kesterson J, Murray MD, Hall SD. Patients with elevated liver enzymes are not at higher risk for statin hepatotoxicity. *Gastroenterology* 2004;126:1287-1292.
592. Oakley F, Teoh V, Ching ASG, Bataller R, Colmenero J, Jonsson JR, Eliopoulos AG, et al. Angiotensin II activates I kappaB kinase phosphorylation of RelA at Ser 536 to promote myofibroblast survival and liver fibrosis. *Gastroenterology* 2009;136:2334-2344.e2331.
593. Zein CO, Yerian LM, Gogate P, Lopez R, Kirwan JP, Feldstein AE, McCullough AJ. Pentoxifylline improves nonalcoholic steatohepatitis: a randomized placebo-controlled trial. *Hepatology* 2011;54:1610-1619.
594. Wagner M, Zollner G, Trauner M. Nuclear bile acid receptor farnesoid X receptor meets nuclear factor-kappaB: new insights into hepatic inflammation. *Hepatology* 2008;48:1383-1386.
595. Wang YD, Chen WD, Wang M, Yu D, Forman BM, Huang W. Farnesoid X receptor antagonizes nuclear factor kappaB in hepatic inflammatory response. *Hepatology* 2008;48:1632-1643.
596. Younossi ZM, Ratziu V, Loomba R, Rinella M, Anstee QM, Goodman Z, Bedossa P, et al. Obeticholic acid for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: interim analysis from a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* 2019;394:2184-2196.
597. Patel K, Harrison SA, Elkhatab M, Trotter JF, Herring R, Rojter SE, Kayali Z, et al. Cilofexor, a Nonsteroidal FXR Agonist, in Patients With Noncirrhotic NASH: A Phase 2 Randomized Controlled Trial. *Hepatology* 2020;72:58-71.
598. Francque SM, Bedossa P, Ratziu V, Anstee QM, Bugianesi E, Sanyal AJ, Loomba R, et al. A Randomized, Controlled Trial of the Pan-PPAR Agonist Lanifibranor in NASH. *N Engl J Med* 2021;385:1547-1558.
599. Xu J, Lloyd DJ, Hale C, Stanislaus S, Chen M, Sivits G, Vonderfecht S, et al. Fibroblast growth factor 21 reverses hepatic steatosis, increases energy expenditure, and improves insulin sensitivity in diet-induced obese mice. *Diabetes* 2009;58:250-259.
600. Coskun T, Bina HA, Schneider MA, Dunbar JD, Hu CC, Chen Y, Moller DE, et al. Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology* 2008;149:6018-6027.
601. Kharitonov A, Wroblewski VJ, Koester A, Chen YF, Clutinger CK, Tigno XT, Hansen BC, et al. The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21. *Endocrinology* 2007;148:774-781.
602. Gaich G, Chien JY, Fu H, Glass LC, Deeg MA, Holland WL, Kharitonov A, et al. The effects of LY2405319, an FGF21 analog, in obese human subjects with type 2 diabetes. *Cell Metab* 2013;18:333-340.
603. Harrison SA, Ruane PJ, Freilich BL, Neff G, Patil R, Behling CA, Hu C, et al. Efruxifermin in non-alcoholic steatohepatitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 2a trial. *Nat Med* 2021;27:1262-1271.

604. Klier SA, Mangelsdorf DJ. Bile Acids as Hormones: The FXR-FGF15/19 Pathway. *Dig Dis* 2015;33:327-331.
605. Musso G, De Michieli F, Bongiovanni D, Parente R, Framarin L, Leone N, Berrutti M, et al. New Pharmacologic Agents That Target Inflammation and Fibrosis in Nonalcoholic Steatohepatitis-Related Kidney Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2017;15:972-985.
606. Kuchay MS, Krishan S, Mishra SK, Farooqui KJ, Singh MK, Wasir JS, Bansal B, et al. Effect of Empagliflozin on Liver Fat in Patients With Type 2 Diabetes and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Randomized Controlled Trial (E-LIFT Trial). *Diabetes Care* 2018;41:1801-1808.
607. Gastaldelli A, Repetto E, Guja C, Hardy E, Han J, Jabbour SA, Ferrannini E. Exenatide and dapagliflozin combination improves markers of liver steatosis and fibrosis in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2020;22:393-403.
608. Mosenzon O, Blicher TM, Rosenlund S, Eriksson JW, Heller S, Hels OH, Pratley R, et al. Efficacy and safety of oral semaglutide in patients with type 2 diabetes and moderate renal impairment (PIONEER 5): a placebo-controlled, randomised, phase 3a trial. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2019;7:515-527.
