UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO

IMPLICAÇÕES DA FONTE LIPÍDICA DA DIETA NO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS ERITROCITÁRIOS E NA PROGRESSÃO DA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA

KÁTIA CANSANÇÃO CORREA DE OLIVEIRA

Rio de Janeiro
2015

UFRJ INJC
Instituto de Nutrição Josué de Castro
Programa de Pós-Graduação em Nutrição

IMPLICAÇÕES DA FONTE LIPÍDICA DA DIETA NO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS ERITROCITÁRIOS E NA PROGRESSÃO DA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA

KÁTIA CANSANÇÃO CORREA DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição (PPGN), do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de ***mestre em Nutrição Humana.***

Orientadoras: Profª Drª Maria das Graças Tavares Carmo

Profª Drª Wilza Arantes Ferreira Peres

Rio de Janeiro

Outubro, 2015

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

O48i

Oliveira, Katia Cansanção Correa de
Implicações da fonte lipídica da dieta no perfil de ácidos graxos eritrocitários e na progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica / Katia Cansanção Correa de Oliveira. -- Rio de Janeiro, 2015.
99 f.

Orientadora: Maria das Graças Tavares do Carmo.
Coorientadora: Wilza Arantes Ferreira Peres.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição, Programa de Pós-Graduação em Nutrição, 2015.

1. Doença hepática gordurosa não alcoólica. 2. Ácidos graxos. 3. Ácidos graxos desaturases. 4. lipogênese. 5. Elastografia transitória hepática. I. Carmo, Maria das Graças Tavares do, orient. II. Peres, Wilza Arantes Ferreira, coorient. III. Título.

IMPLICAÇÕES DA FONTE LIPÍDICA DA DIETA NO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS ERITROCITÁRIOS E NA PROGRESSÃO DA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA

Kátia Cansanção Correa de Oliveira

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO DO INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM NUTRIÇÃO HUMANA.

Examinada por:

_____

Profa. Dra. Maria das Graças Tavares Carmo (Presidente) – INJC/UFRJ

_____

Profa. Dra. Wilza Arantes Ferreira Peres – INJC/UFRJ

_____

Profa. Dra. Patrícia Padilha de Carvalho – INJC/UFRJ

_____

Prof. Dr. Guilherme Rezende – FM/UFRJ

_____

Prof. Dr. Henrique Sérgio de Moraes Coelho – FM/UFRJ

RIO DE JANEIRO, RJ-BRASIL

OUTUBRO, 2015

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe Aime Cansanção Correa por seu amor, carinho, compreensão e incentivo, por estar ao meu lado a todo tempo, por acreditar que sou capaz, por me compreender em todos os sentidos, por sua força e atenção, a você devo tudo o que sou, muito obrigada!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por tudo. Obrigada senhor por colocar em meu caminho pessoas abençoadas, por caminhar ao meu lado a todo momento.

A minha mãe por seu amor, pela maneira como me educou, pelo apoio, paciência, pela ajuda e dedicação, devo a você essa vitória, obrigada!

As minhas orientadoras Professora Dra. Maria das Graças Tavares Carmo e Professora Dra. Wilza Arantes Ferreira pela oportunidade e confiança que depositou em mim, por seus ensinamentos, atenção, apoio, sugestões, revisão crítica dos textos, pelo exemplo profissional.

A equipe do Ambulatório de Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica do HUCFF, principalmente à Dra. Nathalie Carvalho Leite, ao Professor Dr. Henrique Sérgio Moraes Coelho e a Professora Dra. Renata Melo Perez.

A professora Patrícia Padilha por sua imensa colaboração na qualificação e na defesa.

A Professora Dra. Rosangela Alves Pereira por preciosas contribuições na avaliação do consumo alimentar.

Ao mestrando Henrique Marcondes pela ajuda com as análises bioquímicas.

A Juliana de Moraes Coelho por sua ajuda ao longo do mestrado.

As alunas de iniciação científica, Ana Carolina Iunes e Andressa Alves por ajudarem em diversas etapas desse trabalho.

A doutoranda Luana Monteiro por suas contribuições na avaliação do consumo alimentar.

A Barbara da Silva Nalin de Souza e Diana Cunha Barbosa do Instituto de Medicina Social da Universidade do Estado do Rio de Janeiro por suas contribuições na avaliação do consumo alimentar.

As técnicas em patologia clínica do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho Bete e Fernanda por sua ajuda na coleta de sague dos pacientes.

Ao técnico em patologia clínica do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho Julimar, por sua ajuda na coleta de sague dos pacientes.

Aos colegas e técnicos do Laboratório de Bioquímica Nutricional, aos professores e as secretárias da Pós-Graduação.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pelo auxílio financeiro APQ1, nº de protocolo E26/110.620/2014.

Aos pacientes pela boa vontade, paciência e colaboração.

Depois de plantada a semente deste incrível arbusto, não se vê nada por aproximadamente cinco anos, exceto um lento desabrochar de um diminuto broto a partir do bulbo".

Durante cinco anos, todo o crescimento é subterrâneo, invisível a olho nu, mas... Uma maciça e fibrosa estrutura de raiz que se estende vertical e horizontalmente pela terra está sendo construída. Então, no final do 5° ano, o bambu chinês cresce até atingir a altura de 25 metros.

Um escritor de nome Covey escreveu:

"Muitas coisas na vida pessoal e profissional são iguais ao bambu chinês. Você trabalha, investe tempo, esforço, faz tudo o que pode para nutrir seu crescimento, e às vezes não vê nada por semanas, meses ou anos. Mas se tiver paciência para continuar trabalhando, persistindo e nutrindo, o seu quinto ano chegará, e com ele virão um crescimento e mudanças que você jamais esperava..."

O bambu chinês no ensina que não devemos facilmente desistir de nossos projetos e de nossos sonhos... Em nosso trabalho especialmente, que é um projeto fabuloso que envolve mudanças de comportamento, pensamento, de cultura e de sensibilização, devemos sempre lembrar do bambu chinês para não desistirmos facilmente diante das dificuldades que surgirão.

"É preciso muito fibra para chegar às alturas e, ao mesmo tempo, muita flexibilidade para se curvar."

Autor desconhecido

APRESENTAÇÃO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é atualmente a doença do fígado mais comum no Brasil e no mundo, a qual cresce em paralelo com o surgimento secular das desordens metabólicas, entre elas, obesidade. Esta população é frequentemente consumidora de alimentos industrializados ricos em gordura e bebidas com adição de açúcar, que favorecem não só o surgimento, mas, a progressão da DHGNA. Desse modo, torna-se importante conhecer o consumo alimentar e o perfil de ácidos graxos (AG) de eritrócitos utilizado como marcador biológico de ingestão de lipídios a médio prazo, visando possíveis intervenções dietéticas que possam contribuir para postergar ou regredir a progressão da DHGNA.

Diante dessa realidade, pesquisadores e alunos da linha de Pesquisa de Bioquímica Nutricional do Instituto de Nutrição Josué de Castro-INJC/Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ (Profa. Dra. Maria das Graças Tavares Carmo, Profa. Dra. Wilza Arantes Ferreira Peres, Katia Cansanção Correa de Oliveira, Ana Carolina Iunes e Andressa Alves) se propuseram a estudar as implicações do consumo dietético de lipídios e a composição de AG de membrana de eritrócitos na DHGNA.

O projeto de pesquisa apresentado nessa dissertação foi desenvolvido no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF). O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do HUCFF (nº080434/2013). Foi cadastrado na plataforma Brasil com o título "Implicações da fonte lipídica da dieta no desenvolvimento da esteatose hepática, no perfil de ácidos graxos das frações lipídicas plasmáticas e de eritrócitos e nos processos inflamatórios de indivíduos com doença hepática gordurosa não alcoólica". A pesquisa recebeu financiamento da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pelo edital APQ1 (nº E26/110.620/2014).

A presente dissertação de mestrado acadêmico intitulada "implicações da fonte lipídica da dieta, no perfil de ácidos graxos eritrocitários e na progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica" é apresentada no formato de artigo científico, composto dos capítulos de introdução, revisão da literatura, objetivos, casuística e métodos. O artigo científico está inserido nos capítulos de resultados e discussão e, após o mesmo, encontram-se as conclusões da presente dissertação.

Essa dissertação contribuiu para consolidar a parceria exitosa do INJC com o HUCFF/Setor de Hepatologia como um polo regional no atendimento das necessidades

dos diversos segmentos da sociedade, com base na educação superior, extensão e pesquisa. Adicionalmente, deu origem a um manuscrito que será submetido para publicação na revista Journal of Lipid Research (Print).

RESUMO

De Oliveira, Kátia Cansanção Correa. Implicações da fonte lipídica da dieta no perfil de ácidos graxos eritrocitários e na progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica. Rio de Janeiro, 2015. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana) – Instituto de Nutrição Josué de Castro, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Introdução: A DHGNA é atualmente a doença hepática mais comum no Brasil e no mundo. Estudos recentes têm sugerido que a composição dos AG dietéticos, os processos enzimáticos de elongação e desaturação, bem como a RI e da lipogênese *de novo* (LDN) influenciam no conteúdo de ácidos graxos de eritrócitos e estão relacionados ao desenvolvimento e progressão da DHGNA. **Objetivo:** Avaliar a ingestão dietética de lipídios e a composição de ácidos graxos de lipídios totais de eritrócitos de pacientes com DHGNA relacionado com o grau de fibrose hepática e a LDN. **Método:** Um total de 89 indivíduos com doença hepática gordurosa não alcoólica (28 sem fibrose significativa ≤ 7 kPa; 61 com fibrose significativa > 7 kPa) foram avaliados entre janeiro de 2014 a janeiro 2015. A adequação da ingestão lipídica foi avaliada com base nos valores de referência preconizados pela NCEP ATP III. A composição dos ácidos graxos de eritrócitos foi obtida por meio da cromatografia gasosa e posteriormente calculada as relações que refletem a atividade das enzimas lipogênicas (ELOVL6 18:0/16:0; SCD1 16:1 n-7/16:0; 18:1 n-9/18:0) e o índice de LDN (16:0/18:2 n-6). **Resultados:** Foram observadas inadequações no consumo de AGM e AGPI em 100%, 93,3% dos pacientes, respectivamente, e 97,8% pacientes excederam o limite máximo da ingestão diária para AGS. A relação 18:0/16:0 foi significativamente menor (p=0,01) e a relação 18:1n9/18:0 significativamente maior (p=0,03) relativos ao aumento do 16:0 e do 18:1 n-9 e, maior adiposidade abdominal associados ao grau de fibrose hepática avançada. Foram observadas correlações positivas significativas entre os AG de eritrócitos 16:0 (r= 0,334; p=0,00), o 18:1 n-9 (r= 0,325; p=0,00) e o total AGM (r= 0,292; p=0,00) e a mediana da fibrose hepática (kPa) e uma correlação inversa significativa (r= -0,296; p=0,00) entre o biomarcador de atividade enzimática ELOVL6 (18:0/16:0) com a mediana de fibrose hepática (kPa). **Conclusão:** Os pacientes com DHGNA apresentam inadequação no consumo lipídios, bem como, um aumento dos AG 16:0 e 18:1 n-9 e do índice de LDN relacionados à fibrose hepática avançada.

Palavras-Chave: Doença hepática gordurosa não alcoólica, ácidos graxos, ácidos graxos desaturases, lipogênese, elastografia transitória hepática.

ABSTRACT

De Oliveira, Kátia Cansanção Correa. Implications of lipid diet source the profile of fatty erythrocyte and disease progression nonalcoholic fatty liver disease. Rio de Janeiro, 2015. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana) – Instituto de Nutrição Josué de Castro, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Background: NAFLD is now the most common liver disease in Brazil and worldwide. Recent studies have suggested that the composition of dietary FA, enzymatic processes of elongation and desaturation, as well as IR and *de novo* lipogenesis (DNL) influence the fatty acid content of erythrocytes and are related to the development and progression of NAFLD. **Aims:** Evaluate dietary intake of lipids and fatty acid composition of total lipids of erythrocytes of patients with NAFLD related to the degree of liver fibrosis and DNL. **Methods:** A total of 89 patients with nonalcoholic fatty liver disease (28 without significant fibrosis ≤ 7 kPa, 61 with significant fibrosis > 7 kPa) were evaluated between January 2014 and January 2015. The adequacy of lipid intake was assessed based on the values of reference recommended by the NCEP ATP III. The composition of the fatty acids of erythrocytes was obtained by gas chromatography and subsequently calculated relationships that reflect the activity of lipogenic enzymes (ELOVL6 18:0/16:0; SCD1 16:1 n-7/16:0; 18:1 n-9/18:0) and index DNL (16: 0/18: 2n-6). **Results:** Inadequate were observed in consumption MUFA at 100% and PUFA, 93.3% of patients, respectively, and 97.8% patients exceeded the upper limit of daily intake for SFA. The ratio 18:0/16:0 was significantly lower (p= 0.01) and the ratio 18:1n-9 /18:0 significantly higher (p= 0.03) relative to the increase in 16:0 and 18:1 n-9 and associated abdominal adiposity greater the degree of advanced hepatic fibrosis. Significant positive correlations were observed between them FAs erythrocytes 16:0 (r = 0.334; p= 0.00) 18:1 n-9 (r = 0.325; p = 0.00) and the whole MUFA (r = 0.292; p= 0.00) and median liver fibrosis (kPa) and a significant inverse correlation (r = -0.296; p = 0.00) between the enzymatic activity of a biomarker ELOVL6 (18:0/16:0) with the median hepatic fibrosis (kPa). **Conclusion:** Patients with NAFLD have inadequate in lipid consumption and an increase in FAs 16:0 and 18:1 n-9 and index DNL related to advanced liver fibrosis.

Keywords: Non-alcoholic fatty liver disease, fatty acids, fatty acid desaturases, lipogenesis, transiente liver elastography.

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1: Síntese de ácidos graxos saturados e monoinsaturados pelas enzimas ELOVL6 e SCD-1. 31

Figura 2: Vias da biossíntese dos ácidos graxos poli-insaturados n-6 e n-3. 36

Figura 3: Mecanismo de síntese e ação de mediadores lipídicos produzidos a partir do ácido araquidônico, EPA e DHA. 37

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1 - Ácidos graxos saturados e suas principais fontes alimentares.	30
Quadro 2 - Ácidos graxos monoinsaturados e suas principais fontes alimentares.	33
Quadro 3 - Resumo das principais publicações sobre o efeito da dieta do mediterrâneo na DHGNA.	34
Quadro 4 - Ácidos graxos poli-insaturados e suas principais fontes alimentares.	35
Quadro 5 - Resumo das principais publicações sobre o efeito da suplementação de AGPI n-3 nos pacientes com DHGNA.	39
Quadro 6 - Resumo das principais publicações que analisaram a composição lipídica em pacientes com DHGNA.	43
Quadro 7 - Classificação do estado nutricional, segundo o IMC para adultos.	52
Quadro 8 - Valores de referência para avaliação do risco cardiometabólico utilizando o perímetro da cintura.	53
Quadro 9 - Ponto de corte para relação cintura/quadril.	53
Quadro 10- Pontos de corte da razão cintura/estatura.	54
Quadro 11- Pontos de corte para classificação do IAC.	54
Quadro 12- Pontos de corte do índice de forma corporal	54

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACC- Acetil-CoA Carboxilase

AG- Ácidos Graxos

AGI- Ácidos Graxos Insaturados

AGL- Ácidos Graxos Livres

AGE- Ácidos Graxos Essenciais

AGNE- Ácidos Graxos Não Esterificados

AGPI- Ácidos Graxos Poli-insaturados

AGPI n-3- Ácidos Graxos Poli-insaturados da série n-3

AGPI n-6- Ácidos Graxos Poli-insaturados da série n-6

AGPI-CL- Ácidos Graxos Poli-insaturados de Cadeia Longa

AGPI-CL n-3- Ácidos Graxos Poli-insaturados de Cadeia Longa da série n-3

AGS- Ácidos Graxos Saturados

AGT- Ácidos Graxos *trans*

ALT- Alanina Aminotransferase

ApoB- Apolipoproteína B

APRI- Índice da razão AST/plaquetas

AST- Aspartato Aminotransferase

CA- Consumo Alimentar

CAP- Controlled Attenuation Parameter

CG- Cromatografia Gasosa

CHE- Células Hepáticas Estreladas

ChoRE- Elemento Responsivo a Carboidrato

ChREBP- Proteína Ligadora do Elemento Regulado por Carboidrato

COX- Enzima Ciclooxigenase

DHA- Ácido Docosahexaenóico

DHGNA- Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica

DM2- Diabetes Mellitus tipo 2

EHNA- Esteato-hepatite Não Alcoólica

ETH- Elastografia Transitória Hepática

ELOVL6- Elongase de Ácidos Graxos de Cadeia Muito Longa 6

EMAG- Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos

EPA- Ácidos Eicosapentaenóico

EPIC- European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition

EROS- Espécies Reativas de Oxigênio

EUA- Estados Unidos da América

FAO- Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

FAS- Ácido Graxo Sintase

FID- Flame Ionization Detector

GGT- Gama-glutamil Transferase

GLUT-4- Transportador de Glicose tipo 4

H2O2- Peróxido de Hidrogênio

HDL- Lipoproteína de Alta Densidade

HOMA-IR- Homeostatic Model Assessment

HUCFF- Hospital Universitário Clementino Fraga Filho

Hz- Hertz

IAC- Índice de Adiposidade Corporal

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia

IKK- Inibidor da kappa kinase

I-κB- Inibidor do Fator de Transcrição Nuclear κB

IL-1β- Interleucina- 1 beta

IL-6- Interleucina-6

IMC- Índice de Massa Corporal

INR- International Normalization Ratio

IQR- Intervalo Interquartil

IRS- Substrato do Receptor de Insulina

KPa- KiloPascal

LDL- Lipoproteína de Baixa Densidade

LHS- Lipase Hormônios Sensível

LOX- Lipooxigenase

LTB- Leucotrienos

MDA- Malonaldeído

MEC- Matriz Extracelular

MHz- Mega-hertz

MSM- Multiple Source Method

MTP- Proteína Microssomal Transferidora de Triglicerídeos

NF-kβ- Fator Nuclear-kappa beta

O2- Oxigênio

OMS- Organização Mundial de Saúde

PAI-1- Inibidor Ativador do Plasminogênio-1

PGE- Prostaglandinas

POF- Programa de Orçamento Familiar

QFA- Questionário de Frequência Alimentar

R24- Recordatório de 24 horas

RA- Registro Alimentar

RCEst- Razão Cintura/Estatura

RCQ- Relação Cintura Quadril

RE- Retículo Endoplasmático

RI- Resistência à Insulina

RPM- Rotação por Minuto

SCD1- Estearoil-CoA Dessaturase

SM- Síndrome Metabólica

SREBP-1c- Proteína Ligadora do Elemento Regulado por Esteróides

TAP- Tempo de Atividade da Protrombina

TCLE- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TG- Triglicerídeos

TGF-β- fator de transformação do crescimento- beta

TNF-α- Fator de Necrose Tumoral- alfa

TxB- Tramboxanos

USG- Ultrassonografia

VET- Valor Energético Total

VLDL- Lipoproteína de Muito Baixa Densidade

LISTA DE ABREVIATURAS DE ÁCIDOS GRAXOS

Símbolo	Nome usual do ácido graxo	Abreviaturas
16:0	Palmítico	-
17:0	Margárico	-
18:0	Esteárico	-
20:0	Araquídico	-
22:0	Behênico	-
24:0	Lignocérico	-
16:1 n-7	Palmitoleico	-
18:1 n-9	Oleico	AO
18:2 n-6	Linoleico	AL
18:3 n-6	Gama-linolênico	-
20:2 n-6	Eicosadienóico	-
20:3 n-6	Di-homo-gama-linolênico	-
20:4 n-6	Araquidônico	AA
22:2 n-6	Docosadienóico	-
22:4 n-6		-
22:5 n-6	Docosapentainoico n-6	DPA
18:3 n-3	Alfa-linolênico	AAL
20:5 n-3	Eicosapentaenoico	EPA
22:5 n-3	Docosapentainoico n-3	DPA
22:6 n-3	Docosaexaenoico	DHA

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1 Etiologia e prevalência	25
2.2 Fisiopatologia da DHGNA	25
2.2.1 Resistência à insulina	26
2.2.2 Lipogênese *de novo*	26
2.3 Fibrose e DHGNA	27
2.4 Lipídios e DHGNA	28
2.4.1 Ácidos graxos saturados e DHGNA	29
2.4.2 Ácidos graxos *trans* e DHGNA	32
2.4.3 Ácidos graxos monoinsaturados e DHGNA	33
2.4.4 Ácidos graxos poli-insaturados e DHGNA	35
2.5 Composição de ácidos graxos em tecidos e fluidos biológicos na DHGNA	41
2.6 Avaliação do consumo alimentar	46
3 JUSTIFICATIVA	48
4 OBJETIVOS	49
4.1 Objetivo geral	49
4.2 Objetivos específicos	49
5 CASUÍSTICA E MÉTODOS	50
5.1 Delineamento do estudo	50
5.2 Local do estudo	50
5.3 Amostra	50

5.4 Desenho do estudo 51

5.5 Avaliação da fibrose hepática pela elastografia transitória hepática 51

5.6 Avaliação Antropométrica 52

5.7 Avaliação do consumo alimentar 55

5.8 Avaliação dos parâmetros bioquímicos 56

5.9 Identificação dos ácidos graxos 56

5.10 Metodologia de Análise de Dados 58

5.11 Qualidade dos dados 58

5.12 Aspectos Éticos 58

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO 59

6.1 MANUSCRITO 60

7 CONCLUSÃO 80

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 81

ANEXOS 92

1 INTRODUÇÃO

A DHGNA é considerada atualmente a causa mais comum de doença hepática crônica nos Estados Unidos em adultos. É definida como o acúmulo de lipídios a partir de triglicerídeos (TG) no interior dos hepatócitos, excedendo a 5% do peso do fígado em indivíduos cuja ingestão diária de álcool é inferior à 20g em mulheres e menor que 30g nos homens (RAHIMI; LANDAVERDE, 2013; HASHIMOTO et al., 2013; MASARONE et al., 2014; MILIĆ et al., 2014). Compreende desde esteatose hepática (EH), esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) com ou sem fibrose, cirrose e hepatocarcinoma celular (LUDWIG et al., 1980; MATTEONI et al., 1999; FALCK-YTTER et al., 2001).

Estudos epidemiológicos demonstram que o número de indivíduos afetados pela doença vem aumentando consideravelmente, atingindo proporções epidêmicas (WILLIAMS et al., 2011; COTRIM et al., 2011). A epidemia da obesidade e suas comorbidades (diabetes melittus tipo 2 (DM2) e dislipidemias) justificam em parte, a ascensão na prevalência da DHGNA associada ao aumento da síndrome metabólica (SM) (VITTURI et al., 2014).

Os principais mecanismos envolvidos no desenvolvimento da DHGNA são principalmente a obesidade central, lipogênese *de novo* (LDN) e resistência à insulina (RI). No entanto, os hábitos alimentares também são considerados fatores de agressão e sobrecarga hepática (RAMADORI et al., 2015; GORDEN et al., 2015). O processo de transição nutricional e epidemiológica que vem ocorrendo no mundo corrobora o impacto da dieta sobre a saúde. As modificações na dieta ocidental, envolvendo as fontes alimentares de lipídios, levaram ao aumento do consumo de gorduras totais, de ácidos graxos saturados (AGS), ácidos graxos poli-insaturados ômega-6 (AGPI n-6) e ácidos graxos *trans* (AG *trans*) e à redução do consumo de AGPI ômega-3 (SESSLER et al., 1998; SIMOPOULOS, 1999; SIMOPOULOS, 2006; GAINO et al., 2012).

O consumo elevado de AGS tem sido associado ao estresse oxidativo e desregulação nos fatores de transcrição e a enzimas envolvidos na lipogênese que exacerbam a RI e favorecem o acúmulo de gordura nos hepatócitos. Assim como o baixo consumo de AGPI n-3 e em particular a desproporção na relação n-6/n-3 aumenta o dano hepático por meio de uma cascata metabólica culminando na progressão da

DHGNA (ARAYA et al., 2004; GENTILE; PAGLIASSOTTI, 2008; PETIT et al., 2012).

Para conhecer os hábitos alimentares e quantificar o consumo dietético de ácidos graxos (AG) comumente são utilizados métodos indiretos como questionário de frequência alimentar (QFA), registro alimentar (RA) e recordatório de 24 horas (R24h) (COSTA et al., 2006; HEDRICK et al., 2012; CORELLA; ORDOVÁS, 2015). No entanto, para avaliar a fidedignidade das informações obtidas por esses instrumentos têm sido utilizadas medidas objetivas como, marcadores biológicos de ingestão lipídica que refletem o consumo de AG pela composição dos mesmos em fluidos biológicos ou tecidos. Esse método apresenta melhor acurácia comparado aos inquéritos alimentares por não possuir vieses de memória ou erro na estimativa da ingestão alimentar (ELIZONDO et al., 2007; TAKKUNEN et al., 2013; SCHUCHARDT; HAHN, 2013).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Etiologia e prevalência

A obesidade é o principal fator de risco para a DHGNA associada a RI, e DM2. A real prevalência da DHGNA não é conhecida, no entanto, sabe-se que o número de indivíduos afetados pela doença vem aumentando consideravelmente, atingindo proporções epidêmicas. Nos paises do ocidente a prevalência estimada é de 20% a 30%, nos paises Ásiaticos varia entre 5 a 18%. No Brasil, a prevalência observada foi de 18,1 e 19,2%, utilizando a ultrassonografia abdominal (USG) como método de diagnóstico. Contudo, essas taxas podem sofrer variações devido a fatores geográficos e métodos utilizados para o diagnóstico como, exames de imagem ou biópsia (LAZO, 2008; BELLENTANI, et al., 2010; COTRIM, et al., 2011).

De modo geral, a prevalência de DHGNA em indivíduos eutróficos sem a presença de fatores de risco metabólico é de aproximadamente 16%, aumentando para 43-60% em pacientes com diabetes chegando a 90% em pacientes obesos submetidos à cirurgia bariátrica. Estudos sugerem o gênero masculino assim como idade acima de 60 anos fatores de risco para desenvolvimento da DHGNA e progressão para EHNA e fibrose (THAN; NEWSOM, 2015).

O Dallas Heart Study uma coorte de base populacional realizado em uma comunidade etnicamente diversificada nos Estados Unidos revelou uma prevalência de 30%, ou seja, cerca de 70 milhões dos adultos americanos apresentam DHGNA. Outra coorte de base populacional realizado em duas comunidades do norte da Itália o Dionysos Study demonstrou que 25% aproximadamente 15 milhões de italianos têm DHGNA (BELLENTANI et al., 1994; BROWNING, 2006).

2.2 Fisiopatologia da DHGNA

A fisiopatologia da DHGNA é bastante complexa e diversos fatores estão envolvidos nesse processo principalmente a obesidade central, RI e LDN. Existem ainda outras causa menos prevalentes como, o uso de algumas medicações, nutrição parenteral total, defeitos genéticos no metabolismo lipídico, perda rápida de peso e cirurgia de *bypass* jejunoileal. (COTRIM, et al., 2005; CHALASANI, et al., 2012; WGO Global Guidelines, 2012).

Day e James (1998) propuseram o modelo (t*wo-hit hypothesis*) para explicar patogênese da DHGNA. No *first hit* é caracterizado pelo acúmulo no interior dos hepatócitos, devido a RI, consumo elevado de carboidratos e LDN. No s*econd hit* a peroxidação lipídica, disfunção mitocondrial e a inflamação desempenham um papel fundamental no desenvolvimento da fibrose hepática (DAY; JAMES, 1998; THAN; NEWSOM, 2015).

2.2.1 Resistência à insulina

A RI tem sido considerada condição inicial para o desenvolvimento da DHGNA. A insulina exerce um papel fundamental no metabolismo dos carboidratos reduzindo a glicemia favorecendo a utilização de glicose pelo músculo e reduzindo sua produção e liberação pelo fígado. No metabolismo lipídico, a insulina promove o armazenamento de TG no tecido adiposo e reduz a liberação dos ácidos graxos livres (AGL) na circulação sanguínea (ANDERSON; BORLAK, 2008; CUSI, 2009; BYRNE, 2010; MILIĆ et al., 2014; THAN; NEWSOM, 2015).

Em condições de RI, a insulina é incapaz de suprimir a ação da lipase hormônio sensível (LHS) acarretando em lipólise nos tecidos periféricos, principalmente no tecido adiposo e visceral ocasionando a liberação de AGL para circulação portal com consequente aumento do aporte desse substrato para fígado. No tecido hepático, a RI leva a ativação da proteína ligadora do elemento regulado por esteróides (SREBP-1c) aumentando a síntese hepática de AG. Em condições normais, o fígado exporta o excesso de TG para outros tecidos pela lipoproteína de muita baixa densidade (VLDL) que são formadas pela Proteína Microssomal Transferidora de Triglicerídeos (MTP) que a incorpora à apolipoproteína B (apoB). Entretanto, a RI promove o aumento da degradação intracelular da VLDL e da apolipoproteina B-100 (apoB-100), bloqueando a exportação dos TG do fígado pela VLDL (ANDERSON; BORLAK, 2008; CUSI, 2009; LEE et al., 2015).

2.2.2 Lipogênese *de novo*

A LDN é uma via enzimática que converte o excesso de carboidratos simples a TG no fígado contribuindo para aumento do influxo e armazenamento de lipídios nos hepatócitos (JENSEN-URSTAD; SEMENKOVICH, 2012; SANDERS; GRIFFIN, 2015). O excesso de carboidrato da dieta e a hiperinsulinemia ativam dois fatores nucleares importantes para lipogênese, a SREBP-1c que ativa enzimas lipogênicas e a

proteína ligadora do elemento regulado por carboidrato (ChREBP) ativada pela glicose, regulando sua entrada no núcleo e promovendo sua ligação com o elemento responsivo a carboidrato (ChoRE) que se encontra na região promotora dos genes de enzimas importantes na lipogênese (MOORE et al., 2014; SANDERS; GRIFFIN, 2015).

2.3 Fibrose e DHGNA

Na DHGNA muitos indivíduos permanecem durante anos apenas com EH, no entanto, podem evoluir para EHNA com ou sem fibrose elevando o risco de progressão para cirrose, hepacarcinoma celular e falência hepática. A fibrose hepática ocorre devido em consequências à processos regenerativos gerados em resposta ao insulto hepático persistente. Caracteriza-se pelo acúmulo dos constituintes da matriz extracelular (MEC), predominantemente do colágeno do tipo I no espaço de Disse gerando modificações na conformação dos sinusóides e redução de suas fenestrações, denominado “capilarização”(FRIEDMAN, 2000; TSUKADA et al., 2006; FRIEDMAN, 2008; PINZANI, 2015).

As células hepáticas estreladas (CHE) também conhecidas com células de ITO armazenam gorduras e vitamina A e constituem a principal fonte de MEC na formação da fibrose hepática. Sob estímulos de citocinas fibrogênicas, fator de transformação do crescimento-beta (TGF-β), fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α), fator de crescimento derivado de plaquetas e outras, as CHE se diferenciam em miofibroblasto e fibroblasto, aderindo-se na ativa síntese dos elementos da matriz (colágenos, elastina, proteoglicanos e proteínas de constituição) (ALBANIS; FRIEDMAN, 2000; XU et al., 2012).

Diversos métodos são utilizados para quantificar o grau de fibrose, a biópsia hepática é considerada “padrão ouro” e é capaz de definir o espectro histológico do fígado, entretanto, trata-se de um procedimento invasivo com possibilidade de complicações e desconforto ao paciente. Sua precisão diagnóstica torna-se limitada devido ao tamanho do fragmento coletado, representando apenas 1/25000 – 1/50000 do total do fígado e a variabilidade inter-observador (MIELE et al., 2007; ALSHAALAN et al., 2015).

Recentemente, tem sido utilizado um método não invasivo, a elastografia transitória hepática (ETH) que utiliza um sistema de ultrassom para avaliar a rigidez do fígado e quantificar o grau fibrose hepática utilizando o FibroScan®. Trata-se de um exame indolor, reprodutível, rápido e o resultado independe do operador. O aparelho de

FibroScan® é composto por uma sonda, um sistema eletrônico e uma unidade de controle. A sonda contém um vibrador de baixa frequência que no seu eixo tem um transdutor de ultrassom com frequência superior à das ecografias correntes sendo de 3,5 MHz (SANDRIN et al., 2003; SHEN et al., 2014; ALSHAALAN et al., 2015).

O dispositivo é baseado na elastografia transitória unidimensional (1D), técnica que utiliza ondas elásticas (50 Hz) e de ultrassom de baixa frequência (5 MHz). A velocidade de propagação está diretamente relacionada com a elasticidade, ou seja, quanto mais endurecido estiver o fígado mais rapidamente as ondas são propagadas. O resultado é expresso em kilopascals (kPa) e podem variar de 2,5 a 75,0kPa. São determinadas ainda a taxa de sucesso do exame, que é calculada pelo número de medidas válidas dividido pelo número total de aquisições. Para que o resultado seja considerado confiável são necessárias 10 aquisições corretas. Outro parâmetro importante é o intervalo interquartil (IQR), que reflete a variabilidade das medidas, e que não deve exceder 20 a 30% do valor final da mediana (SANDRIN et al., 2003; WONG, 2013).

2.4 Lipídios e DHGNA

Os AG são cadeias de hidrocarbonetos com um grupo carboxila ao final da cabeça da cadeia e um grupo metila ao final da cauda da cadeia. Estes constituem a principal fonte de energia na alimentação e desempenham importantes funções metabólicas, estruturais e funcionais no corpo. Estão presentes em todas as membranas celulares e atuam nos processos de sinalização intracelular, nos processos metabólicos e na produção de eicosanóides. Como componentes principais dos fosfolipídios celulares os AG regulam as propriedades físico-químicas de fluidez e plasticidade das membranas e influenciam na conformação, mobilidade e função das proteínas transmembranas (CURY et al., 2002; LEHNINGER, 2006; CALDER, 2006; RATNAYAKE; GALLI, 2009; CALDER, 2011).

Os AG são classificados quanto ao número de carbonos na cadeia e o tipo de ligação entre os carbonos. Os AGS são os que possuem ligações simples entre os carbonos da cadeia, enquanto os ácidos graxos insaturados: monoinsaturado apresentam apenas uma dupla ligação ou poli-insaturados com duas ou mais duplas ligações entre os carbonos (RATNAYAKE; GALLI, 2009; PERINI et al., 2010).

O perfil de lipídios da dieta tem sido considerado modulador da sensibilidade à insulina e preditor para o desenvolvimento ou agravamento de desordens metabólicas

como: obesidade, DM tipo 2, SM e DHGNA. Evidências atuais sugerem que o excesso de AGS e AG *trans* contribuem para o desenvolvimento e/ou progressão da DHGNA, pois o excesso desses AG promove estresse do retículo endoplasmático levando a apoptose e lesão hepatocelular (WEI et al., 2007; GENTILE et al., 2011; LAKE et al., 2014; RAMADORI et al., 2015).

Em contrapartida, estudos têm demonstrado que a suplementação com AGPI n-3 rico em ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosahexaenoico (DHA) promove melhora no perfil lipídico, modulação da inflamação, redução da infiltração gordurosa e dano hepático refletindo na redução das transaminases, nos níveis de glicemia de jejum, ácidos graxos não esterificados (AGNE) e do TNF-α assim como na melhora e regressão do grau de EH (CAO et al., 2006; GENTILE; PAGLIASSOTTI, 2008).

2.4.1 Ácidos graxos saturados e DHGNA

Os AGS tem o ponto de fusão mais alto e por isso encontram-se na forma sólida em temperatura ambiente. Estes AG são classificados em quatro subclasses de acordo com o comprimento de cadeia: curta com 3 a 7 átomos de carbonos representados principalmente pelo ácido butírico (C4:0) e o ácido capróico (C6:0) presentes principalmente na gordura do leite. Os AG de cadeia média com 8 a 13 átomos de carbono como o ácido capróico (C8:0), o ácido cáprico (C10:0) também encontrados na gordura do leite e o ácido láurico (C12:0) presente no óleos de coco e de palma. Os de cadeia longa contendo de 14 a 20 átomos de carbono como o ácido mirístico (C14:0) encontrado no leite e derivados, o palmítico (C16:0), cuja principal fonte é o óleo de palma e o esteárico (C18:0) presente na gordura animal, e por último os ácidos graxos de cadeia muito longa com 21 ou mais átomos de carbono, representados pelo ácido behênico (C22:0) e o ácido lignocérico (C24:0), estes são os mais comuns na dieta humana, entretanto com baixos níveis nos alimentos (Quadro 1) (ASAKURA et al., 2000; RATNAYAKE; GALLI, 2009).

Quadro 1: Ácidos graxos saturados e suas principais fontes alimentares.

	Tipo de cadeia	**Nome comum**	**Abreviação**	**Fonte alimentar**
Ácidos graxos saturados	Cadeia curta	Butírico Capróico	C4:0 C6:0	Manteiga Óleo de coco, Óleo de palma Gordura de origem animal,
	Cadeia média	Capróico Cáprico Láurico	C8:0 C10:0 C12:0	
	Cadeia longa	Mirístico Palmítico Esteárico	C14:0 C16:0 C18:0	
	Cadeia muito longa	Behênico Lignocérico	C22:0 C24:0	

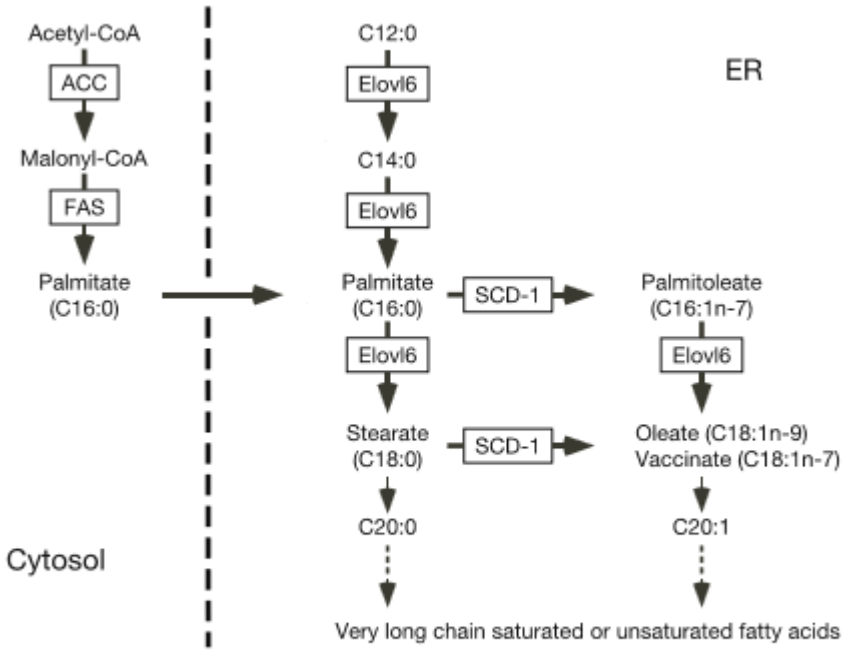
Fonte: Ratnayake; Galli, (2009).

De modo geral, o consumo elevado de AG desempenha importante papel na progressão da EH para EHNA. Estudos experimentais sugerem que, o estresse oxidativo emergente e o aumento da saturação de lípidos de membrana desencadeiam estresse do retículo endoplasmático (RE). Esse insulto interfere no metabolismo lipídico hepático favorecendo a lipogênese e limitando a síntese e secreção da VLDL. Além disso, promove ativação do fator nuclear-kappa βeta (NF-kβ) e do Jun N-kinase (JNK), que participam ativamente do processo inflamatório e apoptose celular (WANG et al., 2006; LICHTENSTEIN, 2006; WEI et al., 2007; GENTILE; PAGLIASSOTTI, 2008; HUNTER et al., 2010).

Estudos apontam o ácido palmítico como o AGS com maior potencial citotóxico para o fígado, promovendo depleção de cálcio no retículo endoplasmático (RE), induzindo o estresse dessa organela levando a apoptose e ocasionando progressão da DHGNA (WANG; WEI; PAGLIASSOTTI, 2006; PFAFFENBACH et al., 2010; LEAMY; EGNATCHIK; YOUNG, 2013). Altos níveis de ácido palmítico têm sido encontrados no plasma, eritrócitos e tecido hepático de pacientes com DHGNA comparado a controles saudáveis, corroborando a lipotocixidade hepática excercida por esse AG (PURI et al., 2009; PETIT et al., 2012; YAMADA et al., 2015).

O possível mecanismo para o aumento do conteúdo do ácido palmítico seria, o elevado consumo de alimentos ricos nesse AG que é abundante na dieta humana (RATNAYAKE; GALLI, 2009) ou devido ao aumento da LDN frente à resposta da RI. A RI ativa o fator de transcrição da SREBP-1c que controla a síntese de enzimas lipogênicas como acetil-CoA carboxilase (ACC), ácido graxo sintase (FAS), estearoil-CoA dessaturase (SCD-1), elongase de ácidos graxos de cadeia muito longa 6 (ELOVL6) (AHMED; BYRNE, 2007; KUMADAKI et al., 2008). Desse modo, hiperinsulinemia presente na RI exacerbam a ativação da SREBP-1c aumentando a lipogênese que tem como produto final o ácido palmítico, considerado um possível biomarcador de LDN em seres humanos (HUDGINS et al., 2011).

Contudo, tem sido sugerido que essa tocixidade possa ser minimizada pela conversão de AGS em ácidos graxos monoinsaturados (AGM). Esse mecanismo ocorre pela elongação do ácido palmítico em esteárico por da enzima ELOVL6 e pela dessaturação dos ácidos palmítico e esteárico à palmitoleico e oleico, respectivamente mediado pela enzima SCD-1 (LISTENBERGER et al., 2003).



Fonte: Adaptado de Matsuzaka; Shimano (2009).

Figura 1: Síntese de ácidos graxos saturados e monoinsaturados pelas enzimas ELOVL6 e SCD-1. ACC acetil-CoA carboxilase, FAS ácido graxo sintase, SCD-1

estearoil-CoA dessaturase-1, ELOVL6 elongase de ácidos graxos de cadeia muito longa 6, ER retículo endoplasmático.

Wang et al. (2006) demonsataram que uma dieta rica em gordura saturada administrada em animais experimentais resultou em lesão significativa do fígado, maior susceptibilidade à endotoxina, e uma capacidade proliferativa hepática reduzida, comparada à uma dieta rica em gordura insaturada, que apesar de níveis semelhantes de acumulo TG hepática não induziu dano hepático.

A recomendação para consumo de AGS segundo Third Report of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP ATP III) é até 7% do Valor Energético Total (VET).

2.4.2 Ácidos graxos *trans* e DHGNA

Os AG *trans* são isômeros geométricos de ácidos graxos cis, com a mesma forma molecular, mas diferente em sua estrutura. Na dupla ligação *trans*, os dois átomos de hidrogênio ligados aos de carbono estão localizados em lados opostos da cadeia carbônica, formando uma molécula linear mais rígida semelhante à de um AGS. São sintetizados pela fermentação de bactérias em ruminantes, encontrados em quantidades insignificantes na carne e no leite ou, a partir do processo de hidrogenação catalítica dos óleos vegetais com o objetivo de aumentar sua estabilidade e diminuir a viscosidade. A principal fonte de AGT na dieta é a gordura vegetal hidrogenada, utilizada no preparo de produtos industrializados como, sorvetes cremosos, chocolates, pães recheados, molhos para salada, sobremesas cremosas, biscoitos recheados, alimentos com consistência crocante (nuggets, croissants, tortas) e margarinas (CURY et al., 2002; RATNAYAKE; GALLI, 2009; GAGLIARDI et al., 2009).

Essa classe de lipídios são absorvidos rapidamente e incorporados na maioria dos tecidos em concentrações que aparentemente refletem o conteúdo dos mesmos na dieta. Estes competem com o metabolismo dos ácidos graxos essenciais pela inibição na incorporação da membrana fosfolipídica e pela redução da conversão dos ácidos graxos essenciais para os eicosanóides em diferentes células animais. Tal processo ocorre, pois os AGT inibem a enzima Δ6-dessaturase, que catalisa o estágio inicial da taxa limitante da dessaturação do ácido linoleico (AL) e do ácido α-linolênico (AAL), enquanto que nos óleos marinhos, pela presença de EPA e DHA, ocorre a inibição das enzimas Δ5 e

Δ6-dessaturases. (KIRSTEIN et al., 1983; BRETILLON et al., 1998; MAHFOUZ; KUMMEROW, 1999).

Em adição, o consumo elevado de AGT está relacionado à incidência de doenças cardiovasculares, RI, obesidade e inflamação sistêmica. Esse efeito é explicado em parte, devido à redução da lipoproteína de alta densidade (HDL), aumento da lipoproteína de baixa densidade (LDL), aumento do TG e da lipoproteína a. Contudo, pouco se sabe sobre a influência dos AG *trans* sobre o metabolismo lipídico na DHGNA em humanos. Estudos em modelo animal demonstram que a ingestão dessa classe lipídica promove acúmulo de gordura hepática semelhante à DHGNA (GHAFOORUNISSA, 2005; SARAVANAN et al., 2005; TETRI et al., 2008; MACHADO et al., 2010).

Não há consenso em relação à quantidade máxima permitida na dieta, no entanto, recomenda-se ingestão inferior à 1% das calorias totais da dieta de gordura *trans* (NCEP, 2002).

2.4.3 Ácidos graxos monoinsaturados e DHGNA

Os AGM são representados principalmente pelo ácido oleico (AO, C18:1 n-9), encontrado no óleo de oliva, abacate e nozes (Quadro 2). Essa classe de lipídios apresentam efeitos benéficos nas doenças cardiovasculares, pois promovem redução no colesterol total, a LDL oxidada e reduzem os níveis de TG sem alterar as concentrações de HDL. Estudos demonstram que, a substituição de AGS e de carboidratos por AGM ocasionam uma redução na glicemia de jejum, na pressão arterial e aumento da HDL em pacientes DM2 e com DHGNA (ZIVKOVIC et al., 2007; RATNAYAKE; GALLI, 2009; ZELBER-SAGI et al., 2011).

Quadro 2: Ácidos graxos monoinsaturados e suas principais fontes alimentares.