609. Newsome PN, Buchholtz K, Cusi K, Linder M, Okanoue T, Ratzu V, Sanyal AJ, et al. A Placebo-Controlled Trial of Subcutaneous Semaglutide in Nonalcoholic Steatohepatitis. *N Engl J Med* 2021;384:1113-1124.
610. Armstrong MJ, Gaunt P, Aithal GP, Barton D, Hull D, Parker R, Hazlehurst JM, et al. Liraglutide safety and efficacy in patients with non-alcoholic steatohepatitis (LEAN): a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet* 2016;387:679-690.
611. van Dalem J, Driessen JHM, Burden AM, Stehouwer CDA, Klungel OH, de Vries F, Brouwers M. Thiazolidinediones and Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonists and the Risk of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Cohort Study. *Hepatology* 2021;74:2467-2477.
612. Harrison SA, Bashir MR, Guy CD, Zhou R, Moylan CA, Frias JP, Alkhouri N, et al. Resmetirom (MGL-3196) for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet* 2019;394:2012-2024.
613. Struik D, Dommerholt MB, Jonker JW. Fibroblast growth factors in control of lipid metabolism: from biological function to clinical application. *Curr Opin Lipidol* 2019;30:235-243.
614. Ratzu V, de Guevara L, Safadi R, Poordad F, Fuster F, Flores-Figueroa J, Arrese M, et al. Aramchol in patients with nonalcoholic steatohepatitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2b trial. *Nat Med* 2021;27:1825-1835.
615. Chalasani N, Abdelmalek MF, Garcia-Tsao G, Vuppalanchi R, Alkhouri N, Rinella M, Noureddin M, et al. Effects of Belapectin, an Inhibitor of Galectin-3, in Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis With Cirrhosis and Portal Hypertension. *Gastroenterology* 2020;158:1334-1345.e1335.
616. De Macedo ME, Lima MJ, Silva AO, Alcantara P, Ramalhinho V, Carmona J. Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension in Portugal. The PAP study. *Rev Port Cardiol* 2007;26:21-39.
617. Castera L, Friedrich-Rust M, Loomba R. Noninvasive Assessment of Liver Disease in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 2019;156:1264-1281.e1264.
618. Walldius G, Jungner I, Holme I, Aastveit AH, Kolar W, Steiner E. High apolipoprotein B, low apolipoprotein A-I, and improvement in the prediction of fatal myocardial infarction (AMORIS study): a prospective study. *Lancet* 2001;358:2026-2033.
619. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, McQueen M, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 2004;364:937-952.
620. Craig CL, Marshall AL, Sjostrom M, Bauman AE, Booth ML, Ainsworth BE, Pratt M, et al. International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. *Med Sci Sports Exerc* 2003;35:1381-1395.

621. Rubinsky AD, Dawson DA, Williams EC, Kivlahan DR, Bradley KA. AUDIT-C scores as a scaled marker of mean daily drinking, alcohol use disorder severity, and probability of alcohol dependence in a U.S. general population sample of drinkers. *Alcohol Clin Exp Res* 2013;37:1380-1390.
622. Lopes C. Reprodutibilidade e Validação de um questionário semi-quantitativo de frequência alimentar. In: *Alimentação e enfarte agudo do miocárdio: um estudo caso-controle de base populacional*. Tese de Doutorado. 2000:79-115.
623. Lopes C, Aro A, Azevedo A, Ramos E, Barros H. Intake and adipose tissue composition of fatty acids and risk of myocardial infarction in a male Portuguese community sample. *J Am Diet Assoc* 2007;107:276-286.
624. Lima LM, Carvalho M, Sousa MO. Apo B/apo A-I ratio and cardiovascular risk prediction. *Arq Bras Cardiol* 2007;88:e187-190.
625. Leitão J, Carvalhana S, Cochicho J, Silva AP, Velasco F, Medeiros I, Alves AC, et al. Prevalence and risk factors of fatty liver in Portuguese adults. *Eur J Clin Invest* 2020;50:e13235.
626. Lonardo A, Bellentani S, Argo CK, Ballestri S, Byrne CD, Caldwell SH, Cortez-Pinto H, et al. Epidemiological modifiers of non-alcoholic fatty liver disease: Focus on high-risk groups. *Dig Liver Dis* 2015;47:997-1006.
627. Haldar D, Kern B, Hodson J, Karam V, Fritz J, Adam R, Feurstein B, et al. Frequency and outcomes of liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis in Europe. *Journal of Hepatology* 2018;68:S24-S25.
628. Pimpin L, Cortez-Pinto H, Negro F, Corbould E, Lazarus JV, Webber L, Sheron N. Burden of liver disease in Europe: Epidemiology and analysis of risk factors to identify prevention policies. *J Hepatol* 2018;69:718-735.
629. Eslam M, Sanyal AJ, George J. Toward More Accurate Nomenclature for Fatty Liver Diseases. *Gastroenterology* 2019;157:590-593.
630. Ballestri S, Nascimbeni F, Baldelli E, Marrazzo A, Romagnoli D, Lonardo A. NAFLD as a Sexual Dimorphic Disease: Role of Gender and Reproductive Status in the Development and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Inherent Cardiovascular Risk. *Adv Ther* 2017;34:1291-1326.
631. Zelber-Sagi S, Salomone F, Mlynarsky L. The Mediterranean dietary pattern as the diet of choice for non-alcoholic fatty liver disease: Evidence and plausible mechanisms. *Liver Int* 2017;37:936-949.
632. IDFA. IDF Diabetes Atlas, 2019. In; Accessed in 25/02/2020, at: <http://diabetesatlas.org>.
633. Lonardo A, Nascimbeni F, Mantovani A, Targher G. Hypertension, diabetes, atherosclerosis and NASH: Cause or consequence? *J Hepatol* 2018;68:335-352.
634. Sookoian S, Castano GO, Pirola CJ. Modest alcohol consumption decreases the risk of non-alcoholic fatty liver disease: a meta-analysis of 43 175 individuals. *Gut* 2014;63:530-532.
635. Dunn W, Xu R, Schwimmer JB. Modest wine drinking and decreased prevalence of suspected nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2008;47:1947-1954.
636. Dunn W, Sanyal AJ, Brunt EM, Unalp-Arida A, Donohue M, McCullough AJ, Schwimmer JB. Modest alcohol consumption is associated with decreased prevalence of steatohepatitis in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *J Hepatol* 2012;57:384-391.
637. Becker U, Gronbaek M, Johansen D, Sorensen TI. Lower risk for alcohol-induced cirrhosis in wine drinkers. *Hepatology* 2002;35:868-875.
638. Hajifathalian K, Torabi Sagvand B, McCullough AJ. Effect of Alcohol Consumption on Survival in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A National Prospective Cohort Study. *Hepatology* 2018;DOI: 10.1002/hep.30226.
639. Ascha MS, Hanouneh IA, Lopez R, Tamimi TA, Feldstein AF, Zein NN. The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2010;51:1972-1978.

640. Ajmera V, Belt P, Wilson LA, Gill RM, Loomba R, Kleiner DE, Neuschwander-Tetri BA, et al. Among Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease, Modest Alcohol Use Is Associated With Less Improvement in Histologic Steatosis and Steatohepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2018.
641. Alcohol use and burden for 195 countries and territories, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet* 2018;392:1015-1035.
642. Westerterp KR, Goris AH. Validity of the assessment of dietary intake: problems of misreporting. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002;5:489-493.
643. Trabulsi J, Schoeller DA. Evaluation of dietary assessment instruments against doubly labeled water, a biomarker of habitual energy intake. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;281:E891-899.
644. Heitmann BL, Lissner L. Dietary underreporting by obese individuals--is it specific or non-specific? *Bmj* 1995;311:986-989.
645. Silva MJ, Rosa MV, Nogueira PJ, Calinas F. Ten years of hospital admissions for liver cirrhosis in Portugal. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2015;27:1320-1326.
646. Cortez-Pinto H, Gouveia M, dos Santos Pinheiro L, Costa J, Borges M, Vaz Carneiro A. The burden of disease and the cost of illness attributable to alcohol drinking--results of a national study. *Alcohol Clin Exp Res* 2010;34:1442-1449.
647. Craciun A, Lackner C, Cortez-Pinto H. Nonalcoholic Fatty Liver Disease versus Alcohol Related Liver Disease: is it really so different? *Curr Pharm Des* 2020;[Epub ahead of print] PMID: 31969088.
648. Leitao J, Carvalhana S, Silva AP, Velasco F, Medeiros I, Alves AC, Bourbon M, et al. No Evidence for Lower Levels of Serum Vitamin D in the Presence of Hepatic Steatosis. A Study on the Portuguese General Population. *Int J Med Sci* 2018;15:1778-1786.
649. Holick MF. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am J Clin Nutr* 2004;79:362-371.
650. Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr* 2000;72:690-693.
651. Saliba W, Barnett O, Rennert HS, Rennert G. The risk of all-cause mortality is inversely related to serum 25(OH)D levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:2792-2798.
652. Chowdhury R, Kunutsor S, Vitezova A, Oliver-Williams C, Chowdhury S, Kieffe-de-Jong JC, Khan H, et al. Vitamin D and risk of cause specific death: systematic review and meta-analysis of observational cohort and randomised intervention studies. *Bmj* 2014;348:g1903.