		Nome comum	Abreviação	Fonte alimentar
Ácidos graxos monoinsaturados	Ômega-9	Oleico	C18:1 n-9	Azeite oliva, abacate e nozes.

Fonte: Ratnayake; Galli, (2009).

Uma meta-análise de estudos randomizados demonstrou em indivíduos diabéticos que, uma dieta rica em AGM ocasiona melhora nos perfis de lipoproteínas e no controle glicêmico comparado a uma dieta com baixo teor de AGS e a dietas ricas em carboidratos. Dietas ricas AGM reduzem os TG plasmáticos e as concentrações de VLDL colesterol em 19% e 22%, respectivamente (GARG, 1998).

Os estudos tem demonstrado redução dos marcadores de lesão hepática, do grau de RI e do grau de EH com a dieta do mediterrâneo na DHGNA e em pacientes obesos com DM tipo 2 ambos fatores de risco para desenvolvimento da DHGNA (FRASER et al., 2008; TZIMA et al., 2009; PÉREZ-GUISADO et al., 2011; RYAN et al., 2013; KONTOGIANNI et al., 2013). Cabe ressaltar que o azeite tem sido tradicionalmente o principal óleo da dieta do mediterrâneo.

Quadro 3: Resumo das principais publicações sobre o efeito da dieta do mediterrâneo na DHGNA.

Autor/ano	Desenho do estudo	População de estudo	Intervenção	Resultados
Fraser et al., 2008	Análise post-hoc randomizado	259 obesos com DM	Dieta ADA Dieta baixo IG Dieta M	Dieta M ↓ as enzimas hepáticas em 6 e 12 meses comparada as outras dietas
Pérez-Guisado et al., 2011	Estudo prospectivo	14 obesos com DHGNA	DCME	DCME → ↓ das enzimas hepáticas e do grau da EH
Ryan et al., 2013	Randomizado cross-over intervenção dietética	12 DHGNA não diabéticos	Dieta M Dieta BTG/ATC	Dieta M ↓ a EH e melhorou a sensibilidade à insulina

Kontogianni et al., 2013	Estudo transversal	73 DHGNA	-	> adesão à dieta M = < gravidade DHGNA e < grau de RI

ADA: Associação Americana de Diabetes; IG: índice glicêmico; Dieta M: dieta do mediterrâneo; DCME: dieta cetogênica mediterrânea espanhola; Dieta BTG/ATC: baixo teor de gorduras/alto teor de carboidratos; DM: diabetes mellitus; DHGNA: doença hepática gordurosa não alcoólica.

Adicionalmente, o consumo AGM reduz a lipogênese e aumenta a oxidação de AG via ativação do peroxisome proliferator-activated receptor-alfa (PPAR-α) e redução da ativação do SREBP-1c (ASSY et al., 2009). Contudo, estudos envolvendo os efeitos dos AGM sobre a deposição de gordura hepática devem ser interpretados com cautela, pois é dificil distiguir o AO proveniente da dieta do produto da LDN (GUILLOU et al., 2010). O NCEP ATP III recomenda o consumo de até 20% do VET para AGM.

2.4.4 Ácidos graxos poli-insaturados e DHGNA

Os AGPI apresentam duas ou mais duplas ligações sendo caracterizados pela localização das mesmas. São considerados ácidos graxos essenciais (AGE) das famílias n-6 (AL, C18:2 n-6) e n-3 (AAL, C18:3 n-3), pois não são sintetizados pelo organismo necessitando consumo pela alimentação para suprir sua demanda. As principais fontes alimentares dos AGPI n-6 e n-3 são os óleos vegetais, como óleo de soja, castanhas, sementes, peixes (atum, cavala, arenque, salmão, truta, sardinha, pescada) e óleo de peixe, respectivamente (Quadro 4) (CALDER, 2011).

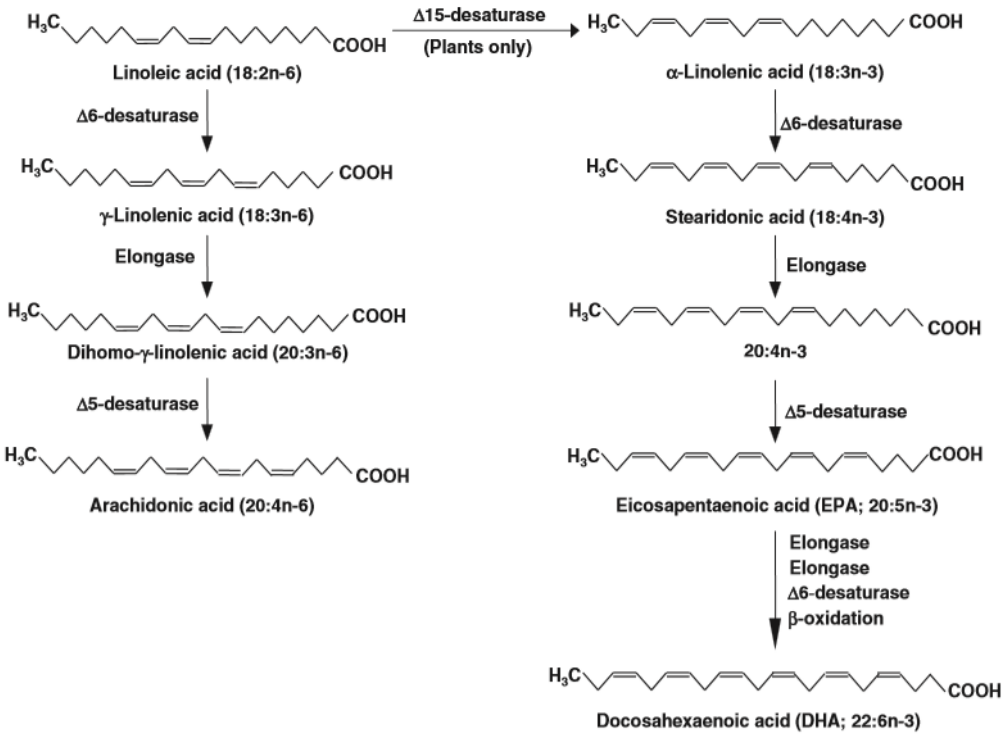
Quadro 4: Ácidos graxos poli-insaturados e suas principais fontes alimentares.

		Nome comum	**Abreviação**	**Fonte alimentar**
Ácidos graxos poli-insaturados	Ômega-6	Ácido linoleico	C18:2 n-6	Castanhas, sementes, óleos vegetais (óleo de milho e soja)
	Ômega-3	Ácido alfa	C18:3 n-3	Óleos de peixe, canola, soja e linhaça, peixes

		linolênico		(sardinha, pescada, cavala, truta, arenque, salmão e atum)

Fonte: Ratnayake; Galli, (2009).

Na cascata metabólica dos AGPI AL e AAL sofrem reações das enzimas dessaturase e elongase. As elongases atuam adicionando dois átomos de carbono à parte inicial da cadeia, e as dessaturases agem oxidando dois carbonos da cadeia, originando uma dupla ligação com a configuração *cis*. Essas reações enzimáticas acontecem principalmente no retículo endoplasmático das células hepáticas dando origem a AGPI de cadeia longa (AGPI-CL). O metabolismo desses AG é bastante competitivo, pois as dessaturases (Δ9, Δ6 e Δ5) apresentam afinidades distintas em relação ao número e à posição das duplas ligações e ao tamanho da cadeia (poli-insaturados > monoinsaturados; n3>n6>n9=n7; cadeia mais longa>cadeia mais curta) (SIGUEL; MACLURE, 1987; PAWLOSKY et al., 2003).

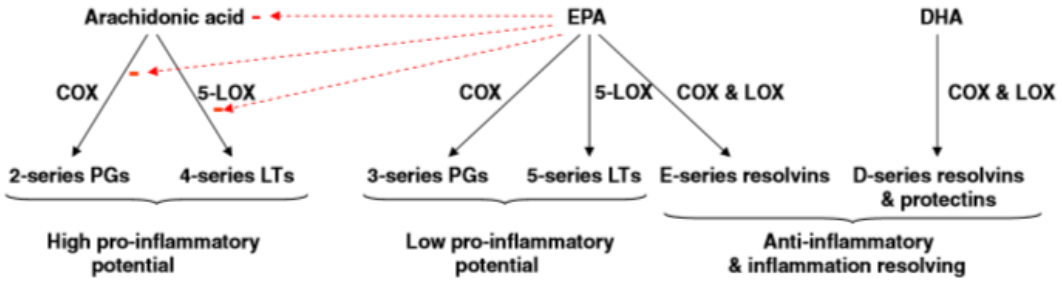


Fonte: Calder (2011).

Figura 2: Vias da biossíntese dos ácidos graxos poli-insaturados n-6 e n-3.

O AL é precursor do ácido dihomo-γ-linolênico (20:3 n-6) e do ácido araquidônico (AA 20:4 n-6) que possuem funções estruturais e regulatórias, com relação ao AAL seus precursores são os ácidos (EPA, C20:5 n-3) e (DHA, C22:6 n-3). Os AA, EPA e o DHA, são precursores de eicosanoides da série par e impar, respectivamente. Esses eicosanoides são sintetizados pela ação das enzimas cicloxigenase (COX) e lipooxigenase (LOX), que converte esses ácidos graxos em prostaglandinas (PGE), tromboxanos (TxB) e leucotrienos (LTB). O EPA e o DHA são metabolizados pela COX-2 e LOX-5 originando eicosanoides como PGE3, LTB5, TXB3, resolvinas da série D, protectinas D1, respectivamente e ambos apresentam ação potencialmente anti-inflamatória (BEHROUZIAN; BUIST, 2003; CALDER, 2006).

Em contrapartida o AA é degradado pelas enzimas COX-1, COX-2 e LOX-5, dando origem a PGE2, LTB4 e TxB2, os quais são importantes eicosanoides pró-inflamatórios e potente vasoconstritor e agregador plaquetário. Desse modo, o desequilíbrio na relação entre a ingestão diária de alimentos fontes de AGPI n-6 e n-3 assume grande importância na produção de eicosanoides que influencia modulando a intensidade e duração de processos inflamatórios, pois apesar da afinidade das enzimas dessaturase e elongase pelos ácidos da família n-3, a conversão do AAL em AGPI-CL é fortemente influenciada pelos níveis de AL da dieta (BEHROUZIAN; BUIST, 2003; RATNAYAKE; GALLI, 2009).



Fonte: Calder (2011).

Figura 3: Mecanismo de síntese e ação de mediadores lipídicos produzidos a partir do ácido araquidônico, EPA e DHA. COX, ciclooxigenase; LOX, lipoxigenase; LT, leucotrieno; PG, prostaglandina.

Estudos demonstram que suplementação de AGPI n-3 reduz a concentração plasmática de TG, enzimas hepáticas, glicemia de jejum, TNF-α e o grau de EH (SCHMITZ; ECKER, 2008; SHAPIRO, 2011). O impacto e a segurança da

suplementação de 2700mg/dia de EPA altamente purificado foram avaliados em 23 pacientes com EHNA comprovada por biópsia em um período de 12 meses. Tanaka et al. (2008) observaram melhora significativa nos níveis de alanina aminotransferase (ALT) (79 ± 36-50 ± 20 U/L), redução nos AGL, TNF-α, ferritina sérica e tireodoxina. Não foram observadas alterações no peso corporal, glicemia de jejum, insulina e adiponectinas. Cabe ressaltar que, 7 dos 23 pacientes consentiram em realizar nova biópsia após o período de intervenção demonstrando melhora da fibrose, balonização do hepatócito e inflamação lobular em 6 desses pacientes.

Outros estudos corroboram esses resultados, Capanni et al. (2006) analisaram os efeitos da suplementação com AGPI n-3 em pacientes com DHGNA e demonstraram que, a suplementação com 1g de óleo de peixe/dia por 12 meses, reduziu significativamente as concentrações plasmáticas de TG, enzimas hepáticas, glicemia de jejum, e o grau de EH. Ao aumentar a dose da suplementação para 2g de óleo de peixe ao dia, ocorreu redução dos níveis de TNF-α e regressão da EH avaliada pela USG, após seis meses de suplementação.

Spadaro et al. (2008) randomizaram 40 pacientes com DHGNA em dois grupos. O grupo 1 recebeu um plano alimentar com base nas recomendações da American Heart Association com a seguinte distribuição: (o VET foi calculado utilizando uma faixa de 25-30 kcal/kg e distribuídos em 50% de carboidratos, 20% de proteínas e 30% de lipídios). O grupo 2 recebeu além do mesmo plano alimentar a suplementação de 1 cápsulas contendo 1g de AGPI/2 vezes ao dia, ambos os grupos foram acompanhados por um período de 6 meses. Após a intervenção, houve redução dos níveis de ALT e TG ($p<0,01$), TNF-α e *homeostatic model assessment* (HOMA-IR) ($p<0,05$) bem como, regressão completa na EH em 33,4% e 50% no grau de EH no grupo 2, enquanto que no grupo 1 não houve regressão completa da EH e apenas 27,7% apresentaram melhora no grau da doença.

Recentemente, Nogueira et al. (2015) suplementaram 40 pacientes com DHGNA por 6 meses com suplemento com mix de óleo de peixe e óleo de linhaça, totalizando 64% de AAL, 16% de EPA e 21% de DHA. A suplementação ocasionou uma redução dos níveis plasmáticos de TG e melhora histológica hepática. Não há consenso na literatura científica quanto aos valores recomendados para relação entre os ácidos graxos n-6/n-3 na dieta. No Canadá, a relação n-6/n-3 proposta pela Scientific Review Committe, é de 4:1 - 10:1. Já nos Estados Unidos, recomenda-se a relação de 2:1 - 3:1, e a World Health Organization (WHO) e Food and Agriculture Organization (FAO)

recomendam uma proporção de 5:1 - 10:1 (SRC, 1990; SIMOPOULOS; LEAF; SALEM, 1999; WHO, 1995).

Quadro 5: Resumo das principais publicações sobre o efeito da suplementação de AGPI n-3 nos pacientes com DHGNA.

Autor/ano	Descrição do estudo	Objetivo	Intervenção	Resultados
Capanni et al., 2006	56 DHGNA divididos em: 42 *GI 14 **GC	Avaliar a eficácia da suplementação de óleo de peixe em pacientes com DHGNA	1g de óleo de peixe/12 meses/ ↑ 2g de óleo de peixe por mais 6 meses, ambos 1 vez ao dia	1ª intervenção: ↓ significativamente [ ] plasmáticas de TG, enzimas hepáticas, glicemia de jejum, grau de EH. 2ª intervenção: ↓ do TNF-α e regressão da EH avaliada pela USG.
Tanaka et al., 2008	23 EHNA	Avaliaram a eficácia e segurança da suplementação de EPA na EHNA	2,7g de EPA/dia por 12 meses	Melhora significativa nos níveis de ALT (79 ± 36-50 ± 20 U/L), ↓ nos AGLs, TNF-α, ferritina sérica e tireodoxina. Sem alterações: peso corporal, glicemia de jejum, insulina e adiponectinas. 7

				dos 23 realizaram nova biópsia após o período de intervenção, houve melhora da fibrose, balonização do hepatócito e inflamação lobular em 6 desses pacientes.
Spadaro et al., 2008	40 DHGNA divididos em 2 grupos: G1 (20) G2 (20)	Investigar se a suplementação de AGPI é efetiva no tratamento da DHGNA	G1- recebeu: 25-30 kcal/kg e 50% de [1]CHO, 20% de [2]PTN e 30% de [3]LIP) G2- Idem a G1 +1 cápsulas contendo 1g de AGPI/2 vezes dia ambos por 6 meses	↓ dos níveis de ALT e TG (p<0,01), TNF-α e HOMA-IR (p<0,05) bem como, regressão completa na EH em 33,4% e 50% no grau de EH no G2, enquanto que no G1 não houve regressão completa da EH e apenas 27,7% apresentaram melhora no grau da doença.
Nogueira et al., 2015	40 DHGNA	Avaliar a eficácia da suplementação AGPI n-3 no	1 cápsulas 0,315g n-3 (64% de AAL, 16% de EPA e	↓ níveis plasmáticos de TG e melhora histológica

		tratamento da DHGNA com ênfase na histologia hepática.	21% de DHA) 3 cápsulas/dia.	hepática.

*GI- grupo intervenção; **GC- grupo controle, [1]CHO- carboidratos, [2]LIP- lipídios, [3]PTN- proteínas.

2.5 Composição de ácidos graxos em tecidos e fluidos biologicos na DHGNA

A avaliação do consumo alimentar, especialmente de gorduras, geralmente é realizada utilizando métodos de inquérito alimentar, como QFA, RA e R24h. Entretanto, esses métodos de análise de consumo alimentar são considerados indiretos e apresentam limitações na coleta de informações podendo super ou subestimar informações por parte tanto do entrevistado com pelo entrevistador (WESTERTERP; GORIS, 2002).

Medidas objetivas como marcadores biológicos de ingestão representam uma alternativa para comparar a fidedignidade das informações obtidas por esses métodos. A composição de AG do plasma, de eritrócito e do tecido adiposo tem sido utilizada como instrumento na avaliação objetiva do perfil de gorduras consumida pelos indivíduos, porém, a avaliação eritrocitária apresenta vantagem comparado ao plasma por refletir uma ingestão a médio prazo e, comparado ao tecido hepático por não apresentar o incomodo do procedimento para retirada do fragmento (ANDERSEN et al., 1999; SUN et al., 2007).

Com relação à população estudada, ainda são poucos os estudos relacionados a essa temática. Zheng et al. (2012) investigaram a associação entre a composição de ácidos graxos de fosfolipídios plasmáticos e o risco de DHGNA em pacientes com EH versus indivíduos saudáveis. Observaram que o conteúdo total de AGS foi positivamente correlacionado com o risco de DHGNA, enquanto a quantidade de DHA foi negativamente relacionada quando comparado com o grupo controle.

Puri et al. (2009) avaliaram o perfil lipídico plasmático em pacientes com EH e EHNA em comparação com o grupo controle e verificaram uma diminuição do EPA, DHA e na relação n-6/n-3 nos pacientes com DHGNA comparado ao grupo controle. Os resultados encontrados foram aumento significativo de ácido palmitoleico (C16:1 n-7) e AO (C18:1 n-9) (p<0,01). Além da diminuição do AL (C18:2 n-6) concomitante ao

aumento do ácido-gama-linolênico (C18:3 n-6) e gama-dihomo-linolênico (C20:3 n-6), (p<0,05). Não houve diferença estatisticamente significante nos níveis totais de AGPI em ambos os grupos.

De Almeida et al. (2002) avaliaram a concentração de AG plasmáticos e sua associação a EHNA. O trabalho foi composto por 22 pacientes com EHNA comprovada por biópsia versus 6 indivíduos saudáveis no grupo controle ambos com a mesma faixa etária. Eles encontraram uma concentração significativamente maior de AG totais nos pacientes com EHNA comparado ao grupo controle (p<0,05), assim como as frações lipídicas dos AGS e dos AGM (p<0,05), não houve diferença entre as concentrações de AGPI.

Elizondo et al. (2007) investigaram a relação dos AG hepático com os de eritrócito em obesos com DHGNA submetidos gastrectomia subtotal versus grupo controle (pacientes sem DHGNA submetidos a cirurgia antirrefluxo). Os pacientes com DHGNA apresentaram diminuição do C20:4 n-6, C22:5 n-6, C22:6 n-3, total AGPI-CL e total AGPI-CL n-3, nos eritrócitos, comparados ao grupo controle. Em adição, os níveis de C22:6 n-3 e C22:5 n-6 foram positivamente correlacionados com os de eritrócitos (r = 0,77 e r = 0,90; p<0,0001), respectivamente, entretanto os mesmo AG apresentaram uma associação significativamente inversa em ambos materiais biológicos.

Allard et al. (2008) analisaram a composição de AG de eritrócitos e tecido hepático em 3 grupos de pacientes com, mínimos achados, EH, EHNA diagnosticados pela biópsia. Contudo, a composição de AG de eritrócitos foi similar entre os grupos. Interesantemente, o conteúdo de AGPI n-6 e n-3 e as relações EPA+DHA/AAL e AA/AL no tecido hepático foram significativamente menor nos pacientes EHNA comparados aos outros grupos.

Contudo, a composição lipídica de eritrócitos em pacientes com DHGNA ainda é pouco estudada. Elizondo et al. (2008) avaliaram a composição lipídica em eritrócitos e o efeito da perda de peso em 7 pacientes com DHGNA submetidos a gastrectomia em Y de Roux, no período imediato pós cirurgia e 3 meses após o procedimento, versus grupo controle composto por 7 pacientes submetidos a cirurgia antirrefluxo sem DHGNA. Observaram que após 3 meses da cirurgia com perda de 21% do peso corporal inicial ocorreu aumento dos AGPI-totais, dos AGPI-CL, dos AGPI n-3 e dos AGPI-CL n-3 em 22, 29 e 81% respectivamente, melhora de biomarcadores de estresse oxidativo, na

insaturação de AG de eritrócitos e na biossíntese de AGPI-CL n-3 comparado ao grupo controle.

Petit et al. (2012) verificaram associação entre o grau de EH utilizando ressonância magnética nuclear de prótons com os AG de eritrócitos pela cromatografia gasosa em 162 pacientes com DM tipo 2. Demonstraram que 67,2% desses pacientes tinham EH (conteúdo de gordura hepática > 5,5%). Esse grupo também apresentou índice de massa corporal (IMC) e TG plasmáticos mais elevados (p=0,0005; p=0,009), respectivamente comparado ao grupo sem EH. Em adição, houve uma associação significativa entre o C16:0 e C16:1 n-7 no indivíduos com EH. As concentrações de AGPI ácido total-homo-gama-linolénico (20:3 n-6), DHA (22:6 n-3), e AA (20:4 n-6) foram associados a menor grau EH.

Parker et al. (2015) avaliaram AG de eritrócitos, e o índice de ômega 3 como um marcador de ingestão de AGPI a médio prazo em pacientes com e sem EH diagnosticados pela espectroscopia de prótons por ressonância magnética. Observaram uma correlação positiva entre índice de ômega 3 com a concentração de gordura hepática. Entretanto, não houve diferença entre os AG de eritrócitos em ambos os grupos.

Quadro 6: Resumo das principais publicações que analisaram a composição lipídica em pacientes com DHGNA.

Autor/ano	Local de análise de AG	População de estudo	Resultados
De Almeida et al., 2002	Plasma	22 pacientes com EHNA X 6 indivíduos saudáveis GC*	[ ] significativamente > de AGTotais, das frações lipídicas dos AGS e dos AGM na EHNA X GC* (p<0,05), não houve diferença entre as [ ]de AGPI.
Elizondo et al., 2007	Eritrócito	12 obesos com DHGNA submetidos à gastrectomia em Y de Roux	Comparado ao GC** pacientes com DHGNA apresentaram ↓ significativa nos níveis C20:4 n-6, C22:5 n-3, C22:6 n-3 e total de AGPI-CL e total AGPI-n-3 e ↑ nos

		X 8 GC**	níveis C22:5 n-6 e na relação n-6/n-3 tanto no tecido hepático quanto de eritrócito.
Allard et al., 2008	Tecido hepático e eritrócito	56 pacientes com DHGNA (18 = EH, 38 = EHNA, 18 = AM#).	**Tecido hepático**: Os % do C16:0, C18:0 e do C20:0 foram similares entre os 3 grupos, mas C16:1 n-7 e C18:1 n-9 foi significativamente > no grupo EHNA comparado ao grupo MA. Os níveis do C18:2 n-6 e do C18:3 n-3 foram semelhantes em ambos os grupos. O níveis do C20:5 n-3, C22:6 n-3 e do C20:4 n-6 foram significativamente < no grupo EHNA comparado ao grupo MA. O total de AGPI n-6 foi significativamente < no grupo EHNA comparado a EH e com < tendência comparado ao grupo MA. **Eritrócito:** A composição AG foi similar em ambos os grupos.
Elizondo et al., 2008	Tecido hepático e eritrócito	7 pacientes com DHGNA submetidos a gastrectomia em Y de Roux X 7 indivíduos GC**	Comparado ao GC** os pacientes com DHGNA apresentaram níveis < de AGPI-totais, AGPI-CL, AGPI n-3, AGPI-CL n-3 e > relação n-6/n-3. Após ↓ 21% do peso corporal inicial ocorreu ↑ dos AGPI-totais, AGPI-CL, ↑ AGPI n-3 e dos AGPI-CL n-3 em 22, 29 e 81% respectivamente, melhora de biomarcadores de estresse oxidativo, na insaturação de AG de

			eritrócitos e na biossíntese de AGPI-CL n-3.
Puri et al., 2009	Plasma	25 pacientes com EH, 50 pacientes com EHNA X 50 indivíduos GC*	↓ C20:5 n-3, C22:6 n-3 e relação n-6/n-3 nos pacientes com DHGNA X GC*. ↑ significativo do C16:1 n-7 e C18:1 n-9 (*p*<0,01). ↓ C18:2 n-6 concomitante ao ↑ do C18:3 n-6 e do C20:3 n-6, (*p*<0,05). Não houve diferença estatisticamente significante nos níveis totais de AGPI em ambos os grupos.
Petit et al., 2012	Eritrócito	162 diabéticos tipo 2 (109 com EH, 53 sem EH)	Comparado aos pacientes sem EH os pacientes com EH apresentaram < % AGPI-totais, C20:3 n-6, C22:6 n-3 e C20:4 n-6, e níveis mais elevados de C16:0, C16:1 n-7 e AGS totais.
Zheng et al., 2012	Plasma	100 pacientes com DHGNA X 100 indivíduos GC*	A composição de AGS totais e do C20:3 n-6 foram significativamente > nos pacientes com DHGNA que no GC* (p=0.001), assim como o C22:6 n-3, C18:1 n-7 foi significativamente < nos pacientes com DHGNA que no GC*.
Parker et al., 2015	Eritrócito	30 pacientes com DHGNA X	Comparado ao GC* os pacientes com DHGNA apresentaram correlação positiva entre o IMC e

		50 indivíduos GC*	PC, glicose, insulina, TG (p<0,05) e correlação negativa entre o HDL e relação n6/n3 (p=0,05) com a [ ] de gordura hepática. A composição de AG de eritrócito não diferiu em ambos os grupos.

AG- ácidos graxos; GC*- grupo controle (indivíduos saudáveis); GC**- não obesos submetidos à cirurgia antirrefluxo; MA#- mínimos achados na biópsia hepática ou histologicamente normal.

2.6 Avaliação do consumo alimentar

As diferentes classes de lipídios estão relacionadas ao desenvolvimento e progressão ou prevenção de doenças cardiometabólicas. Nesse sentido, a avaliação adequada da ingestão lipídica utilizando inquéritos alimentares (IA) tem despertado cada vez mais o interesse de pesquisadores. Os métodos mais utilizados para avaliar o consumo alimentar incluindo lipídios incluem o QFA, RA e o R24h. No entanto, não existe um "padrão ouro" para avaliar o consumo de alimentar de modo geral, pois os diferentes métodos apresentam vantagens, desvantagens e limitações (LÓPEZ, 1995; PEREIRA et al., 2010).

O R24h é atualmente o instrumento mais utilizado para a avaliação dietética de indivíduos e grupos populacionais. Trata-se de um método retrospectivo, que consiste em um relato referente ao período das 24 horas que precederam a entrevista, no qual o indivíduo descreve e quantifica todos os alimentos e bebidas ingeridos. Dentre as vantagens deste método estão, o baixo custo, aplicabilidade em analfabetos e por telefone e facilidade de aplicação em curto período de tempo. Em contrapartida, a maior limitação do método é o fato de depender da memória do entrevistado, contudo, a idade, o nível de escolaridade, o nível cognitivo e condições psicológicas também podem influenciar no resultado. Outra limitação é que apenas um R24h não é um bom representativo da ingestão usual, nesse caso são necessários múltiplos R24h em diferentes dias da semana realizados ao acaso e de forma não consecutiva permitindo estimar a variabilidade intraindividual (FISBERG et al., 2005; PEREIRA; SICHIERI, 2007).

A variabilidade da dieta ocorre principalmente devido a dois erros: os erros aleatórios e sistemáticos, ambos podem ocorrer em dois níveis diferentes, em um mesmo indivíduo (intraindividual) ou entre indivíduos (interindividual). A variabilidade

no consumo alimentar (CA) ocorre, pois, um mesmo indivíduo difere no tipo de alimento e na quantidade consumida em dias diferentes (variabilidade intraindividual) e porque diferem entre si quanto ao CA (variabilidade interindividual) (LOPES et al., 2003).

No erro aleatório intraindividual as medidas de ingestão obtidas pela reaplicação do mesmo instrumento, modificam-se em torno da ingestão real sem seguir um padrão, podendo ocorrer por uma variação diária na ingestão ou por um erro de medida (ROSSATO; FUCHS, 2014). O erro sistemático intraindividual ocorre quando as médias obtidas por meio da repetição de um método no mesmo indivíduo estão em torno da ingestão real, mas seguem um padrão de sub ou superestimação, resultando em uma ingestão estimada que não reflita a verdadeira (LOPES et al., 2003)

No erro aleatório entre indivíduos, o consumo pode estar ora superestimado, ora subestimado em relação a real ingestão. Isso ocorre quando há observações insuficientes do indivíduo na presença do erro aleatório intraindividual ou quando o erro sistemático intraindividual é randomicamente distribuído. Já no erro sistemático entre indivíduos, a ingestão do grupo apresenta um padrão diferente do aleatório em relação à ingestão real. Resulta do erro sistemático intraindividual, devido à omissão de alimentos em um questionário estruturado ou por utilizar tabelas de composição de alimentos inadequadas (LOPES et al., 2003). Como estratégias para minimizar ou eliminar os erros sistemáticos são recomendados, o aumento do número de R24h e a utilização de técnicas estatísticas (LOPES et al., 2003; ROSSATO; FUCHS, 2014).

3 JUSTIFICATIVA

O processo de transição nutricional e epidemiológica que vem ocorrendo no Brasil e no mundo ao longo das últimas décadas evidenciam as modificações na dieta ocidental, envolvendo as fontes alimentares de lipídios com ênfase no aumento do consumo de gorduras totais, de AGS, AGPI n-6 e AG *trans* e à redução do consumo de AGPI n-3. Essas modificações no padrão de consumo alimentar, acompanhadas pelas mudanças econômicas e sociais favorecem a produção e aquisição de alimentos industrializados que estão fortemente associadas ao desenvolvimento de doenças como a obesidade, doenças cardiovasculares e DHGNA.

Estudos que avaliaram a composição de AG em tecidos e fluidos biológicos em pacientes com DHGNA corroboram um desequilíbrio entre o conteúdo de AG, destancando um aumento do ácido palmítico que está associado a estresse do RE e morte celular, dos AGPI n-6 que apresentam potente ação pró-inflamatória e dimunuição dos AGPI n-3 que desempenham uma importante função anti-inflamatória.

Contudo, a composição de AG de eritrócitos tem sido utilizada como marcador biológico de ingestão lipídica a médio prazo, além de refletir alterações nos processos enzimáticos de elongação e desaturação, bem como, pela RI e pela LDN. No entanto, atualmente não existem publicações que avaliaram o perfil de AG de eritrócitos nos diferentes graus de fibrose hepática.

Dessa forma, o presente estudo poderá contribuir para o esclarecimento do perfil dietético e bioquímico de AG de pacientes com fibrose hepática, norteando possíveis ajustes na distribuição das diferentes classes lipídicas nessa população.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

- Avaliar a ingestão dietética de lipídios e a composição de ácidos graxos de lipídios totais de eritrócitos de pacientes com DHGNA relacionado com o grau de fibrose hepática e a LDN.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar as alterações no perfil lipídico plasmático por meio das determinações de colesterol total, TG, ácidos graxos não esterificados com o grau de fibrose hepática em pacientes com DHGNA.

- Avaliar a relação entre o estado nutricional antropométrico com o grau de fibrose hepática em pacientes com DHGNA.

- Avaliar a relação entre a ingestão de lipídios com: a composição de ácidos graxos dos lipídios totais de eritrócitos com o grau de fibrose hepática em pacientes com DHGNA.

5 CASUÍSTICA E MÉTODOS

5.1 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo do tipo transversal, realizado entre o período de janeiro de 2014 a janeiro de 2015, incluindo pacientes com diagnóstico de DHGNA confirmada pela USG e fibrose hepática quantificada pela ETH.

5.2 Local do estudo

A coleta de dados foi realizada no ambulatório de hepatologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho que é referência no tratamento de doenças hepáticas e atende aproximadamente 500 pacientes por semana. Os atendimentos são realizados por professores, médicos, nutricionistas, residentes e alunos da graduação e da pós-graduação.

5.3 Amostra

A amostra do estudo foi composta por 89 pacientes de ambos os sexos com idade igual ou superior a 19 anos. Os pacientes foram categorizados em dois grupos de acordo com o grau de fibrose hepática: rigidez hepática ≤ 7.0 kPa sem fibrose significativa com 28 pacientes, e rigidez hepática > 7.0 kPa com fibrose significativa com 61 pacientes. A escolha da amostra foi realizada de forma aleatória, os pacientes foram incluídos no estudo de acordo os critérios de inclusão e exclusão abaixo.

Os critérios de inclusão no estudo serão:

- Ter 19 anos de idade ou mais,
- Ter diagnóstico de DHGNA confirmados por ultrassonografia.

Critério de exclusão:

- Hepatites virais;
- Gravidez e lactação;
- Etilistas;
- Uso de suplemento de n-3 nos últimos 3 meses anteriores ao estudo;
- Febre ou focos infecciosos;
- Câncer com ou sem quimioterapia e radioterapia;
- Doenças inflamatórias do trato gastrointestinal,

- Transplante, trauma, cirurgia ou internação hospitalar nos últimos 30 dias, uso de esteroides ou anti-inflamatórios não esteroides ou agentes imunomoduladores ou antibióticos.

5.4 Desenho do estudo

1ª etapa- Os pacientes foram abordados durante a consulta de rotina com hepatologista no HUCFF e foram informados sobre o projeto. Após esclarecimento foi coletada a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e realizada a uma entrevista onde a aluna de mestrado com auxílio das alunas de iniciação científica (IC) preencheram um questionário (Anexo 3 e 4).

2ª etapa- Foi realizada consulta dos prontuários para completar as informações requeridas no (Anexo 4).

3ª etapa- Retorno dos pacientes de acordo com a marcação realizada na primeira etapa para coleta de sangue (solicitado jejum de 12 horas) e avaliação antropométrica. Para avaliação do grau de fibrose os pacientes foram submetidos à ETH, utilizando o Fibroscan® no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho-HUCFF como parte de rotina do serviço de hepatologia.

4ª etapa- Foram feitas ligações em dois momentos distintos sem aviso prévio (uma em dia útil considerado típico e outra no final de semana considerado atípico) para aplicar o recordatório de 24 horas.

5.5 Avaliação da fibrose hepática pela elastografia transitória hepática

Para avaliação da rigidez hepática todos os pacientes foram submetidos ao FibroScan® (modelo 502 Echosens, Paris), realizado por um examinador treinado, avaliados com a sonda modelo M padrão 3.5 MHz (profundidade das medidas variou entre 25 e 65 mm). Apenas os resultados com 10 medidas válidas com percentual de sucesso superior a 60% e intervalo interquartil (IQR)/ valor da rigidez média inferior a 30 % foram incluídos. O valor mediano foi considerado representativo da medida da elasticidade do fígado. Os resultados foram expressos em kilopascals (kPa), variando de 1,5 a 75 kPa com precisão de 0,5 kPa.

A mediana de fibrose hepática foi categorizada em dois grupos: rigidez hepática $\leq$ 7.0 kPa sem fibrose significativa e rigidez hepática > 7.0 kPa com fibrose significativa. Esse ponto de corte foi baseado em um estudo que propôs o ponto de corte ótimo de 7 kPa para o diagnóstico de fibrose significativa ($\geq$ F2) em pacientes com DHGNA.

5.6 Avaliação Antropométrica

Para avaliação antropométrica foram aferidos parâmetros de peso corporal, estatura, perímetro da cintura e perímetro do quadril e calculado o índice de massa corporal, relação cintura/quadril, razão cintura/estatura e o índice de adiposidade corporal (anexo 4). O peso atual foi obtido por meio de balança marca FILIZOLA® PL 180, digital, com capacidade máxima de 150 kg e precisão de 100 g.

A estatura foi aferida por meio do estadiômetro tipo plataforma, graduado em décimos de centímetros com o paciente descalço, sem chapéu, adereços ou gorro. Para aferição o paciente foi posicionado verticalmente com braços estendidos ao longo do corpo, ombros relaxados com os calcanhares juntos e, a cabeça posicionada no plano de Frankfurt. Os calcanhares, nádegas, escápulas e dorso da cabeça mantiveram-se em contato com a superfície vertical do instrumento. Deslocando a haste móvel do estadiômetro até a parte superior da cabeça foi realizada a leitura. O procedimento foi repetido por duas vezes, e uma terceira vez nos casos com diferença maior do que a variação permitida entre as duas primeiras. O valor da altura foi registrado com aproximação de 0,5 cm. O cálculo do IMC foi realizado por meio da fórmula Quetlet:

$$\textbf{IMC (kg/m}^2\textbf{)} = \frac{\textbf{Peso atual (kg)}}{\textbf{Estatura}^2}$$

A classificação do estado nutricional, a partir da distribuição do IMC, foi realizada segundo a recomendação (WHO, 1998), apresentada no quadro 7.

Quadro 7: Classificação do estado nutricional, segundo o IMC para adultos.

Classificação	IMC (kg/m2)
Magreza classe III	<16
Magreza classe II	16 - 16,9
Magreza classe I	17 - 18,4
Eutrófico	18,5 - 24,9
Sobrepeso	25,0 – 29,9
Obesidade classe I	30,0 – 34,9
Obesidade classe II	35,0 – 39,9
Obesidade classe III	≥ 40

Fonte: World Health Organization (1998).

O perímetro da cintura foi aferido utilizando uma fita métrica flexível e inelástica, com precisão de 0,1 centímetros. Os indivíduos estavam na posição ereta, com abdômen relaxado, braços estendidos ao longo do corpo e pês afastados um do outro, foram feitas 3 medidas circundando o ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca e calculada a média em centímetros (cm) (LOHMAN, 1988). O quadro 8 apresenta os parâmetros utilizados para classificação (WHO, 1998).

Quadro 8: Valores de referência para avaliação do risco cardiometabólico utilizando o perímetro da cintura.

Sexo	**Risco de Complicações Metabólicas Associadas à Obesidade**	
	Elevado	Muito Elevado
Homem	≥ 94 cm	≥ 102 cm
Mulher	≥ 80 cm	≥ 88 cm

Fonte: World Health Organization (1998).

O perímetro do quadril foi aferido com o pacientes de pé na posição ereta, com fita métrica flexível e inelástica, com precisão de 0,1 centímetros. Foi medida ponto mais saliente entre a cintura e a coxa no nível da extensão máxima dos glúteos e, posteriormente, correlacionada com o perímetro da cintura. A razão cintura/quadril (RCQ) foi obtida utilizando a seguinte fórmula:

$$\textbf{RCQ} = \frac{\textbf{Perímetro da Cintura (cm)}}{\textbf{Perímetro do Quadril (cm)}}$$

Quadro 9: Ponto de corte para relação cintura/quadril.

Sexo	**Relação cintura/quadril**
Homem	≥ 0,90 cm
Mulher	≥ 0,85 cm

Fonte: World Health Organization (2000).

A razão cintura/estatura (RCEst) pode ser obtida pela razão do perímetro da cintura (m) dividido pela medida da estatura (m). Essa medida tem sido considerada um

indicador de obesidade abdominal. Segue abaixo a fórmula utilizado para cálculo da RCEst.

$$\textbf{Razão cintura/estatura (RCEst)} = \frac{\textbf{Perímetro da cintura (m)}}{\textbf{Estatura (m)}}$$

Quadro 10: Pontos de corte da razão cintura/estatura

RCEst	Ponto de corte
Homem	0,52
Mulher	0,53

Fonte: Pitanga, Lessa, (2006).

Índice de Adiposidade Corporal (IAC) foi proposto Bergman et al. (2011) como alternativa, aparentemente, mais fidedigna para quantificar a gordura corporal, utilizando a medida do quadril e a estatura. Este método pode ser utilizado para mensurar o percentual de gordura corporal em homens e mulheres adultos de diferentes etnias, sem correção numérica. O IAC é calculado utilizado a seguinte fórmula:

$$\textbf{IAC} = [\textbf{Quadril}/(\textbf{altura} \times \sqrt{\textbf{altura}})] - 18$$

Quadro 11: Pontos de corte para classificação do IAC.

Classificação	Homem	Mulher
Normal	8 a 20	21 a 32
Sobrepeso	21 a 25	33 a 38
Obesidade	>25	>38

Fonte: Bergman et al. (2011).

O índice de forma corporal (IFC) foi calculado utilizando a fórmula proposta por Krakauer e Krakauer (2012). Esse método é um preditor de mortalidade por qualquer causa de morte e indicador de adiposidade corporal (KRAKAUER, KRAKAUER, 2012).

$$\textbf{Índice de Forma Corporal} = \frac{\textbf{CC (cm)}}{\textbf{IMC}^{2/3} \textbf{ X Estatura(m)}^{1/2}}$$

Quadro 12: Pontos de corte do índice de forma corporal.

IFC	Média
Homem	0.0796
Mulher	0,0795

Fonte: Krakauer; Krakauer, (2012).

Cabe ressaltar que todas as medidas foram realizadas pela aluna de mestrado com auxílio das aulas bolsistas da Fundação de Aparo a Pesquisa do Rio de Janeiro e do Programa Institucional de Bolsa de Iniciação Científica (PIBIC) devidamente treinadas pela pesquisadora principal.

5.7 Avaliação do consumo alimentar

As informações relativas ao consumo alimentar foram obtidas por meio de recordatório de 24h (R24h) (anexo 3). Este, foi aplicado em três períodos não consecutivos 2 em dias considerados típicos e 01 em dia considerado atípico. O primeiro foi realizado no momento da abordagem no ambulatório de hepatologia do HUCFF, os outros dois foram feitos por ligações telefônicas sem aviso prévio. Durante a entrevista, os pacientes foram orientados a informar todo tipo de alimento consumido incluindo bebidas exceto água nas últimas 24 horas, a forma de preparo, as quantidades, além dos horários e o local em que cada alimento ou refeição foram consumidos.

As informações do consumo alimentar foram registradas no software BRASIL NUTRI® desenvolvido para a Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008-2009 realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) que não é de domínio público, mas tem sido utilizado em muitas pesquisas (IBGE, 2011). Para análise da composição nutricional dos macronutrientes e de fibras foi utilizado software SAS versão 9.3.

Para a estimativa da ingestão de lipídios foi considerada a adição de óleo de soja em todas as formas de preparações de carnes, peixes e aves e as preparações cozidas e refogadas de legumes e verduras. Foram utilizadas tabelas de composição nutricional (IBGE, 2011) e medida caseira (IBGE, 2011) compilada especificamente para análise dos alimentos e preparações citados na POF 2008-2009. Cabe ressaltar que, os dados de ingestão de nutrientes representam a contribuição somente dos alimentos e/ou bebidas e não incluiu o consumo de suplementos e/ou medicamentos.

O resultado da composição nutricional referentes aos três R24h foram deatenuados para corrigir a variabilidade intraindividual utilizando um novo método estatístico o Multiple Source Method (MSM). O programa foi desenvolvido pelo European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) para estimar a ingestão habitual de alimentos e nutrientes com base em duas ou mais medidas de curto prazo, como o R24h. (HAUBROCK et al., 2011; HARTTIG et al., 2011).

O R24 foi aplicado pela aluna de mestrado com auxílio das aulas bolsistas da Fundação de Aparo a Pesquisa do Rio de Janeiro e do PIBIC devidamente treinadas pela aluna de mestrado.

5.8 Avaliação dos parâmetros bioquímicos

A obtenção dos resultados de exames bioquímicos ocorreu em 2 etapas.

1ª Etapa: Foram feitas consultas aos prontuários para obtenção dos seguintes resultados: (plaquetas, ALT, AST, fosfatase alcalina, gama-glutamil transferase (GGT), proteínas totais, albumina, International Normalization Ratio (INR), tempo de atividade da protrombina (TAP), glicose, hemoglobina glicada, TG, colesterol total, LDL-c, HDL-c).

Com os resultados de ALT e AST foi calculada a razão AST/ALT (valor de AST dividido por ALT) e o HOMA-IR utilizando a fórmula: Glicemia jejum x 0,0555 x Insulina jejum / 22,5.

2ª Etapa: Foram realizadas coletas de sangue para as demais análises, realizadas no laboratório de hepatologia/HUCFF, por profissional devidamente treinado. Em média 13mL de sangue foram coletados em 2 tubos diferentes (1 contendo EDTA e outro sem anticoagulante), na face anterior do antebraço com agulha descartável após jejum noturno de 12 horas em tubo vacutainer® antecedido por anti-sepsia local. Esses tubos foram colocados na centrifuga por 15 minutos a 3000 rotações por minuto para separação do plasma, do soro e das frações de eritrócitos. Aos eritrócitos foram adicionados 100µl da solução de ditionito de sódio 9,57% (p/v) para evitar a oxidação das duplas ligações dos AGPI (BROEKHUYSE, 1974) e armazenados em freezer -80ºC para as posteriores análises. O soro foi enviado ao laboratório de análises clínicas da faculdade de farmácia para dosagem de insulina de jejum utilizando o método de eletroquimioluminescência e os AGNE por meio da espectrofotometria.

5.9 Identificação dos ácidos graxos

Foram analisados os AG saturados, monoinsaturados, poli-insaturados, seus derivados de cadeia longa nos eritrócitos por cromatografia gasosa (CG) no Laboratório de Bioquímica Nutricional do Instituto de Nutrição da Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, utilizando um cromatógrafo Hewlett-Packard (Agilent) Modelo GC 7693A FID/ com um injetor automatizado 7673 (Palo Alto, CA), equipado com detector de chama ionizável e um *software* Chemstation A.08.03 (Agilent Technologies).