653. Ford ES, Zhao G, Tsai J, Li C. Vitamin D and all-cause mortality among adults in USA: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey Linked Mortality Study. *Int J Epidemiol* 2011;40:998-1005.
654. Holick MF. The vitamin D deficiency pandemic and consequences for nonskeletal health: mechanisms of action. *Mol Aspects Med* 2008;29:361-368.
655. Cashman KD, Dowling KG, Skrabakova Z, Gonzalez-Gross M, Valtuena J, De Henauw S, Moreno L, et al. Vitamin D deficiency in Europe: pandemic? *Am J Clin Nutr* 2016;103:1033-1044.
656. Manson JE, Brannon PM, Rosen CJ, Taylor CL. Vitamin D Deficiency - Is There Really a Pandemic? *N Engl J Med* 2016;375:1817-1820.
657. World Health Organization, World Cancer Report, Lyon, 2014. International Agency for Research on Cancer (IARC). 2014.
658. Organization WWH. Global Health Estimates (GHE) 2013: Deaths by age, sex and cause. In. Geneva, Switzerland; 2013.
659. Peery AF, Crockett SD, Barritt AS, Dellon ES, Eluri S, Gangarosa LM, Jensen ET, et al. Burden of Gastrointestinal, Liver, and Pancreatic Diseases in the United States. *Gastroenterology* 2015;149:1731-1741.e1733.
660. Organization W-WH. Global status report on alcohol and health 2014. In; 2014.

661. WHO. Global status report on alcohol and health 2018. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/274603> 2018;(accessed July, 11, 2019).
662. Manthey J, Shield KD, Rylett M, Hasan OSM, Probst C, Rehm J. Global alcohol exposure between 1990 and 2017 and forecasts until 2030: a modelling study. *Lancet* 2019;393:2493-2502.
663. Anderson P, O'Donnell A, Kaner E, Llopis EJ, Manthey J, Rehm J. Impact of minimum unit pricing on alcohol purchases in Scotland and Wales: controlled interrupted time series analyses. *Lancet Public Health* 2021;6:e557-e565.
664. Robinson M, Mackay D, Giles L, Lewsey J, Richardson E, Beeston C. Evaluating the impact of minimum unit pricing (MUP) on off-trade alcohol sales in Scotland: an interrupted time-series study. *Addiction* 2021;116:2697-2707.
665. Marinho RT, Duarte H, Giria J, Nunes J, Ferreira A, Velosa J. The burden of alcoholism in fifteen years of cirrhosis hospital admissions in Portugal. *Liver Int* 2015;35:746-755.
666. WHO. WHO European Childhood Obesity Surveillance Initiative (COSI). <https://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/nutrition/activities/who-european-childhood-obesity-surveillance-initiative-cosi> 2021.
667. Simon TG, Roelstraete B, Hartjes K, Shah U, Khalili H, Arnell H, Ludvigsson JF. Non-alcoholic fatty liver disease in children and young adults is associated with increased long-term mortality. *J Hepatol* 2021;doi: 10.1016/j.jhep.2021.06.034.
668. Powell EE, Cooksley WG, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell LW. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology* 1990;11:74-80.
669. Wong RJ, Cheung R, Ahmed A. Nonalcoholic steatohepatitis is the most rapidly growing indication for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma in the U.S. *Hepatology* 2014;59:2188-2195.
670. Marengo A, Rosso C, Bugianesi E. Liver Cancer: Connections with Obesity, Fatty Liver, and Cirrhosis. *Annu Rev Med* 2016;67:103-117.
671. Younes R, Bugianesi E. Should we undertake surveillance for HCC in patients with NAFLD? *J Hepatol* 2018;68:326-334.
672. Krawczyk M, Stokes CS, Romeo S, Lammert F. HCC and liver disease risks in homozygous PNPLA3 p.I148M carriers approach monogenic inheritance. *J Hepatol* 2015;62:980-981.
673. Dongiovanni P, Romeo S, Valenti L. Hepatocellular carcinoma in nonalcoholic fatty liver: role of environmental and genetic factors. *World J Gastroenterol* 2014;20:12945-12955.
674. Donati B, Pietrelli A, Pingitore P, Dongiovanni P, Caddeo A, Walker L, Baselli G, et al. Telomerase reverse transcriptase germline mutations and hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Cancer Med* 2017;6:1930-1940.
675. Donati B, Dongiovanni P, Romeo S, Meroni M, McCain M, Miele L, Petta S, et al. MBOAT7 rs641738 variant and hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic individuals. *Sci Rep* 2017;7:4492.
676. Baumeister SE, Volzke H, Marschall P, John U, Schmidt CO, Flessa S, Alte D. Impact of fatty liver disease on health care utilization and costs in a general population: a 5-year observation. *Gastroenterology* 2008;134:85-94.