Extração e metilação: Foi pesado em torno de 250mg de frações de eritrócitos no tubo de ultracentrifugação, e adicionado tampão fosfato sódico 5mM hipotônico pH= 8,0 até a metade do tubo e agitar no vortex. Posteriormente foi Adicionado mais da solução tampão até que o tubo estivesse cheio. Os tubos foram colocados na centrifuga a 31000g (RCF)/20 minutos a 4ºC. O sobrenadante foi descartado ao final da ultracentrifugação e repetido o processo por 3 vezes. Ao eliminar o último sobrenadante, foi adicionado 1mL de metanol. Em tubos tipo pirex, foi adicionado 200µl do padrão interno C13:0 e evaporado em nitrogênio. O sedimento do fundo do tubo de ultracentrifugação foi desprendido e transferido para o tubo tipo pirex contendo padrão C13:0, e evaporado em nitrogênio.

Ao tubo tipo pirex foi adicionado 2mL de metanol: tolueno-BHT. Na capela, os tubos tipo pirex foram colocados em isopor contendo gelo e adicionado 100µl de cloreto de acetila. Os tubos forma agitados no vortex, envolvidos em papel alumínio e armazenados no escuro em temperatura ambiente por 24 horas.

No dia seguinte, foi inserido um pedaço de algodão desengordurado no fundo do tudo e o conteúdo foi aspirado utilizando uma pipeta pasteur e colocado em outro tubo tipo pirex. Na capela, foi acrescentado 500µl de tolueno- BHT, 5mL de carbonato de potássio 6% e agitado por 30 segundos no vortex, e posteriormente agitados na centrifuga por 10 minutos a 2000RPM em temperatura ambiente.

Os tubos foram retirados da centrifuga e a fase superior foi recolhida utilizando pipeta pasteur e colocada e outro tubo tipo pirex. O conteúdo do tubo foi evaporado com nitrogênio e depois adicionado 1mL de hexano para ressuspender a solução. O tubo foi novamente agitado no vortex e o líquido foi filtrado com sulfato de sódio e transferido para o vial que continha 50mg de sulfato de sódio.

Análise cromatográfica: para a realização da cromatografia os ésteres metílicos de ácido graxos (EMAG) foram redissolvidos com 0,2mL de n-hexano e a mistura transferida para tubos *vials* (0,3mL) e colocados no cromatógrafo a gás.

O volume de injeção da amostra foi de 1µl, tipo *split* (1:10`) a 275ºC com detector *Flame Ionization Detector* (FID). A programação da temperatura foi inicialmente de 150ºC, com aumento de 1,3ºC por minuto até 200ºC por 11,5 minutos. O tempo de corrida foi de 50 minutos. O gás de arraste foi o nitrogênio e de *"make-up*" o nitrogênio ultra puro.

Os EMAG nos cromatogramas das amostras foram identificados pela comparação dos tempos de retenção relativos, calculados com base no ácido esteárico (C18:0), e

comparados com o padrão *Supelco* 463. As áreas dos picos correspondentes aos EMAG identificados foram utilizadas para cálculo da concentração e os resultados expressos em % por peso do total de ácidos graxos.

As etapas de extração e metilação foram realizadas pela aluna de mestrado com auxílio das aulas bolsistas da Fundação de Aparo a Pesquisa do Rio de Janeiro e do PIBIC devidamente treinadas pela pesquisadora principal. A CG foi realizada por técnicos do Laboratório de Bioquímica Nutricional da UFRJ.

5.10 Metodologia de Análise de Dados

A análise dos dados foi realizada utilizando o software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 21.0. Foram aplicados métodos não paramétricos, pois as variáveis não apresentaram distribuição normal (Gaussiana), devido à rejeição da hipótese de normalidade do teste de Shapiro-Wilks. A análise descritiva foi expressa pela média ± desvio padrão para dados numéricos e frequência (n) e percentual (%) para dados categóricos. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparação entre as variáveis dos dois grupos de fibrose com os parâmetros antropométricos, bioquímicos e dos ácidos graxos. A associação entre a fibrose e os parâmetros antropométricos, bioquímicos e dos ácidos graxos foi determinada pelo coeficiente de correlação Spearman. O critério de determinação de significância adotado foi o nível de 5%.

5.11 Qualidade dos dados

A qualidade dos dados foi assegurada por um conjunto de medidas adotadas anteriores a coleta de dados e durante a realização da mesma. As entrevistadoras foram treinadas para aferição dos parâmetros antropométricos e aplicação do R24h de forma padronizada. Após a coleta, todos os dados foram digitados em duplicata e comparada variável a variável entre as duas digitações para corrigir possíveis erros.

5.12 Aspectos Éticos

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUCFF, nº 080434/2013. A inclusão de cada indivíduo no projeto foi feita mediante autorização formal, por meio da assinatura do TCLE (Anexo 1) após esclarecimentos sobre os objetivos e procedimentos do projeto por parte do pesquisador, de acordo com a Resolução nº 466 de 12/12/2012 do Conselho Nacional de Saúde.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão serão apresentados no manuscrito intitulado: **Perfil da ingestão lipídica e da composição de ácidos graxos de eritrócitos de pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica.**

Será submetido à:
Journal of Lipid Research (Print).

MANUSCRITO 1

Profile of lipid intake and fatty acid composition of red blood cells of patients with non-alcoholic fatty liver disease**.**

ABSTRACT:

Background: Recent studies have suggested that the composition of dietary FA, enzymatic processes of elongation and desaturation, as well as IR and *de novo* lipogenesis (DNL) influence the fatty acid content of erythrocytes and are related to the development and progression of NAFLD. **Aims:** Evaluate dietary intake of lipids and fatty acid composition of total lipids of erythrocytes of patients with NAFLD related to the degree of liver fibrosis and DNL. **Methods:** A total of 89 patients with nonalcoholic fatty liver disease (28 without significant fibrosis ≤ 7 kPa, 61 with significant fibrosis > 7 kPa) were evaluated between January 2014 and January 2015. The adequacy of lipid intake was assessed based on the values of reference recommended by the NCEP ATP III. The composition of the fatty acids of erythrocytes was obtained by gas chromatography and subsequently calculated relationships that reflect the activity of lipogenic enzymes (ELOVL6 18:0/16:0; SCD1 16:1 n-7/16:0; 18:1 n-9/18:0) and index DNL (16: 0/18: 2n-6). **Results:** Inadequate were observed in consumption MUFA at 100% and PUFA, 93.3% of patients, respectively, and 97.8% patients exceeded the upper limit of daily intake for SFA. The ratio 18:0/16:0 was significantly lower (p = 0.01) and the ratio 18:1n-9 /18:0 significantly higher (p = 0.03) relative to the increase in 16:0 and 18:1 n-9 and associated abdominal adiposity greater the degree of advanced hepatic fibrosis. Significant positive correlations were observed between them FAs erythrocytes 16:0 (r = 0.334; *p*= 0.00) 18:1 n-9 (r = 0.325; p = 0.00) and the whole MUFA (r = 0.292; *p*= 0.00) and median liver fibrosis (kPa) and a significant inverse correlation (r = -0.296; p = 0.00) between the enzymatic activity of a biomarker ELOVL6 (18:0/16:0) with the median hepatic fibrosis (kPa). **Conclusion:** Patients with NAFLD have important inadequate in lipid consumption and an increase in FAs 16:0 and 18:1 n-9 and index DNL related to advanced liver fibrosis.

Keywords: Non-alcoholic fatty liver disease, fatty acids, fatty acid desaturases, lipogenesis, transiente liver elastography.

Introdução

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é considerada atualmente a causa mais comum de doença hepática crônica no mundo[1,2]. De modo geral, a prevalência de DHGNA em indivíduos eutróficos sem a presença de fatores de risco metabólico é de aproximadamente 16%, aumentando para 43-60% em pessoas com diabetes mellitus chegando a 80% em indivíduos obesos[3,4]. A DHGNA definida como o acúmulo de lipídios a partir de triglicerídeos (TG) no interior dos hepatócitos, excedendo a 5% do peso do fígado em pessoas cuja ingestão diária de álcool é inferior à 20g em mulheres e 30g em homens[5,6]. Sua etiologia inclui diversos fatores, entretanto, anormalidades metabólicas tais como obesidade, principalmente abdominal, resistência a insulina (RI), diabetes mellitus tipo 2 e dislipidemia, "componentes" da síndrome metabólica justificam em parte, a ascensão da DHGNA[7,8].

A RI e a lipogênese *de novo* (LDN) têm sido consideradas condições iniciais para o desenvolvimento da DHGNA. A RI diminui à captação de glicose pelos tecidos extra-hepáticos promovendo aumento de substrato glicídico no metabolismo hepático para síntese de ácidos graxos *de novo* que tem como produto final o ácido palmítico, principal AGS envolvido na lipotoxicidade hepática. Adicionalmente, em indivíduos obesos a hiperinsulinemia leva a um aumento da LDN pelo aumento da ativação do fator de transcrição proteína 1c ligadora do elemento regulatório de esterol (SREBP-1c) que permanece sensível a insulina e estimula síntese de enzimas lipogênicas[9,10,11].

Um estudo recente demonstrou que indivíduos com alto conteúdo de gordura hepática apresentaram taxas de LDN três vezes maiores comparado a indivíduos com baixo conteúdo de gordura hepática e que o percentual de 16:0 foi duas vezes maior nos indivíduos com maiores taxas de LDN[12]. Entretanto, sendo a biópsia hepática um método invasivo, torna-se difícil avaliar diretamente a LDN, contudo, os principais produtos dessa via o 16:0, 18:0, 16:1 n-7, 18:1 n-7 e 18:1 n-9 podem ser detectados em tecidos e fluidos biológicos[13,14] e facilmente avaliados por métodos analíticos cromatográficos. Desse modo, pesquisas recentes tem utilizado a relação de ácidos graxos (AG) específicos para estimar a atividade de enzimas lipogênicas e mensurar a LDN[15,16].

Apesar da RI e a LDN serem consideradas importantes no desenvolvimento e progressão da DHGNA, os hábitos alimentares também representam fatores de agressão e sobrecarga hepática[17,18,19]. Evidências apontam que o alto consumo de gorduras totais,

de ácidos graxos saturados (AGS), ácidos graxos poli-insaturados ômega-6 (AGPI n-6) e ácidos graxos *trans* e a redução do consumo de AGPI ômega-3 acarretam em estresse do retículo endoplasmático, levando a apoptose e lesão hepatocelular[20,21,22].

Interessantemente, estudos que avaliaram a composição de AG de eritrócitos na DHGNA corroboram esses achados, demonstrando níveis elevados de AGS, redução dos AGPI principalmente n-3, assim como, aumento na relação n-6/n-3[23,24]. Desse modo, a composição de AG de eritrócitos tem sido utilizada como biomarcador objetivo de ingestão lipídica a médio prazo[25].

O desenvolvimento da fibrose varia de acordo com os espectros da DHGNA, cerca de 25% a 35% com esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) desenvolvem fibrose em um período de 3 a 4 anos e cirrose em 25% dos casos de EHNA ao longo de 8 a 10 anos elevando o risco de progressão para hepatocarcinoma celular e falência hepática[26,27]. Desse modo, a identificação de fatores que possam influenciar tanto no desenvolvimento quanto na progressão da DHGNA tornam-se relevantes a fim de se estabelecer planos terapêuticos que visem impedir ou postergar a progressão da doença. Considerando a importância da ingestão dietética de lipídios e da composição dos ácidos graxos de eritrócitos na progressão da DHGNA e a ausência de estudos sobre a relação desses componentes com o grau de fibrose hepática, o objetivo do presente estudo foi avaliar a ingestão dietética de lipídios e a composição de ácidos graxos de lipídios totais de eritrócitos de pacientes com DHGNA relacionado com o grau de fibrose hepática e a LDN.

Métodos

Desenho do estudo:

Trata-se de um estudo do tipo transversal, realizado entre o período de janeiro de 2014 a janeiro de 2015, incluindo pacientes com diagnóstico de DHGNA confirmada pela ultrassonografia e fibrose hepática quantificada pela elastografia transitória hepática. Os indivíduos com hepatites virais, câncer, doenças inflamatórias do trato gastrointestinal, febre ou focos infecciosos, em uso de medicamentos esteroides ou anti-inflamatórios não esteroides, agentes imunomoduladores, antibióticos, transplantados, trauma, cirurgia ou internação hospitalar nos últimos 30 dias, com consumo de álcool > 20g/dia, gestantes ou lactantes ou e uso de suplemento de óleo de peixe rico n-3 nos últimos 3 meses anteriores ao estudo foram excluídos.

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, nº 080434/2013.

Elastografia transitória hepática e definição da fibrose significativa

Para avaliação da rigidez hepática todos os pacientes foram submetidos ao FibroScan® (modelo 502 Echosens, Paris), realizado por um examinador treinado, avaliados com a sonda modelo M padrão 3.5 MHz (profundidade das medidas variou entre 25 e 65 mm). Apenas os resultados com 10 medidas válidas com percentual de sucesso superior a 60% e intervalo interquartil (IQR)/ valor da rigidez média inferior a 30 % foram incluídos. O valor mediano foi considerado representativo da medida da elasticidade do fígado. Os resultados foram expressos em kilopascals (kPa), variando de 1,5 a 75 kPa com precisão de 0,5 kPa.

A mediana de fibrose hepática foi categorizada em dois grupos: rigidez hepática ≤ 7.0 kPa sem fibrose significativa e rigidez hepática > 7.0 kPa com fibrose significativa. Esse ponto de corte foi baseado em um estudo que propôs o ponto de corte ótimo de 7 kPa para o diagnóstico de fibrose significativa (≥ F2) em pacientes com DHGNA[28,29].

Avaliação bioquímica

Após jejum noturno de 12 horas foi realizada coleta de sangue e separado o soro, o plasma e os eritrócitos, aos eritrócitos foram adicionados 100µl da solução de ditionito de sódio 9,57% (p/v) para evitar a oxidação das duplas ligações dos AGPI[30], e armazenados em freezer -80ºC para as posteriores análises.

Os resultados dos exames bioquímicos ALT, AST, fosfatase alcalina, gama-glutamiltransferase (GGT), albumina, glicose, hemoglobina glicosilada, TG, colesterol total, LDL-c, HDL-c formam obtidos como parte de rotina do HUCFF. Para obtenção dos valores da razão AST/ALT foi calculada AST/ALT e o HOMA-IR pela fórmula: glicemia jejum x 0,0555 x Insulina jejum / 22,5. As análises de insulina de jejum e ácidos graxos não esterificados (AGNE) formam feitas pelo laboratório de análises clínicas da faculdade de farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) utilizando o método de eletroquimioluminescência e espectofotometria, respectivamente.

Análise de ácidos graxos nos eritrócitos

O perfil de AG foi analisado via transesterificação direta utilizando a cromatografia gasosa (CG)[31]. Para a realização da CG os ésteres metílicos de ácido graxos (EMAG) foram redissolvidos com 0,2mL de n-hexano e a mistura transferida para tubos *vials* (0,3mL) e colocados no cromatógrafo a gás. O volume de injeção da amostra foi de 1µl, tipo *split* (1:10`) a 275ºC com detector *Flame Ionization Detector* (FID). A programação da temperatura foi inicialmente de 150ºC, com aumento de 1,3ºC por minuto até 200ºC por 11,5 minutos. O tempo de corrida foi de 50 minutos. O gás de arraste foi o nitrogênio e de *"make-up*" o nitrogênio ultra puro. Os EMAG nos cromatogramas das amostras foram identificados pela comparação dos tempos de retenção relativos, calculados com base no ácido esteárico (C18:0), e comparados com o padrão *Supelco* 463. As áreas dos picos correspondentes aos EMAG identificados foram utilizadas para cálculo da concentração e os resultados expressos em % por peso do total de ácidos graxos.

Foram analisados os ácidos graxos saturados, monoinsaturados, poli-insaturados e seus derivados de cadeia longa nos eritrócitos por CG no Laboratório de Bioquímica Nutricional do Instituto de Nutrição da Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, utilizando um cromatógrafo Hewlett-Packard (Agilent) Modelo GC 7693A FID/ com um injetor automatizado 7673 (Palo Alto, CA), equipado com detector de chama ionizável e um *software* Chemstation A.08.03 (Agilent Technologies).

Avaliação Antropométrica

O peso atual foi obtido por meio de balança marca FILIZOLA® PL 180, digital, com capacidade máxima de 150 kg e precisão de 100 g. A estatura foi aferida utilizando um estadiômetro tipo plataforma, graduado em décimos de centímetros. O cálculo do índice de massa corporal (IMC) foi realizado baseado na fórmula de Quetlet: peso (kg)/estatura (m^2).

A avaliação do perímetro da cintura foi feita circundando o ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca. Para o perímetro do quadril utilizou-se a região da maior circunferência determinada pelo glúteo máximo. A razão cintura/quadril (RCQ) foi calculada pela fórmula cintura/quadril.

A razão cintura/estatura (RCEst) foi obtida pelo perímetro da cintura (m) dividido pela estatura (m)[32]. O índice de adiposidade corporal[33] (IAC) foi calculado utilizado à fórmula: IAC = [Quadril/(altura x √altura)] – 18. E o índice de forma corporal[34] pela seguinte equação: (IFC) = CC (cm)/$IMC^{2/3}$ x Estatura$(m)^{1/2}$.

Avaliação do consumo alimentar

O consumo alimentar foi estimado por três dias não consecutivos usando o recordatório de 24 horas, no qual o indivíduo informa todos os alimentos e bebidas consumidos durantes às últimas 24 horas que antecedem a entrevista, bem como, a forma de preparo e as quantidades consumidas em unidade de medida caseira. Considerou-se a adição de óleo de soja em todas as formas de preparação de carnes, peixes e aves e as preparações cozidas e refogadas de legumes e verduras. Não foram incluídos o consumo de suplementos e/ou medicamentos.

Foi utilizado um programa de entrada de dados específico composto de aproximadamente 1.500 itens (alimentos e bebidas) que foram selecionados de 5.686 registros na base dos dados de aquisição de alimentos e bebidas do Programa de Orçamento Familiar (POF) 2002-2003. O programa também incluía códigos para o registro do modo de preparo de alimentos (14 formas de preparação) e da unidade de medida utilizada para relatar a quantidade consumida (106 medidas caseiras).

Para estimar a ingestão de energia, macronutrientes e fibras foram utilizadas as tabelas de composição nutricional e medida caseira, compiladas especificamente para análise dos alimentos e preparações citados no Programa de Orçamento Familiar do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2008-2009[35,36]. O resultado da composição nutricional referentes aos três R24h foram deatenuados para corrigir a variabilidade intraindividual utilizando o Multiple Source Method. A classificação de adequação da ingestão dos nutrientes foi feita utilizando os valores de referência preconizados pela NCEP ATP III (Third Report of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III)[37].

Análise estatística

A análise dos dados foi realizada utilizando o software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 21.0. Foram aplicados métodos não paramétricos, pois as variáveis não apresentaram distribuição normal (Gaussiana), devido à rejeição da hipótese de normalidade do teste de Shapiro-Wilks. A análise descritiva foi expressa pela média ± desvio padrão para dados numéricos e frequência (n) e percentual (%) para dados categóricos. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparação entre as variáveis entre os grupos de fibrose com os parâmetros antropométricos, bioquímicos e dos ácidos graxos. A associação entre a fibrose e os parâmetros antropométricos,

bioquímicos e dos ácidos graxos foi determinada pelo coeficiente de correlação Spearman. O critério de determinação de significância adotado foi o nível de 5%.

Resultados

Foram incluídos 89 pacientes com diagnóstico de DHGNA, dos quais 68,53% apresentavam fibrose significativa (rigidez hepática >7 kPa). A média de idade dos indivíduos foi de 61,53 ± 9,92 anos, variando de 26 a 84 anos, sendo 23 (25,8%) do sexo masculino.

A insulina de jejum e HOMA-IR, usados como indicadores do metabolismo glicídico foram significativamente maiores no grupo com fibrose significativa comparado aos sem fibrose significativa (p=0,00; p=0,01). Dentre os marcadores de lesão hepática a ALT, AST e a GGT encontravam-se significativamente aumentadas no grupo com fibrose significativa (p=0,00; p=0,00; p=0,00) (Tabela 1).

A adequação da ingestão de lipídios com base nos valores de referência preconizados pela NCEP ATP III estavam abaixo da recomendação em 100% para AGM e 93,3% para AGPI e acima quanto ao consumo de AGS em 97,8% da amostra (Tabela 4).

A quantificação de AG nos eritrócitos demonstrou um percentual significativamente maior de ácido palmítico (16:0) e AO (18:1 n-9) no grupo com fibrose significativa comparado ao grupo sem fibrose significativa (p=0,00; p=0,00), respectivamente (Tabela 4). Observou-se que a relação 18:0/16:0 utilizada para avaliar atividade da enzima elongase de ácidos graxos de cadeia muito longa 6 (ELOVL6) responsável pela elongação do ácido graxo palmítico a esteárico encontra-se significativamente reduzida (p= 0,01) no grupo com fibrose mais avançada. Além disso, a relação 18:1 n-9/18:0 utilizada para estimar a atividade da enzima estéril-coA desaturase1 (SCD1) foi maior no grupo com fibrose significativa comparado ao grupo sem fibrose significativa (p=0,03). Adicionalmente, a relação 16:0/18:2 n-6 utilizada como índice de LDN foi significativamente aumentado nos pacientes com maior grau de RI HOMA-IR > 4,5 (p=0,03) as demais relações não apresentaram diferença estatisticamente significativa.

Na avaliação da correlação entre a mediana da fibrose hepática (kPa) com os AG de eritrócitos foram observadas correlação positiva significativa entre 16:0 (r= 0,334; p=0,00), o 18:1 n-9 (r= 0,325; p=0,00) e o total AGM (r= 0,292; p=0,00). Ressalta-se

que, o biomarcador de atividade enzimática ELOVL6 (18:0/16:0) apresentou uma correlação inversa significativa (*r*= -0,296; *p*=0,00) com a mediana de fibrose hepática (kPa). Os demais ácidos graxos avaliados e biomarcadores de atividade enzimática não apresentaram diferença significativa entre os grupos (Tabela 6).

O indicador de obesidade generalizado IMC e os indicadores de obesidade abdominal PC e RCEst foram significativamente mais elevados no grupo com fibrose significativa comparado ao sem fibrose significativa (*p*=0,00; *p*=0,04; *p*=0,03), respectivamente (Tabela 2).

Tabela 1: Características demográficas, clínicas e bioquímicas da população de estudo.

Variáveis	**Rigidez hepática ≤ 7 kPa sem fibrose significativa**	**Rigidez hepática > 7 kPa com fibrose significativa**	***Valor de p***
	n= 28	**n= 61**	
Idade	63,21 ± 7,36	60,75 ± 10,87	0,35
Sexo (F/M) (%)	67,9/32,1	77/23	0,36
HAS (%)	82,1	82	0,98
DM tipo 2 (%)	67,9	68,9	0,93
Hipertrigliceridemia (%)	32,1	29,5	0,80
SM (%)	75	78,7	0,70
Insulina de jejum (mU/L)	15,23 ± 11,99	26,63 ± 24,46	**0,00***
Glicose (mg/dL)	123,39 ± 59,27	118,93 ± 32,76	0,53
HOMA-IR	4,79 ± 4,19	7,30 ± 5,62	**0,01***
Hb A1C (%)	6,97 ± 1,71	6,84 ± 1,34	1,00
ALT (U/L)	43,14 ± 18,74	65,85 ± 35,08	**0,00***
AST (U/L)	25,50 ± 9,52	45,35 ± 30,08	**0,00***
AST/ALT	0,64 ± 0,23	0,72 ± 0,37	0,53
GGT (U/L)	41,32 ± 28,07	107,47 ± 77,66	**0,00***
FA (U/L)	92,81 ± 25,24	101,19 ± 33,14	0,16

AGNE (mcU/mL)	641,47 ± 491,61	682,46 ± 220,34	0,74
Colesterol total (mg/dL)	180,54 ± 45,62	188,03 ± 46,84	0,53
LDL-c (mg/dL)	100,50 ± 37,76	110,72 ± 43,58	0,29
HDL-c (mg/dL)	47,96 ± 14,37	44,00 ± 13,24	0,11
Triglicerídeos (mg/dL)	158,26 ± 93,65	176,45 ± 93,52	0,39

Os resultados foram expressos em média ± DP (desvio padrão), frequência e percentual. Foi utilizado o teste Mann-Whitney U *test* ao nível de 5% para comparação dos grupos de fibrose hepática (kPa).
HAS- Hipertensão arterial sistêmica; DM- Diabetes mellitus; SM- Síndrome metabólica; ALT- Alanina aminotransferase; AST-Aspatato aminotransferase; AST/ALT- razão aspatato aminotransferase/ alanina aminotransferase; GGT- Gama glutamiltransferase;FA- Fosfatase alcalina; AGNE-ácidos graxos não esterificados; HOMA-IR- Homeostasis Model Assessment Method*;* Hb A1c- Hemoglobina glicosilada; LDL- Lipoproteína de baixa densidade; HDL- Lipoproteína de alta densidade.

Tabela 2: Comparação dos parâmetros antropométricos entre os pacientes com e sem fibrose significativa (kPa) avaliado por meio da elastografia transitória hepática.

Variáveis	F1 ≤ 7 kPa	F2 >7 kPa	*Valor de p*
	n= 28	n= 61	
IMC (kg/m²)	30,05 ± 4,39	33,50 ± 5,83	**0,00***
PC (cm)	103,41 ± 10,28	109,16 ± 13,64	**0,04***
RCQ	0,99 ± 0,09	1,01 ± 0,09	0,37
IAC	32,53 ± 6,62	35,47 ± 7,11	0,10
RCEst	0,63 ± 0,07	0,67 ± 0,08	**0,02***
IFC	0,0842 ± 0,0047	0,0935 ± 0,0762	0,79

Os resultados foram expressos em média ± DP (desvio padrão). Foi utilizado o teste Mann-Whitney U *test* ao nível de *5% para comparação dos grupos de fibrose hepática (kPa).
IMC= Índice de massa corporal; PC= Perímetro da cintura; RCQ= Relação cintura/quadril; IAC= Índice de adiposidade corporal; RCEst= Razão cintura/estatura; IFC= Índice de forma corporal.

Tabela 3: Comparação dos macronutrientes dietéticos entre os pacientes com e sem fibrose significativa (kPa) avaliado por meio da elastografia transitória hepática.

Nutrientes	**Rigidez hepática ≤ 7 kPa sem fibrose significativa** **n= 28**	**Rigidez hepática > 7 kPa com fibrose significativa** **n= 61**	***Valor de p***
Energia (kcal)	1374,26 ± 443,67	1427,97 ± 405,12	0,36
PTN (g)	58,89 ± 19,20	59,17 ± 16,69	0,96
CHO (g)	178,75 ± 58,10	186,42 ± 66,37	0,61
Fibras (g)	15,64 ± 6,69	15,41 ± 4,93	0,98
GT (g)	47,69 ± 16,53	49,14 ± 12,47	0,32
AGS (g)	15,98 ± 5,27	16,07 ± 4,14	0,41
AGM (g)	16,45 ± 6,42	17,39 ± 4,61	0,12
AGPI (g)	10,68 ± 4,15	11,00 ± 3,40	0,56
Colesterol (mg)	166,21 ± 1,38	166,29 ± 1,25	0,87
AL (g)	9,26 ± 3,78	9,64 ± 3,08	0,43
AAL (g)	1,18 ± 0,35	1,21 ± 0,33	0,66
Relação n-6/n-3	7,68 ± 1,30	7,88 ± 0,88	0,55

Os resultados foram expressos em média ± DP (desvio padrão). Foi utilizado o teste Mann-Whitney U *test* ao nível de *5% para comparação dos grupos de fibrose hepática (kPa).
PTN- proteínas; CHO- carboidratos; GT- gorduras totais; AGS- ácidos garxos saturados; AGM- ácidos graxos monoinsaturados; AGPI- ácidos graxos poli-insaturados.

Tabela 4: Comparação da ingestão de lipídios de pacientes com DHGNA com a recomendação da NCEP ATP III.

Nutrientes	**Recomendação**	**Média ± DP** **n=89**	**Abaixo da recomendação %**	**Acima da recomendação %**

GT (% kcal)	**25-35%***	31,71 ± 3,91	5,6	22,5
AGS (% kcal)	**<7%***	10,63 ± 1,82	-	97,8
AGM (% kcal)	**Até 20%***	11,14 ± 1,73	100	-
AGPI (% kcal)	**Até 10%***	7,06 ± 1,27	93,3	-

*NCEP ATP III (Third Report of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III)
DP- desvio padrão; GT- gorduras totais; AGS- ácidos garxos saturados; AGM- ácidos graxos monoinsaturados; AGPI- ácidos graxos poli-insaturados.

Tabela 5: Comparação dos ácidos graxos de eritrócitos entre os pacientes com e sem fibrose significativa (kPa) avaliado por meio da elastografia transitória hepática.

Variáveis	**Rigidez hepática ≤ 7 kPa sem fibrose significativa**	**Rigidez hepática > 7 kPa com fibrose significativa**	***Valor de p***
	n= 28	**n= 61**	
16:0	19,33 ± 2,37	21,52 ± 3,46	**0,01***
18:0	16,92 ± 1,99	17,63 ± 1,73	0,05*
ΣAGS	48,92 ± 7,17	47,42 ± 4,32	0,39
18:1 n-9 (AO)	9,95 ± 1,44	11, 16 ± 2,21	**0,00***
ΣAGM	15,81 ± 2,65	17,37 ± 3,88	0,06
18:2 n-6 (AL)	8,71 ± 2,41	8,64 ± 1,69	0,41
20:4 n-6 (AA)	12,48 ± 2,55	12,81 ± 2,81	0,49
ΣAGPI n-6	28,19 ± 4,77	28,45 ± 3,88	0,96
18:3 n-3 (AAL)	0,62 ± 0,58	0,51 ± 0,44	0,57
20:5 n-3 (EPA)	1,35 ± 0,52	1,24 ± 0,39	0,72
22:6 n-3 (DHA)	3,39 ± 0,95	3,21 ± 0,91	0,24
ΣAGPI n-3	7,06 ± 2,33	6,74 ± 1,69	0,44
ΣAGPI	35,26 ± 6,00	35,19 ± 4,14	0,77
Relação n-6/n-3	4,19 ± 0,86	4,44 ± 1,12	0,25
Índice de ômega 3	4,74 ± 1,13	4,35 ± 1,11	0,17

AA/AL	1,52 ± 0,40	1,51 ± 0,40	0,88
EPA + DHA/AAL	14,48 ± 10,67	12,21 ± 10,23	0,44

Os resultados foram expressos em média ± DP (desvio padrão). Foi utilizado o teste Mann-Whitney U *test* ao nível de *5% para comparação dos grupos de fibrose hepática (kPa).
AO- ácido oleico; AL- ácido linoleico; AA- ácido araquidônico, AAL- ácido alfa-linolênico; EPA- ácido eicosapentaenoico; DHA- ácido docosaexaenoico.

Tabela 6: Correlação entre a fibrose hepática (kPa) avaliado por meio da elastografia transitória hepática com os ácidos graxos de eritrócitos.

Variáveis	r_s	***Valor de p***
16:0	**0,334**	**0,00***
18:0	0,204	0,05
ΣAGS	-0,181	0,09
18:1 n-9	**0,325**	**0,00***
ΣAGM	**0,292**	**0,00***
18:2 n-6	0,197	0,06
20:4 n-6	0,065	0,54
ΣAGPI n-6	-0,008	0,94
18:3 n-3	-0,208	0,17
20:5 n-3	-0,087	0,42
22:6 n-3	-0,130	0,22
ΣAGPI n-3	-0,071	0,51
ΣAGPI	-0,030	0,78
Relação n-6/n-3	0,129	0,23
EPA + DHA	-0,179	0,09
AA/AL	-0,091	0,40
EPA + DHA/AAL	-0,050	0,74

18:0/16:0	**-0,296**	**0,00***
16:1 n-7/16:0	0,117	0,34
18:1 n-9/18:0	0,182	0,09
16:0/18:2 n-6	0,049	0,65

r_s: coeficiente de correlação de Spearman ao nível de *5%
AO- ácido oleico; AL- ácido linoleico; AA- ácido araquidônico, AAL- ácido alfa-linolênico; EPA- ácido eicosapentaenoico; DHA- ácido docosaexaenoico.

Discussão

Os principais resultados do presente estudo foram à inadequação importante no consumo alimentar de acordo com o preconizado pelo NCEP ATP III, destacando a baixa ingestão de AGM e AGPI e elevada em AGS. Por outro lado, observou-se aumento significativo do AGS palmítico (16:0) e do AGM oleico (18:1 n-9) em eritrócitos. Além disso, o grupo com fibrose mais avançada apresentou nos eritrócitos redução da relação 18:0/16:0, que indiretamente avalia a atividade da enzima elongase de ácidos graxos de cadeia longa 6 (ELOVL6), e aumento da relação 18:1n-9/18:0, índice utilizado para avaliar a atividade da esteril-CoA desaturase1 (SCD1), membros da família de enzimas lipogênicas e responsável pela síntese dos AGM, que em mamíferos sofre regulação pelo fator de transcrição SREBP-1c. Em adição, foi encontrado um aumento significativo no índice de LDN (síntese *de novo* de ácidos graxos ou lipogênese *de novo* a partir de outros substratos não lipídicos como por exemplo glicose) avaliado pela relação 16:0/18:2n-6 em pacientes com maior grau de RI HOMA-IR >4,5 (p=0,03).

No presente estudo o consumo de AGM e AGPI foram inferiores ao valor recomendado em 100%, e 93,3% dos pacientes, respectivamente, não obstante, 97,8% pacientes excederam o limite máximo da ingestão diária para AGS preconizados pelo NCEP ATP III[37]. O cenário encontrado corrobora o aumento significativo da ingestão de alimentos industrializados e redução do consumo de frutas e vegetais no Brasil e no mundo[38]. Achados similares foram encontrados por Ferolla et al. no Brasil[39], entretanto, Cortez-Pinto et al. em Portugal demonstraram inadequação no consumo de 82,2% para AGM e 100% para AGPI em pacientes com DHGNA mas, o consumo de AGS foi adequado em 100% da amostra[40]. Essa discrepância na ingestão de AGS pode ser atribuída ao padrão de consumo alimentar das diferentes regiões geográficas.

No seu conjunto esses dados nos mostram que os processos de transição nutricional e epidemiológica que vem ocorrendo no mundo ratificam a importância do impacto da dieta sobre a saúde, com ênfase na relação entre o consumo de lipídios e o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis[41,42].

A análise do conteúdo de AG de eritrócitos revelou uma diminuição significativa na relação 18:0/16:0 e aumento na relação 18:1n-9/18:0 relativos ao aumento do 16:0 e do 18:1n-9 associadas ao grau de fibrose hepática avançada. Desse modo, sugerimos que níveis elevados do 16:0 podem refletir o consumo elevado de alimentos ricos em óleo de palma que é uma das principais fontes lipídicas utilizadas na produção de alimentos industrializados e processados, tendo em vista que esse óleo é a principal fonte de 16:0 que é o AGS mais abundante da dieta[43,44].

Outros possíveis mecanismos para o aumento do 16:0 seria, o aumento da LDN frente à resposta da RI que tem como produto final da catalise da ácido graxo sintase (FAS) sob a acetil-CoA e o malonil-CoA o 16:0[45], e a diminuição da atividade da enzima ELOVL6 que atua elongando o 16:0 a 18:0[46,47], ambos justificando a redução na relação 18:0/16:0. Matsuzaka et al. demonstraram em ratos nocautes (ELOVL6 -/-) alimentados com dieta rica em gordura e sacarose uma proteção contra RI no fígado apesar da obesidade[48].

Yamada et al. encontraram níveis elevados do 16:0 e 18:1n-9, diminuição na relação 18:0/16:0 e aumento na relação 18:1n-9/18:0 no tecido hepático de indivíduos com EH e EHNA comparados a controles saudáveis[49]. Corroborando a baixa atividade da enzima ELOVL6 e o aumento da SCD1 no fígado de pacientes com DHGNA. Diferentemente desse estudo, nós avaliamos a atividade dessas enzimas utilizando o conteúdo de AG em eritrócitos sugerindo que, o perfil de ácidos graxos nesse compartimento biológico seja influenciado pelo metabolismo lipídico hepático, o que reforça a utilização desse método “não invasivo” não só para avaliar ingestão lipídica a médio prazo, mas também a influência do metabolismo lipídico hepático na composição de AG de eritrócitos.

Desse modo, podemos sugerir que apesar da ingestão de AGM estar abaixo da recomendação em 100% dos pacientes avalidos, o aumento do 18:1n-9 nos eritrócitos possa ser justificado pelo aumento na atividade da enzima SCD1 que cataliza a dessaturação do 18:0 à 18:1n-9. Em modelo animal, a interrupção do gene SCD1 resultou em uma linhagem de ratos magros, protegidos da obesidade e da RI induzidas pela dieta, acompanhado pelo menor acúmulo de lipídios corporais e hepáticos,

aumento da taxa metabólica e da oxidação lipídica, diminuição das taxas de lipogênese com notável redução do ácido graxo 18:1n-9[50,51].

Concisamente, o aumento do 16:0 e do 18:1n-9 nos indivíduos com fibrose avançada sugere uma forte associação entre as enzimas lipogênicas ELOVL6 e SCD1 com a gravidade da DHGNA. No entanto, a composição dos AG dietéticos, os processos enzimáticos de elongação e desaturação, bem como, da RI e da LDN influenciam no conteúdo de ácidos graxos de tecido e fluidos biológicos.

O índice, ou seja, a relação 16:0/18:2n-6 foi proposta por Hudgins et al para avaliar LDN, e tem como base que quanto maior a síntese de 16:0 menor a proporção 18:2n-6 nos TG das VLDL. Esse índice tem sido utilizado como marcador de lipogênese em humanos[52]. No presente estudo nós avaliamos esse índice em eritrócitos e essa relação 16:0/18:2n-6 foi significativamente maior nos indivíduos com maior grau de RI avaliada pelo HOMA-IR. Lee et al. constataram que pacientes com maior conteúdo de gordura hepática apresentavam maior índice de LDN comparado ao grupo com menor conteúdo de gordura hepática[16]. Cabe ressaltar que, essa técnica utiliza AG dos TG das VLDL que refletem a ingestão lipídica recente, desse modo, sugerimos a medida desse índice utilizando os AG de eritrócitos que refletem a ingestão a médio prazo possa minimizar possíveis vieses da ingestão recente do 18:2n-6[53,54].

Diversos estudos demonstram que, o acúmulo de gordura na região abdominal, é um fator preditor para o depósito de gordura hepática, independente da quantidade total de gordura corporal[55,56]. O PC e a RCEst são indicadores de adiposidade abdominal mais sensíveis a alterações cardiometabólicas que o IMC[57,58,59]. Cabe ressaltar que, até o momento, não há estudos que avaliaram a adiposidade abdominal utilizando a RCEst em indivíduos com DHGNA. No presente estudo, ambos os indicadores foram significativamente maiores no grupo com fibrose significativa. Tal achado por ser explicado pelo potencial lipolítico da gordura visceral, frente a menor sensibilidade à insulina e maior concentração de β-receptores nessa região, levando ao mecanismo de drenagem da gordura visceral diretamente para o sistema porta, aumentado o fluxo de ácidos graxos não esterificados para o fígado, excedendo sua capacidade de metabolização e exportação levando a síntese e acúmulo de TG no hepatócito[60].

A limitação do presente estudo atribui-se a não utilização da biópsia hepática considerada “padrão ouro” para estadiar o grau de fibrose hepática. Contudo, o diagnóstico por esse método pode apresentar erros inerentes à variabilidade inter-observadores e o tamanho amostral.

Em conclusão, até onde sabemos, esse é o primeiro estudo a avaliar o consumo alimentar, a composição de ácidos graxos de eritrócitos em pacientes com diferentes graus de fibrose hepática avaliados pelo método da elastografia transitória hepática. Os pacientes com DHGNA apresentaram importantes inadequações no consumo de lipídios, alterações na composição de AG em eritrócitos e alta prevalência de adiposidade abdominal. Desse modo, ressaltamos a importância do acompanhamento nutricional com especial atenção ao padrão do consumo de lipídios e a perda de peso, enfatizando a redução do consumo de AGS e aumento do consumo de AGM e AGPI visando evitar a progressão da DHGNA.

Referências

1. Williams CD, Stengel J, Asike MI, Torres DM, Shaw J, Contreras M, et al. 2011. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. Gastroenterology. 140: 124-31.

2. Clark JM. 2006. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. J. Clin. Gastroenterol. 40 Suppl: S5-10.

3. Than NN.; Newsome, PM. 2015. A concise review of non-alcoholic fatty liver disease. Atherosclerosis. 239: 192-202

4. Ângulo P. 2007.Obesity and nonalcoholic fatty liver disease. Nutr Rev. 656: S57-63.

5. Milić S, Lulić D, Štimac D. 2014. Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: Biochemical, metabolic and clinical presentations. World J Gastroenterol. 20: 9330-7.

6. Milić S, Stimac, D. 2012. Nonalcoholic fatty liver disease/steatohepatitis: epidemiology, pathogenesis, clinical presentation and treatment. Dig Dis. 30: 158-62.

7. Cusi K. 2009. Nonalcoholic fatty liver disease in type2 diabetes mellitus. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 16: 141-9.

8. Kelishadi R, Cook SR, Adibi A, Faghihimani Z, Ghatrehsamani S, Beihaghi A, et al. 2009. 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. 22: 1-29.

9. Neuschwander-Tetri BA. 2010. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: The central role of non triglyceride fatty acid metabolites. Hepatology. 52: 774-88.

10. Rahimi RS, Landaverde C. 2013. Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: clinical implications and treatment. Nutr Clin Pract. 28: 40-51.

11. Wu M, Singh SB, Wang J, Chung CC, Salituro G, Karanam BV, et al. 2011. Antidiabetic and antisteatotic effects of the selective fatty acid synthase (FAS) inhibitor platensimyc in in mouse models of diabetes. Proc Natl Acad Sci USA. 108: 5378-83.

12. Lambert JE, Ramos-Roman MA, Browning JD, Parks EJ. 2014. Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. Gastroenterology. 146: 726-35.

13. Chong MF, Hodson L, Bickerton AS, Roberts R, Neville M, Karpe F, et al. 2008. Parallel activation of de novo lipogenesis and stearoyl-CoA desaturase activity after 3 d of high-carbohydrate feeding. Am J Clin Nutr. 87:817-23.

14. Lee WN, Lim S, Bassilian S, Bergner EA, Edmond J. 1998. Fatty acid cycling in human hepatoma cells and the effects of troglitazone. J Biol Chem. 273: 20929-34.

15. Jacobs S, Jäger S, Jansen E, Peter A, Stefan N, Boeing H, et al. 2015. Associations of Erythrocyte Fatty Acids in the DeNovo Lipogenesis Pathway with Proxies of Liver Fat Accumulation in the EPIC-Potsdam Study. PLoS One. 10: e0127368.

16. Lee JJ, Lambert JE, Hovhannisyan Y, Ramos-Roman MA, Trombold JR, Wagner DA, et al. 2015. Palmitoleic acid is elevated in fatty liver disease and reflects hepatic lipogenesis. Am J Clin Nutr. 101:34-43.

17. Ramadori P, Kroy D, Streetz KL. 2015. Immunoregulation by lipids during the development of non-alcoholic steatohepatitis. HepatoBiliary Surg Nutr. 4:11-23.

18. Gorden DL, Myers DS, Ivanova PT, Fahy E, Maurya MR, Gupta S, et al. 2015. Biomarkers of NAFLD progression: a lipidomics approach to an epidemic. J Lipid Res. 56: 722-736.

19. Gentile CL, Pagliassoli M. 2008. The role of fatty acids in the development and progression of nonalcoholic fatty liver disease. J Nutr Biochem. 19: 567-76.

20. Musso G, Gambino R, Michieli F, Cassader M. 2003. Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology. 37: 909-15.

21. Corte-Pinto H, Jesus L, Barros H, Lopes C, Moura MC, Camilo ME. 2006. How different is the dietary pattern in non-alcoholic steatohepatitis patients? Clin Nutr. 25: 816-23.

22. Solga S, Alkhuraishe AR, Clark JM, Torbenson M, Greenwald A, Diehl AM, et al. 2004. Dietary composition and nonalcoholic fatty liver disease. Dig Dis Sci. 49: 1578-83.

23. Elizondo A, Araya J, Rodrigo R, Poniachik J, Csendes A, Maluenda F, et al. 2007. Polyunsaturated Fatty Acid Pattern in Liver and Erythrocyte Phospholipids from Obese Patient. Obesity. 15: 24-31.

24. Petit JM. Guiu B, Duvillard L, Jooste V, Brindisi MC, Athias A, et al. 2012. Increased erythrocytes n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids is significantly associated with a lower prevalence of steatosis in patients with type 2 diabetes. Clin Nutr. 31: 520-5.

25. Sun Q, Ma J, Campos H, Hu FB. 2007. Plasma and erythrocyte biomarkers of dairy fat intake and risk of is chemic heart disease. Am J Clin Nutr. 86: 929-37.

26. Adams LA, Lindor KD. 2007. Nonalcoholic fatty liver disease. Ann Epidemiol. 17: 863-869.

27. Ong ZM, Younossi JP. 2007. Epidemiology and natural history of NAFLD and NASH. Clin Liver Dis. 11: 1-16.

28. Wong VW, Vergniol J, Wong GL, Foucher J, Chan HL, Le Bail B, et al. 2010. Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology. 51: 454-62.

29. You SC, Kim KJ, Kim SU, Kim BK, Park JY, Kim do Y, et al. 2015. Factors associated with significant liver fibrosis assessed using transient elastography in general population. World J Gastroenterol. 21: 1158-66.

30. Broekhuyse RM. 1974. Long-term storage of erythrocytes for quantitative analyses of lipids. Clin Chim Acta. 52: 53-8.

31. Lepage G, Roy CC. 1986. Direct trans esterification of all classes of lipids in a one-stepreaction. J Lipid Res. 27: 114-20.

32. Pitanga FJG, Lessa I. 2006. Razão cintura-estatura como discriminador do risco coronariano em adultos. Rev Assoc Med Bras. 52:157-161.

33. Bergman RN, Stefanovski D, Buchanan TA, Sumner AE, Reynolds JC, Sebring NG, et al. 2011. A Better Index of Body Adiposity. Obesity. 19: 1083-9.

34. Krakauer NY, Krakauer JCA. 2012. New Body Shape Index Predicts Mortality Hazard Independently of Body Mass Index. PLoS One. 7: e39504.

35. IBGE. Pesquisa de orçamentos familiares, 2008-2009: Tabela de Composição Nutricional dos Alimentos Consumidos no Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, 2011.

36. IBGE. Pesquisa de orçamentos familiares, 2008-2009: Tabela de Medidas Referidas para os Alimentos Consumidos no Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, 2011.

37. National Institute of Health. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP). Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III), September, 2002.

38. Gaino NM, Amâncio RD, Oetterer M, Silva MVDA. 2012. Household availability industrialized foods in Brazil. Hig Aliment. 26: 55-63.

39. Ferolla SM, Ferrari TC, Lima ML, Reis TO, Tavares-Jr WC, Couto OF, et al. 2013. Dietary patterns in Brazilian patients with nonalcoholic fatty liver disease: a cross-sectional study. Clinics (São Paulo). 68: 11-7.

40. Cortez-Pinto H, Jesus L, Barros H, Lopes C, Moura MC, Camilo ME. 2006. How different is the dietary pattern in non-alcoholic steatohepatitis patients? Clin Nutr. 25: 816-23.

41. Popkin BM, Adair LS, Ng SW. 2012. Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. Nut Rev. 70: 3-21.

42. World Health Organization. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation. Geneva: World Health Organization; 2003.

43. Jambari A, Azhar B, Ibrahim NL, Jamian S, Hussin A, ChongLeong P, et al. 2012. Avian biodiversity and conservation in Malaysian oil palm production areas. Journal of Oil Palm Research. 24: 1277-86.

44. Hudgins LC, Parker TS, Levine DM, Hellerstein MK. 2011. A dual sugar challenge test for lipogenic sensitivity to dietary fructose. J Clin Endocrinol Metab. 96: 861-8.

45. Ntambi JM, Miyazaki M, Stoehr JP, Lan H, Kendziorski CM, Yandell BS, et al. 2002. Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protect smice against adiposity. Proc Natl Acad Sci USA. 99: 11482-6.

46. Kumadaki S, Matsuzaka T, Kato T, Yahagi N, Yamamoto T, Okada S, et al. 2008. Mouse Elovl-6 promoter is an SREBP target. Biochem Biophys Res Commun. 368: 261-6.

47. Miyazaki M, Kim YC, Ntambi JM. 2001. Oleoyl-CoA is the major de novo product of stearoyl-CoA desaturase 1 gene isoform and substrate for the biosynthesis of the Harderian gland 1-alkyl-2,3-diacylglycerol. J Biol Chem. 276: 39455-61.

48. Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, Kato T, Atsumi A, Yamamoto T, et al. 2007. Crucial role of a long-chain fatty acid elongase, Elovl6, in obesity-induced insulin resistance. Nat Med. 13: 1193-202.

49. Yamada K, Mizukoshi E, Sunagozaka H, Arai K, Yamashita T, Takeshita Y, et al. 2015. Characteristics of hepatic fatty acid compositions in patients with nonalcoholic steatohepatitis. Liver Int. 35: 582-90.

50. Miyazaki M, Kim YC, Ntambi JM. 2001. Oleoyl-CoA is the major de novo product of stearoyl-CoA desaturase 1 gene isoform and substrate for the biosynthesis of the

Harderian gland 1-alkyl-2,3-diacylglycerol. The Journal of Biology Chemistry. 42: 39455-61.

51. Rahman SM, Dobrzyn A, Lee SH; Dobrzyn P; Miyazaki M; Ntambi JM. 2005. Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency increases insulin signaling and glycogen accumulation in brown adipose tissue. American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism. 288: E381-E387.

52. Hudgins LC, Hellerstein M, Seidman C, Neese R, Diakun J, Hirsch J. 1996. Human fatty acid synthesis is stimulated by a eucaloric low fat, high carbohydrate diet. J Clin Invest. 97: 2081-91.

53. Hodson L, Skeaff CM, Fielding BA. 2008. Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. Prog Lipid Res 47: 348-80.

54. Durrington PN, Bolton CH, Hartog M, Angelinetta R, Emmett P, Furniss S. 1977. The effect of a low-cholesterol, high-polyunsaturate diet on serum lipid levels, apolipoprotein B levels and triglyceride fatty acid composition. Atherosclerosis. 27: 465-75.

55. Warensjo E, Rosell M, Hellenius ML, Vessby B, De Faire U, Risérus U. 2009. Associations between estimated fatty acid desaturase activities in serum lipids and adipose tissue in humans: links to obesity and insulin resistance. Lipids Health Dis. 8: 37.

56. Chan DC, Watts GF, Barrett PH, Burke V. 2003. Waist circumference, waist-to-hip ratio and body mass index as predictors of adipose tissue compartments in men. QJM 96: 441-7.

57. Ho SY, Lam TH, Janus ED. 2003. Waist to stature ratio is more strongly associated with cardiovascular risk factors than other simple anthropometric indices. Ann Epidemiol. 13: 683-91.

58. Lin WY, Lee LT, Chen CY, Lo H, Hsia HH, Liu IL, et al. 2002. Optimal cut-off values for obesity: using simple anthropometric indices to predict cardiovascular risk factors in Taiwan. Int J Obes Relat Metab Disord. 26: 1232-8.

59. Björntorp, P. 2001. Do stress reactions cause abdominal obesity and comorbidities? Obes Rev. 2: 73-86.

60. Tamura S, Shimomura I. 2005. Contribution of adipose tissue and de novo lipogenesis to nonalcoholic fatty liver disease. J Clin Invest. 115: 1139-42.

7 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que pacientes com DHGNA apresentam importante inadequação no consumo de lipídios, com ênfase na baixa ingestão de AGM e AGPI e elevada em AGS.

Os pacientes com grau de fibrose hepática avançada apresentaram alterações no perfil de AG nos eritrocitos, destacando a diminuição na relação 18:0/16:0 e aumento na relação 18:1n-9/18:0 relativos ao aumento do 16:0 e do 18:1n-9 e aumento do índice de LDN representado pela relação 16:0/18:2 n-6 e alta prevalência de adiposidade abdominal.

Considerando os resultados do presente estudo, ressaltamos a importância do acompanhamento nutricional visando à perda de peso e a adequada distribuição dos lipídios dietéticos de acordo com as recomendações estabelecidas pelos órgãos competentes.

Podemos concluir que os pacientes necessitam de acompanhamento nutricional com foco na redução do peso corporal, do consumo de alimentos industrializados ricos em gorduras saturadas e açúcares e aumento do consumo de alimentos ricos em AGM e AGPI n-3 bem como, o aumento do consumo de frutas e hortaliças.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, M.H.; BYRNE, C.D. Modulation of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) as potential treatments for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Drug Discovery Today**. v.12, n. 17-18, p. 740-7, Set. 2007.

ALBANIS, E.; FRIEDMAN, S.L. Hepatic fibrosis. Pathogenesis and principles of therapy. **Clin. Liver Dis**. v.5, n.2, p. 315-34, May. 2001.

ALLARD, J.P.; AGHDASSI, E.; MOHAMMED. S. et al. Nutritional assessment and hepatic fatty acid composition in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a cross-sectional study. **J Hepatol**. v.48, n.2, p. 300-7, Feb. 2008.

ALSHAALAN, R.; ALJIFFRY. M.; AL-BUSAFI, S. et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Noninvasive Methods of Diagnosing Hepatic Steatosis. Saudi J Gastroenterol. v.21, n.2, p. 64-70, Mar-Apr. 2015.

ANDERSEN, L.F.; SOLVOLL. K.; JOHANSSON. L.R et al. Evaluation of a food frequency questionnaire with weighed records, fatty acids, and alpha-tocopherol in adipose tissue and serum. **Am J Epidemiol**. v.150, n.1, p.75-87, Jul. 1999.

ANDERSON, N.; BORLAK, J. Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets in Steatosis and Steatohepatitis. **Pharmacol Rev**. n.60, p. 311-57, Sep. 2008.

ARAYA, J.; RODRIGO, R.; VIDELA. L.A. et al. 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 (London)**. v.106, n.6, p. 635-43, Jun. 2004.

ASAKURA, L.; LOTTENBERG, A.M.; NEVES. M.Q. et al. Dietary medium-chain triacylglycerol prevents the postprandial rise of plasma triacylglycerols but induces hypercholesterolemia in primary hypertriglyceridemic subjects. **Am J Clin Nutr**. v.71, n.3, p. 701-5, Mar. 2000.

ASSY, N.; NASSAR, F.; NASSER, G. et al. Olive oil consumption and non-alcoholic fatty liver disease. **World J Gastroenterol**. v.15, n.15, p. 1809-15, Apr. 2009.

BEHROUZIAN, B.; BUIST, P.H. Mechanism of fatty acid desaturation: a bioorganic perspective. **Prost Leukot Essent Fatty Ac**. v.68, n.2, p. 107-12, Feb. 2003.

BELLENTANI, S.; TIRIBELLI, C.; SACCOCCIO, G. et al. Prevalence of chronic liver disease in the general population of northern Italy: the Dionysos Study. **Hepatology**. v.20, n.6, p. 1442-9, Dec. 1994.

BELLENTANI, S.; SCAGLIONI, F;. MARINO, M. et al. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. **Dig Dis**.v. 28, p. 155-61, 2010.

BERGMAN, R.N.; STEFANOVISK, D.; BUCHANAN, T.A. et al. A Better Index of Body Adiposity. **Obesity**. v.19, n.5, p. 1083-9, May. 2011.

BRETILLON, L.; CHARDIGNY, J.M.; SÉBÉDIO, J.L. et al. Oxidative metabolism of [1-14C] mono-trans isomers of linoleic and α−linolenic acids in the rat. **Biochim Biophys Acta**. v.1390, n.2, p. 207-14, Feb. 1998.

BROWNING, J.D. Statins and Hepatic Steatosis: Perspectives From the Dallas Heart Study. **Hepatology**. v.44, n.2, p. 466-71, Aug. 2006.

BUETTNER, R.; PARHOFER, K.G.; WOENCKHAUS, M. et al. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. **J Mol Endocrinol**. v.36, n.3, p. 485-501, Jun. 2006.

BYRNE, C.D. Fatty liver: Role of inflammation and fatty acid nutrition. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**. v.82, p. 265-71, Apr-Jun. 2010.

CALDER, P.C. n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. **Am J Clin Nutr**. v.83, n.6, p. **S1505-19S, Jun. 2006.**

CALDER, P.C. Fatty acids and inflammation: the cutting edge between food and pharma. **Eur J Pharmacol**. v.668, suppl 1, p. S50-S8, Set. 2011.

CAO, J.; SCHWICHTENBERG, K.A.; HANSON, N.Q. et al. Incorporation and Clearance of Omega-3 Fatty Acids in Erythrocyte Membranes and Plasma Phospholipid. **Clinical Chemistry**. v.52, n.12, p. 2265-72, Dec. 2006.

CAPANNI, M.; CALLELLA, F.; BIAGINI, M.R. 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**. v.23, n.8, p. 1143-51, Apr. 2006.

CHALASANI, N.; YOUNOSSI, Z.; LAVINE, J.E. 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**. v.55, n.6, p. 2005-23, Jun. 2012.

CORELLA, D.; ORDOVÁS, J.M. Biomarkers: background, classification and guidelines for applications in nutritional epidemiology. **Nutr Hosp**. v.26, v.31 Suppl 3, p. 177-88, Feb. 2015.

COSTA, A.G.V.; PRIORE, S.E.; SABARENSE, C.M. et al. Questionário de frequência de consumo alimentar e recordatório de 24 horas: aspectos metodológicos para avaliação da ingestão de lipídeo. Rev. Nutr. v.19, n.5, p. 631-41, Sep/Oct. 2006.

COTRIM, H.P.; PARISE, E.R.; OLIVEIRA, C.P. et al. Non-alcoholic fatty liver disease in Brasil. Clinical and histological profile. **Ann Hepatol**. v.10, n.1, p. 33-7, Jan-Mar. 2011.

COTRIM, H.P.; CARVALHO, F.; SIQUEIRA, A.C. et al. Nonalcoholic fatty liver and insulin resistance among petrochemical workers. **Jama-Journal of the American Medical Association**. v.294, n.13, p. 1618-20, 2005.

CURY, R.; POMPÉIA, C.; MIYASAKA, C.K. et al. Entendendo a gordura – os ácidos graxos. 1ª ed. Editora Manole. São Paulo, 2002.

CUSI, K. Nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes mellitus. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**. v.16 n.2, p. 141-9, Apr. 2009.

DAY, C.P.; JAMES, O. Steatohepatitis: a tale of two hits? **Gastroenterol**. v.114, n.4, p. 842-5, Apr. 1998.

DE ALMEIDA, I.T.; CORTEZ-PINTO, H.; FIDALGO, G. et al. Plasma total and free fatty acids composition in human non-alcoholic steatohepatitis. **Clin Nutr**. v.21, n.3, p. 219-23, Jun. 2002.

ELIZONDO, A.; ARAYA, J.; RODRIGO, R. et al. Polyunsaturated Fatty Acid Pattern in Liver and Erythrocyte Phospholipids from Obese Patient. **Obesity**. v.15, n.1, p. 24-31, Jan. 2007.

ELIZONDO, A.; ARAYA, J.; RODRIGO, R. et al. Effects of weight loss on liver and erythrocyte polyunsaturated fatty acid pattern and oxidative stress status in obese patients with non-alcoholic fatty liver disease. **Biol Res**. v.41, n.1, p. 59-68, 2008.

FALCK-YTTER, Y.; YOUNOSSI, Z..; MARCHESINI, G. et al. Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes. **Seminars in liver disease**, v.21, n.1, p. 17-26, 2001.

FISBERG, R.M.; SLATER, B.; MARTINI, L.A. Métodos de Inquéritos Alimentares. In: Fisberg RM, Slater B, Marchioni DM, Martini LA. Inquéritos Alimentares- Métodos e Bases científicos. 1a ed. Barueri, 2005. p. 1-31.

FRASER, A.; ABEL, R.; LAWLOR, D.A. et al. A modified Mediterranean diet is associated with the greatest reduction in alanine aminotransferase levels in obese type 2 diabetes patients: results of a quasi-randomised controlled trial. **Diabetologia**. v.51, n.9, p. 1616-22, Sep. 2008.

FRIEDMAN, S.L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. **J Biol Chem**. v.275, n.4, p. 2247-50, Jan. 2000.

FRIEDMAN, S.L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. **Gastroenterology**. v.134, n.6, p. 1655-69, May. 2008.

GAGLIARDI, A. C. M.; MANCINI FILHO, J.; SANTOS, R. D. Perfil nutricional de alimentos com alegação de zero gordura trans. **Rev Assoc Med Brás**. v.55, n.1, p. 50-3, 2009.

GAINO, N.M.; AMÂNCIO, R.D.; OETTERER,M. et al. Household availability industrialized foods in Brazil. **Hig Aliment**. v.26, n.206/207, p. 55-63, Mar-Apr. 2012.

GARG, A. High-monounsaturated-fat diets for patients with diabetes mellitus: a meta-analysis. **Am J Clin Nutr**. v.67, n.3, p. 577S-582S, Mar. 1998.

GENTILE, C.L.; PAGLIASSOTTI, M.J. The Role of Fatty Acids in the Development and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **J Nutr Biochem**. v.19, n.9, p. 567-76, Sep. 2008.

GENTILE, C.L.; FRYE, M.A.; PAGLIASSOTTI, M.J. et al. Fatty acids and the endoplasmic reticulum in nonalcoholic fatty liver disease. **Biofactors**. v.37, n.1, p. 8-16, Jan-Feb. 2011.

GHAFOORUNISSA, G. Role of trans fatty acids in health and challenges to their reduction in Indian foods. **Asia Pac J Clin Nutr**. v.17, n.suppl 1, p. 212-5, 2008.

GORDEN, D.L.; MYERS, D.S.; IVANOVA, P.T. et al. Biomarkers of NAFLD progression: a lipidomics approach to an epidemic. **J Lipid Res**. v.56, n.3, p. 722-36, Mar. 2015.

GUILLOU, H.; ZADRAVEC, D.; MARTIN P.G. et al. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. **Prog Lipid Res**. v.49, n.2, p.186-99, Apr. 2010.

HARTTIG, U.; HAUBROCK, J.; KNUPPEL, S. et al. The MSM program: web-based statistics package for estimating usual dietary intake using the Multiple Source Method. **Eur J Clin Nutr**. v.65, n.suppl 1, p. S87-91, Jul. 2011.

HASHIMOTO, E.; TANIAI, M.; TOKUSHIGE, K. Characteristics and diagnosis of NAFLD/NASH. **J Gastroenterol Hepatol**. v.28, n. Suppl 4, p. 64-70, 2013.

HAUBROCK, J.; NOTHLINGS, U.; VOLATIER, J.L. et al. Estimating usual food intake distributions by using the multiple source method in the EPIC-Potsdam Calibration Study. **J Nutr**. v.141, n.5, p. 914-20, May. 2011.

HEDRICK, V.E.; DIETRICH, A.M.; ESTABROOKS, P.A. et al. Dietary biomarkers: advances, limitations and future directions. ***Nutrition Journal***. v.11, n.109, p. 1-14, Dec. 2012.

HUDGINS, L.C.; PARKER, T.S.; LEVINE, D.M. et al. A dual sugar challenge test for lipogenic sensitivity to dietary fructose. **J Clin Endocrinol Metab**. v.96, n.3, p. 861-8, Mar. 2011.

HUNTER, J.E.; ZHANG, J.; KRIS-ETHERTON, P.M. Cardiovascular disease risk of dietary stearic acid compared with trans, other saturated, and unsaturated fatty acids: a systematic review. **Am J Clin Nutr**. v.91, n.1, p. 46-63, 2010.

BRASIL. IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de orçamentos familiares, 2008-2009: Análise do consumo alimentar pessoal no Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, 2011.

BRASIL. IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de orçamentos familiares, 2008-2009: Tabela de Composição Nutricional dos Alimentos Consumidos no Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, 2011.

BRASIL. IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de orçamentos familiares, 2008-2009: Tabela de Medidas Referidas para os Alimentos Consumidos no Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, 2011.

BROEKHUYSE, R.M. Long-term storage of erythrocytes for quantitative analyses of lipids. **Clin Chim Acta**. v.52, n.1. p. 53-8, Apr. 1974.

JENSEN-URSTAD, A. P. L.; SEMENKOVICH, C. F. Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: housekeeper or messenger? **Biochim Biophys Acta**. v.1821, n.15, p. 747-53, May. 2012.

KIRSTEIN, D.; HOY, C.E.; HOLMER, G. Effect of dietary fats on the Δ6- and Δ5-desaturation of fatty acids in rat liver microsomes. **Br J Nutr**. v.50, n.3, p. 749-56, Nov. 1983.

KONTOGIANNI, M.D.; TILELI, N.; MARGARITI, A. et al. Adherence to the Mediterranean diet is associated with the severity of non-alcoholic fatty liver disease. **Clin Nutr**.v.33, n.4, p. 678-83, Aug. 2014.

KRAKAUER, N.Y.; KRAKAUER, J.C. A New Body Shape Index Predicts Mortality Hazard Independently of Body Mass Index. . **PLoS One**. v.7, n.7, p. e39504, Jul. 2012.

KUMADAKI, S.; MATSUZAKA, T.; KATO, T. et al. Mouse Elovl-6 promoter is an SREBP target. **Biochem Biophys Res Commun**. v.368, n.2, p. 261-6, Apr. 2008.

LAKE, A.D.; NOVAK, P.; HARDWICH, R.N. et al. The adaptive endoplasmic reticulum stress response to lipotoxicity in progressive human nonalcoholic fatty liver disease. **Toxicol Sci**. v.137, n.1, p. 26-35, Jan. 2014.

LAZO, M.; CLARCK, J.M. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: a global perspective. **Semin Liver Dis**. v.28, n.4, p. 339-50, Nov. 2008.

LEE, S.J.; RIVERA-VEJA, M.; ALSAYED, H.M.A.A. et al. Metabolic inflexibility and insulin resistance in obese adolescents with non-alcoholic fatty liver disease. **Pediatric Diabetes**. v.16, n.3, p. 211-8, May. 2015.

LEAMY, A.K.; EGNATCHIK, R.A.; YOUNG, J.D. Molecular mechanisms and the role of saturated fatty acids in the progression of non-alcoholic fatty liver disease. **Prog Lipid Res**. v.52, n.1, p. 165-74, Jan. 2013.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica. 4ª ed. Editora Sarvier. São Paulo, 2006.

LICHTENSTEIN, A.H. Thematic review series: patient-oriented research. Dietary fat, carbohydrate, and protein: effects on plasma lipoprotein patterns. **J Lipid Res**. v.47, n.8, p. 1661-7, Aug. 2006.

LISTENBERGER, L.L.; HAN, X.; LEWIS, S.E. et al. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.100, n.6, p.3077-82, Mar. 2003.

LOHMAN, T.G.; ROCHE, A.F.; MARTORELL, R. Antrhopometric standardization reference manual. Champaign: Human Kinetics Books, 1988.

LOPES, A.C.S.; CAIAFFA, W.T.; MINGOTI, S.A. et al. Ingestão alimentar em estudos epidemiológicos. **Rev bras epidemiol**. v.6, n.3, p. 209-19, Set. 2003.

LÓPEZ, J.V. Validez de la evaluación de la ingesta dietética. In: Majem LIS, Bartrina JA, Verdú MJ. Nutrición y salud pública: métodos, bases científicas y aplicaciones. Madrid: Masson; 1995. p.132-6.

LOTTENBERG, A.M.; AFONSO, M.S.; LAVRADOR, M.S.F. et al. The role of dietary fatty acids in the pathology of metabolic syndrome. **J Nutr Biochem**. v.23, n.9, p. 1027-40, Sep. 2012.

LUDWIG, J.; VIGGIANO, T.R.; McGILL, D.B. et al. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. **Mayo Clin Proc**. v. 55, p. 434-8, Jul. 1980.

MACHADO, R.M. Intake of trans fatty acids causes nonalcoholic steatohepatitis and reduces adipose tissue fat content. **J Nutr**. v.140, n.6, p.1127-32, jun. 2010.

MAHFOUZ, M.M.; KUMMEROW, F.A. Hydrogenated fat high in trans monoenes with an adequate level of linoleic acid has no effect on prostaglandin synthesis in rats. **J Nutr**. v.129, n.1, p. 15-24, Jan. 1999.

MASARONE, M.; FEDERICO, A.; ABENAVOLI, L. et al. Non alcoholic fatty liver: epidemiology and natural history. **Rev Recent Clin Trials**. v.9, n.3, p. 126-33, 2014.

MATSUZAKA, T.; SHIMANO, H. Elovl6: a new player in fatty acid metabolism and insulin sensitivity. **J Mol Med**. v.87, n.4, p. 379-84, Apr. 2009.

MATTEONI, C.A.; YOUNOSSI, Z.M.; GRAMLICH, T. et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. **Gastroenterology**. v.116, n.6, p. 1413-9, Jun. 1999.

MIELE, L.; FORGIONE, A.; GASBARRINI, G. et al. Noninvasive Assessment of Fibrosis in Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and Non-alcoholic Steatohepatitis (NASH). **Transl Res**. v.149, n.3, p. 114-25, Mar. 2007.

MILIĆ, S.; LULIĆ, D.; ŠTIMAC, D. Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: Biochemical, metabolic and clinical presentations. **World J Gastroenterol**. v.20, n.28, p. 9330-7, Jul. 2014.

MOORE, J.B.; GUNN, P.J.; FIELDING, B.A. The role of dietary sugars and de novo lipogenesis in non-alcoholic fatty liver disease. **Nutrients**. v.6, n.12, p. 5679-5703, Dec. 2014.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP). Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III), September, 2002.

NOGUEIRA, M.A.; OLIVEIRA, C.P.; FERREIRA, V.A.A. et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids in treating non-alcoholic steatohepatitis: a randomizaed, double-blind, placebo-controlled trial. **Clin Nutr**. v.S0261-5614, n.15, p. 1-9, May. 2015.

PFAFFENBACH, K.T.; GENTILE, C.L.; NIVALA, A.M. et al. Linking endoplasmic reticulum stress to cell death in hepatocytes: roles of C/EBP homologous protein and chemical chaperones in palmitate-mediated cell death. **Am J Physiol-Endocrinol Metab**. v.298, n.5, p. E1027-35, May. 2010.

PARKER, H.M.; O'CONNOR, H.T.; KEATING, S.E. et al. Efficacy of the Omega-3 index in predicting non-alcoholic fatty liver disease in overweight and obese adults: a pilot study. **Britisb Journal of Nutrition**. v.23, p. 1-8, Jun. 2015.

PAWLOSKY, R.J.; HIBBELN, J.R.; LIN, Y. et al. Effects of beef- and fish-based diets on the kinetics of n-3 fatty acid metabolism in human subjects. **Am J Clin Nutr**. v.77, n.3, p. 565-72, Mar. 2003.

PEREIRA, R.A.; SICHIERI, R. Método de avaliação do consumo de alimentos. In: Kac G, Sichieri R, Gigante DP. Epidemiologia Nutricional. 1ª ed. Rio de Janeiro: Fiocruz/Atheneu; 2007. p. 181-200.

PEREIRA, R.A.; ARAUJO, M.C.; LOPES, T.S. et al. How many 24-hour recalls or food records are required to estimate usual energy and nutrient intake? **Cad Saude Publica**. v.26, n.11, p. 2101-11, Nov. 2010.

PÉREZ-GUISADO, J.; MUÑOZ-SERRANO, A. The effect of the Spanish ketogenic mediterranean diet on nonalcoholic fatty liver disease: a pilot study. **J Med Food**. v.14, n.7-8, p. 677-80, Jul/Aug. 2011.

PERINI, J.A.L.; STEVANATO, F.B.; SARGI, S.C. et al. Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. **Rev Nutr**. v.23, n.6, p. 1075-86, Nov/Dec. 2010.

PETIT, J.M.; GUIU, B.; DUVILLARD, L. et al. Increased erythrocytes n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids is significantly associated with a lower prevalence of steatosis in patients with type 2 diabetes. **Clin Nutr**. v.31, n.4, p.520-5, Aug. 2012.

PINZANI, M. Pathophysiology of Liver Fibrosis. **Dig Dis**. v.33, n.4, p. 492-7, Jul. 2015.

PITANGA, F.J.G.; LESSA, I. Razão cintura-estatura como discriminador do risco coronariano em adultos. **Rev Assoc Med Bras**. v.52, n.3, p. 157-61, May/Jun. 2006.

PURI, P.; WIEST, M.M.; CHEUNG, O. et al. The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**. v.50, n.6, p. 1827-38, Dec. 2009.

RAHIMI, R.S.; LANDAVERDE, C. Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: clinical implications and treatment. **Nutr in Clin Pract**. v.28, n.1, p. 40-51, Feb. 2013.

RAMADORI, P.; KROY, D.; STREETZ, K.L. Immunoregulation by lipids during the development of non-alcoholic steatohepatitis. **HepatoBiliary Surg Nutr**. v.4, n.1, p. 11-23, Feb. 2015.

RATNAYAKE, W. M.; GALLI, C. Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: a background review paper. **Ann Nutr Metab**. v.55, n.1-3, p. 8-43, Sep. 2009.

ROSSATO, S.L.; FUCHS, S.C. Manejo de erros aleatórios e vieses em métodos de avaliação de dieta de curto período. **Rev Saúde Pública** v.48, n.5, p. 845-50, 2014.

RYAN, M.C.; ITSIPOULOS, C.; THODIS, T. et al. The Mediterranean diet improves hepatic steatosis and insulin sensitivity in individuals with non-alcoholic fatty liver disease. **J Hepatol**. v.59, n.1, p. 138-43, Jul. 2013.

SANDERS, F.W.; GRIFFIN, J.L. De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. **Biol Rev Camb Philos Soc**. p. 1-17, Mar. 2015.

SANDRIN, L.; FOURQUET, B.; HASQUENOPH, J.M. et al. Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. **Med Biol**. v.29, n.12, p. 1705-13, Dec. 2003.

SARAVANAN, N.; HASEEB, A.; EHTESHAM, N.Z. et al. Differential effects of dietary saturated and trans-fatty acids on expression of genes associated with insulin sensitivity in rat adipose tissue. **Eur J Endocrinol**. v.153, n.1, p.159-65, Jul. 2008.

SCHMITZ G, ECKER J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. **Prog Lipid Res**. v.47, n.2, p.147-55, Mar. 2008.

SCHUCHARDT, J.P.; HAHN, A. Bioavailability of long-chain omega-3 fatty acids. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**. v.89, n.1, p. 1-8 ,Jul. 2013.

SESSLER, A.M.; NTAMBI, J.M. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. **J Nutr**. v.128, n.6, p. 923-6, Jun. 1998.

SHAPIRO, H.; TEHILLA, M.; ATTAL-SINGER, J. et al. The therapeutic potential of long-chain omega-3 fatty acids in nonalcoholic fatty liver disease. **Clin Nutr**. v.30, n.1, p. 6-19, Feb. 2011.

SHEN, F.; ZHEN, R.D . Controlled attenuation parameter for non-invasive assessment of hepatic steatosis in Chinese patients. **World J Gastroenterol**. v.20, n.16, p. 4702-11, Apr. 2014.

SCIENTIFIC REVIEW COMMITTEE. Nutrition recommendations. Ottawa: Canadian Government Publishing Centre, Supply and Services Canada; 1990.

SIGUEL, E.N.; MACLURE, M. Relative activity of unsaturated fatty acid metabolic pathways in humans. **Metabolism**. v.36, n.7, p. 664-9, Jul. 1987.

SIMOPOULOS, A. P. Evolutionary aspects of omega-3 fatty acids in the food supply. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**. v.60, n.5-6, p. 421-9, May-Jun. 1999.

SIMOPOULOS, A.P.; LEAF, A.; SALEM, N. Essentiality and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids. **Ann Nutr Metabol**. v.43, n.3, p127-30, 1999.

SIMOPOULOS, A.P. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. **Biomed Pharmacother**. v.60, n.9, p. 502-7, Nov. 2006.

SPADARO, L.; MAGLIOCCO, O.; SPAMPINATO, D. et al. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. **Digestive and Liver Disease**. v.40, n.3, p. 194-9, Mar. 2008.

SUN, Q.; MA, J.; CAMPOS, H. et al. Plasma and erythrocyte biomarkers of dairy fat intake and risk of ischemic heart disease. **Am J Clin Nutr**. v.86, n.4, p. 929-37, Oct. 2007.

TAKKUNEN, M.; AGREN, J.; KUUSISTO, J. et al. Dietary Fat in Relation to Erythrocyte Fatty Acid Composition in Men. **Lipids**. v.48, n.11, p. 1093-1102, Nov. 2013.

TANAKA, N.; SANO, K.; HORIUCHI, A. et al. Highly purified eicosapentaenoic acid treatment improves nonalcoholic steatohepatitis. **J Clin Gastroenterol**. v.42, n.4, p. 413-8, Apr. 2008.

TETRI, L.H.; BASARANOGLU, M.; BRUNT, E.M. et al. Severe NAFLD with hepatic necroinflammatory changes in mice fed trans fats and a high-fructose corn syrup equivalent. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. v.295, n.5, p. G987-G95, Nov. 2008.

THAN, N.N.; NEWSOME, P.M. A concise review of non-alcoholic fatty liver disease. **Atherosclerosis**. v.239, n.1, p. 192-202, Mar. 2015.

TSUKADA, S.; PARSONS, C.J.; RIPPE, R.A. Mechanisms of liver fibrosis. **Clin Chim Acta**. v.364, n.1-2, p. 33-60, Feb. 2006.

TZIMA, N.; PITSAVOS, C.; PANAGIOTAKOS, D.B. et al. Adherence to the Mediterranean diet moderates the association of aminotransferases with the prevalence of the metabolic syndrome; the ATTICA study. **Nutr Metab**. v.6, n.30, Jul. 2009.

UNIVERSITY OF MINNESOTA. Nutrition Coordinating Center. Nutrition data system for research - NDSR. Minneapolis: [University of Minnesota], 2008. Disponível em: <http://www.ncc.umn.edu/products/ndsr.html>. Acesso em: 11 abril 2015.

VITTURI, N.; SOATTIN, M.; DE STEFANO, F. et al. Ultrasound, anthropometry and bioimpedance: a comparison in predicting fat deposition in non-alcoholic fatty liver disease. **Eat Weight Disord**. v.20, n.2, p. 241-7, Jun. 2015.

WANG, D.; WEI, Y.R.; SCHMOLL, D. et al. Endoplasmic reticulum stress increases glucose-6-phosphatase and glucose cycling in liver cells. 1 **Endocrinology**. v.147, n.1, p. 350-8, Jan. 2006.

WEI, Y.; WANG, D.; PAGLIASSOTTI, M.J. 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**. v.303, n.1-2, p. 105-13, 2007.

WESTERTERP, K.R.; GORIS, A.H. Validity of the assessment of dietary intake: problems of misreporting. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**. v.5, n.5, p. 489-93, Set. 2002.

WONG, V.W.; VERGNIOL, J.; WONG, G.L. et al. Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**. v.51, n.2, p. 454-62, Feb. 2010.

WONG, G.L. Update of liver fibrosis and steatosis with transient elastography (Fibroscan). **Gastroenterol**. v.1, n.1, p. 19-26, Jul. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Joint Consultation: fats and oils in human nutrition. **Nutr Rev**. v.53, n.7, p. 202-5, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity: preventing and managing the global epidemic, report of a WHO consultation on obesity, Geneva, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity: preventing and managing the global epidemic, report of a WHO consultation on obesity, Geneva, 2000.

WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANIZATION GLOBAL GUIDELINES. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis, 2012.

WILLIAMS, C.D.; STENGEL, J.; ASIKE, M.I. 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**. v.140, n.1, p. 124-31, Jan. 2011.

XU, R.; ZHANG, Z.; WANG, F.S. Liver fibrosis: mechanisms of immune-mediated liver injury. **Cell Mol Immunol**. v.9, n.4, p. 296-301, Jul. 2012.

YAMADA, K.; MIZUKOSHI, E.; SUNAGOZAKA, H. et al. Characteristics of hepatic fatty acid compositions in patients with nonalcoholic steatohepatitis. **Liver Int**. v.35, n.2, p. 582-90, Feb. 2015.

ZELBER-SAGI, S.; RATZIU, V.; OREN, R. Nutrition and physical activity in NAFLD: An overview of the epidemiological evidence. **World J Gastroenterol**. v.17, n.29, p. 3377-89, Aug. 2011.

ZHENG, J.S.; XU, A.; HUANG, T. et al. Low docosahexaenoic acid content in plasma phospholipids is associated with increased non-alcoholic fatty liver disease in China. **Lipids**. v.47, n.6, p. 549-56, 2012.

ZIVKOVIC, A.M.; GERMAN, J.B.; SANYAL, A.J. Comparative review of diets for the metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease. Comparative review of diets for the metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease. **Am J Clin Nutr**. v.86, n.2, p. 285-300, Aug. 2007.

ANEXOS

ANEXO 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
Serviço de Hepatologia

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Implicações da fonte lipídica da dieta no desenvolvimento da esteatose hepática, no perfil de ácidos graxos das frações lipídicas plasmáticas e de eritrócitos e nos processos inflamatórios de indivíduos com doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)

08/2013

- **Termo de esclarecimento:**

- Os pacientes serão abordados no ambulatório de fígado do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho após consulta com os médicos serão informados sobre a existência do estudo, seus benefíios, riscos e procedimentos que serão aplicados e convidados a participar do estudo.
-Você está sendo convidado a participar voluntariamente do projeto de pesquisa: "Implicações da fonte lipídica da dieta no desenvolvimento da esteatose hepática, no perfil de ácidos graxos das frações lipídicas plasmáticas e de eritrócitos e nos processos inflamatórios de indivíduos com doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)". O estudo tem como objetivo avaliar por meio do exame de sangue a quantidade de gorduras no sangue que em excesso pode contribuir para o aumento de gordura no fígado. Também será avaliado a quantidade de gordura ingerida na sua alimentação. Os resultados fornecerão conhecimentos para melhorar o tratamento nutricional de pacientes com esteatose hepática e esteato-hepatite. Esta informação pode ser muito importante para seu acompanhamento.

Procedimentos:

- Após sua consulta médica no ambulatório de Hepatologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) o pesquisador responsável e pesquisador colaborador pelo estudo consultará seu prontuário e preencherá uma ficha com os resultados dos seus exames realizados de rotina no hospital;
- Será realizada coleta de suas medidas corporais tais como: peso, altura, circunferência do braço e medida de gordura do seu braço;

- Você responderá perguntas sobre sua alimentação, consumo de álcool, se realiza exercícios físicos e se é fumante;
- No dia agendado, você deve comparecer em jejum de 12 horas no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, para realizar a coleta de sangue (uma amostra de 10ml de sangue será coletada para verificar como estão as dosagens de gordura em seu sangue);
- A maioria dos exames utilizados serão aqueles colhidos para avaliação na consulta, segundo a rotina de acompanhamento desses casos;
-Para o estudo você terá que disponibilizar 1 dia no Ambulatório de Hepatologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho;

Riscos/Desconfortos:

-Os riscos da retirada de sangue incluem introdução da agulha desconforto durante a coleta de sangue e poderá ocorrer mancha roxa no local da coleta.

Custos para os participantes:

- Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. A sua participação permitirá o estabelecimento do diagnóstico do estado nutricional de lipídios e possibilitará, caso necessário, o tratamento nutricional e clínico adequado.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso ao profissional responsável Wilza Arantes Ferreira Peres e Kátia Cansanção Correa de Oliveira que poderá ser encontrado através do(s) telefone(s): (21) 8801-7486. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/HUCFF/UFRJ – R. Prof. Rodolpho Paulo Rocco, n.° 255 – Cidade Universitária/Ilha do Fundão - Sala 01D-46/1° andar - pelo telefone 2562-2480, de segunda a sexta-feira, das 8 às 15 horas, ou através do e-mail: cep@hucff.ufrj.br.

Alternativas:

- É garantida a liberdade de querer não participar do projeto de pesquisa ou de retirar o consentimento a qualquer momento, no caso da aceitação, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

Privacidade e a confidencialidade:

A privacidade deriva da autonomia e engloba a intimidade da vida privada, a honra das pessoas, significando que a pessoa tem direito de limitar a exposição de seu corpo, sua imagem, dados de prontuário, julgamentos expressos em questionários, etc. A confidencialidade se refere à responsabilidade sobre as informações recebidas ou obtidas em exames e observações pelo pesquisador em relação a dados pessoais do sujeito da pesquisa. Ambas devem estar asseguradas explicitamente no protocolo de pesquisa e no TCLE (Res. CNS 196/96, IV.1.g) e deve ser assegurado ao sujeito da pesquisa que os dados pessoais oriundos da participação na pesquisa serão utilizados apenas para os fins propostos no protocolo (Res. CNS 196/96 IV.3.f).

- Os procedimentos serão adotados pelos responsáveis por este estudo no intuito de proteger a confidencialidade das informações que você forneça. As informações serão codificadas e mantidas num local reservado o tempo todo. Somente os pesquisadores principais envolvidos neste estudo terão acesso às informações e aos questionários. Após o término deste estudo, as informações serão transcritas dos questionários para arquivos no computador e serão mantidos em local reservado. Porém, o acesso permanecerá restrito aos mesmos pesquisadores. Os dados deste estudo poderão ser discutidos com pesquisadores de outras instituições, mas nenhuma identificação será

fornecida, portanto serão confidenciais como a lei determina, salvo você conceda permissão para isso. Os resultados serão discutidos você e enviados para o seu médico.
- Quando retornar na próxima consulta agendada receberá o resultado dos exames e o diagnóstico além da modificação caso necessária do tratamento.

Despesas e compensações:

- Poderá ocorrer ressarcimento, ou seja, cobertura em compensação exclusiva de despesas decorrentes da participação do sujeito no projeto. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa;
- Se você tiver algum problema de saúde em decorrência deste estudo, o tratamento será fornecido pela instituição participante. O custo deste tratamento será totalmente coberto pelo HUCFF, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

CONSENTIMENTO

Eu acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações sobre o estudo acima citado que li ou que foram lidas para mim.
Eu discuti com o Drª. Kátia Cansanção Correa de Oliveira, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou prejuízos e sem a perda de atendimento nesta Instituição ou de qualquer benefício que eu possa ter adquirido. Eu receberei uma cópia desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e a outra ficará com o pesquisador responsável por essa pesquisa. Além disso, estou ciente de que eu (ou meu representante legal) e o pesquisador responsável deveremos rubricar todas as folhas desse TCLE e assinar na ultima folha.

_____ _____

Nome do Sujeito da Pesquisa Assinatura do Sujeito da Pesquisa

Data: ____/____/____

_____ _____

Nome do representante legal Assinatura do representante legal

Data: ____/____/____

_____ _____

Nome do Pesquisador Responsável Assinatura do Pesquisador Responsável

Data: ____/____/____

ANEXO 2- Documento da aprovação do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF).

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
CLEMENTINO FRAGA FILHO
((HUCFF/ UFRJ))

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IMPLICAÇÕES DA FONTE LIPÍDICA DA DIETA NO DESENVOLVIMENTO DA ESTEATOSE HEPÁTICA, NO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DAS FRAÇÕES LIPÍDICAS PLASMÁTICAS E DE ERITRÓCITOS E NOS PROCESSOS INFLAMATÓRIOS DE INDIVÍDUOS COM DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO

Pesquisador: Wilza Arantes Ferreira Peres

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 17884213.6.0000.5257

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 458.746

Data da Relatoria: 24/10/2013

Apresentação do Projeto:

Protocolo 213-13 do grupo III, recebido em 15.10.2013.

1- Folha de Rosto - Postagem 06.10.2013

2- Projeto de Pesquisa - Postagem em 15.10.2013

3- TCLE - Postagem em 06.10.2013

4- Carta de Apresentação/Ciência de Protocolo

5- Acesso aos CVs dos pesquisadores

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar as implicações da fonte lipídica da dieta no desenvolvimento da esteatose hepática, no perfil de ácidos graxos das frações lipídicas plasmáticas e de membranas de eritrócitos e nos processos inflamatórios em pacientes com DHGNA.

Objetivo Secundário:

-Avaliar as alterações no perfil lipídico plasmático por meio das determinações de colesterol total, triglicerídeos e ácidos graxos livres e glicerol de pacientes com DHGNA; -Avaliar o perfil de ácidos

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255 Sala 01D-46
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 21.941-913
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2562-2480 **Fax:** (21)2562-2481 **E-mail:** cep@hucff.ufrj.br

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

1- Folha de Rosto - Postagem 06.10.2013

2- Projeto de Pesquisa - Postagem em 15.10.2013 - detalhado

3- TCLE - Postagem em 06.10.2013 - adequado

4- Carta de Apresentação/Ciência de Protocolo - assinada

5- Acesso aos CVs dos pesquisadores - ativos

Recomendações:

1 - Explicar a palavra "lipídeos" no TCLE.

2- O cronograma deve ser atualizado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com a Resolução CNS 466/2012, as pendências devem ser respondidas exclusivamente pelo pesquisador responsável, no prazo de 30 dias, a partir da data de envio do parecer pelo CEP. Após esse prazo, o protocolo será arquivado. Solicita-se, ainda, que as respostas sejam enviadas de forma ordenada, isto é, com numeração, conforme os itens das considerações deste parecer, destacando a localização das possíveis alterações realizadas nos documentos do protocolo, inclusive no TCLE.

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255 Sala 01D-46
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 21.941-913
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2562-2480 **Fax:** (21)2562-2481 **E-mail:** cep@hucff.ufrj.br

ANEXO 3- Formulário do recordatório de 24 horas

Recordatório 24 horas **Nome:** **(1º) (2º) (3º)**		
Desjejum **(:)** **Colação** **(:)** **Almoço** **(:)** **Lanche** **(:)** **Jantar** **(:)** **Ceia** **(:)**	**Alimento**	**Quantidade**

ANEXO 4- Formulário do instrumento de coleta de dados

INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

IDENTIFICAÇÃO	
Nº prontuário	Data da entrevista *(/ /)*
VARIÁVEIS DO PACIENTE	
SÓCIO DEMOGRÁFICAS	
Idade:	**Data de Nascimento** *(/ /)*
Sexo 1. ( ) F 2. ( ) M	

Ocupação:	**Escolaridade (anos de estudo concluídos):**	**Renda familiar (salários mínimos):**
( ) 1. Empregado	( ) 1. nenhum	( ) 1. < 1
( ) 2. Autônomo	( ) 2. 1 a 3	( ) 2. 1 a 3
( ) 3. Desempregado	( ) 3. 4 a 7	( ) 3. 4 a 6
( ) 4. Aposentado	( ) 4. 8 a 11	( ) 4. 7 e +
( ) 5. Pensionista	( ) 5. 12 e +	
( ) 6. Do lar	( ) 9. Ignorado	
( ) 7. Dependente		

DADOS ANTROPOMÉTRICOS E COMPOSIÇÃO CORPORAL			
Avaliação Nutricional			
1. Peso (Kg):		7. Relação cintura/quadril	
2. Altura (cm):		8. Índice de adiposidade corporal	
3. IMC (Kg/m²):			
4. Perímetro de cintura (cm):			
5. Perímetro do quadril (cm):			
6. Relação cintura/estatura			

EXAMES LABORATORIAIS			
Exame	**%**		
Bioquímicos		AGs de eritrócitos	
Triglicerídeos			
Colesterol total			
LDL-colesterol			
HDL-colesterol			
Aspartato aminotransferase (AST/TGO)			
Alanina aminotransferase (ALT/TGP)			
Relação AST/ALT			

Fosfatase alcalina			
Gama glutamiltransferase (GGT)			
Glicose			
Insulina de jejum			
HOMA-IR			
AGNE			
Uréia			
Creatinina			
Ácido úrico			
Albumina			
Proteínas totais			
TAP			
Plaquetas			
Citocinas			
TNF-α			
Interleucina-6			

RESULTADO ULTRASSONOGRAFIA
Esteatose leve ( ) Esteatose moderada ( ) Esteatose grave ( )
RESULTADO FIBROSCAN E CAP®
Fibroscan Resultado (kPa): Taxa de sucesso: IQR: **CAP** Resultado (dB/m): IQR:

USO DE MEDICAÇÕES

(INCLUIR MEDICAMENTOS SOB PRESCRIÇÃO, SEM PRESCRIÇÃO E FITOTERÁPICOS)

Medicação	**Dose**	**Frequência**