



UFRJ

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO
NÚCLEO DE PESQUISA EM MICRONUTRIENTES – NPQM



LIGIANE MARQUES LOUREIRO

MARCADORES DO METABOLISMO ÓSSEO E SUA RELAÇÃO COM A DOENÇA
HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOOLICA EM INDIVÍDUOS COM
OBESIDADE CLASSE III CLASSIFICADOS SEGUNDO O FENÓTIPO
METABOLICAMENTE SAUDÁVEL

RIO DE JANEIRO
2019

**MARCADORES DO METABOLISMO ÓSSEO E SUA RELAÇÃO COM A DOENÇA
HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOOLICA EM INDIVÍDUOS COM
OBESIDADE CLASSE III CLASSIFICADOS SEGUNDO O FENÓTIPO
METABOLICAMENTE SAUDÁVEL**

Ligiane Marques Loureiro

Tese 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 para à obtenção do título de **Doutor em Ciências Nutricionais**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Andréa Ramalho

Rio de Janeiro
Junho de 2019

CIP - Catalogação na Publicação

Loureiro, Ligiane Marques.

Marcadores do metabolismo ósseo e sua relação com a doença hepática gordurosa não alcoólica em indivíduos com obesidade classe III classificados segundo o fenótipo metabolicamente saudável. / Ligiane Marques Loureiro. – Rio de Janeiro: UFRJ / Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Nutrição Josué de Castro, 2019.

205 f.: il.; 31 cm.

Orientadora: Andréa Ramalho.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro / Instituto de Nutrição Josué de Castro, Programa de Pós-Graduação em Nutrição, 2019.

Referências: f.159 - 193.

1. Obesidade Mórbida- metabolismo. 2.Hepatopatia Gordurosa não alcoólica- etiologia. 3. Biomarcadores. 4. Fenótipo. 5. Cirurgia Bariátrica. 6. Doenças Ósseas Metabólicas. 7 Nutrição - Tese. I. Ramalho, Andréa. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Programa de Pós-Graduação em Nutrição. III. Título.

MARCADORES DO METABOLISMO ÓSSEO E SUA RELAÇÃO COM A DOENÇA
HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOOLICA EM INDIVÍDUOS COM OBESIDADE
CLASSE III CLASSIFICADOS SEGUNDO O FENÓTIPO METABOLICAMENTE
SAUDÁVEL

Ligiane Marques Loureiro

Tese submetida ao corpo docente do 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 **Doutor em Ciências Nutricionais**.

Examinada por:

Professora Dr.^a Avany Fernandes Pereira
Instituto de Nutrição Josué de Castro/Universidade Federal do Rio de Janeiro
Examinador / Revisor

Professor Dr.^a Wilza Arantes Ferreira Peres
Instituto de Nutrição Josué de Castro/Universidade Federal do Rio de Janeiro
Examinador

Professora Dr.^a Glorimar Rosa
Instituto de Nutrição Josué de Castro/Universidade Federal do Rio de Janeiro
Examinador

Professora Dr.^a Sílvia Elaine Pereira
Centro Multidisciplinar de Cirurgia Bariátrica e Metabólica
Examinador

Professora Dr.^a Andréa Cardoso de Mattos
Universidade Federal Fluminense Rio de Janeiro
Examinador

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL
JUNHO DE 2019

RIO DE JANEIRO/JUNHO 2019

Este trabalho foi realizado pelo Núcleo de Pesquisa em Micronutrientes (NPqM), do Instituto de Nutrição Josué de Castro (INJC), localizado no Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Rio de Janeiro em parceria com o Centro Multidisciplinar de Cirurgia Bariátrica e Metabólica, localizado em Botafogo, cidade do Rio de Janeiro, sob orientação da Professora Dra. Andréa Ramalho. O projeto contou com auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

*Dedico este trabalho aos meus pais Almir e Lígia,
meus maiores incentivadores. Ao meu esposo Rodrigo, meu
amor, amigo e parceiro de todas as horas. E a nossa amada
filha Bárbara Victória Loureiro Mendes, nosso presente e
milagre de DEUS.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me concebido a oportunidade de viver e concluir essa linda e desafiadora jornada que foi o meu doutorado. Sem dúvida, somente por ter estado em sintonia com Sua vontade desde o início da minha trajetória profissional, pude chegar até esse momento, realizando mais um dos meus maiores sonhos. Graças a Ele, posso hoje agradecer a muitas pessoas, nem que quisesse teria como nomear todas aqui, mas deixo registrado que foram muitas, e que cada uma foi de extrema importância no decorrer de toda minha vida pessoal e profissional.

Agradeço ainda aos meus amados pais, Almir N. Loureiro e Lígia R. Marques Loureiro por todo amor demonstrado de infinitas formas, através da criação que me deram, por meio de cada um dos ensinamentos e valores que me foram repassados, pois tudo que aprendi através dos seus exemplos, me fizeram ser quem sou hoje. E me garantiram também sonhar e realizar grandes metas (principalmente profissionais), muito em função da educação e incentivo aos estudos que sempre me deram. Sem a ajuda, o apoio e a segurança que sempre encontrei em vocês, essa conquista, como tantas outras que já tive nesta vida, talvez não teriam sido possíveis ou não teriam o mesmo sentido. Pai e mãe amo vocês, muito obrigada!

Aos meus demais familiares, tios, tias, primos, primas, minha irmã, Lidiane Loureiro, por todas as orações, por toda torcida e incentivo, meu muito obrigada. Agradeço aos meus avôs, Antônio Loureiro e Otávio Marques (*in memoriam*) homens que sempre me inspiraram e apoiaram muito. As minhas avós, Olívia Marques agradeço por representar pra mim, um exemplo de mulher forte e por sempre torcer e orar por mim e a Dulcimar Loureiro (*in memoriam*) por ter sido sempre alguém com muita garra para viver.

Ao meu melhor amigo, parceiro de vida, que também é meu amor e meu marido, Rodrigo C. Mendes, a você, agradeço pela família abençoada que formamos, pela linda filha, Bárbara Victória, por todo seu cuidado, amor, dedicação, incentivo e parceria que nunca faltaram em nossa relação. Obrigada por nunca me deixar desistir e por sempre embarcar nos meus sonhos, fazendo com que os “meus” se transformassem “nossos”. Amo você, que bom que estamos juntos, comemorando mais essa conquista.

A nossa filha amada, Bárbara Victória Loureiro Mendes, que nasceu em meio a jornada do doutorado, de uma maneira inusitada, prematura de seis meses, mas que nos ensinou e ensina muito com sua força e garra de viver, sem dúvida nosso maior presente e milagre de Deus. Você filha é minha força e maior incentivo para nunca desistir de nada nessa vida. Dedico a você essa conquista meu amor.

Aos amigos que fiz e que ficarão para a vida toda, durante o tempo que fiquei aqui no Rio de Janeiro para fazer o doutorado. Em especial, agradeço a Ângela Galvan, minha irmã de coração como nos consideramos. Amiga, obrigada por existir, por ter me permitido construir com você uma amizade tão verdadeira. Obrigada por ter estado ao meu lado em todos os momentos felizes, nas conquistas e também nos momentos mais difíceis durante essa jornada. A Elizabete Queiroz C. Neves, minha querida “Bete”, que além de amiga, muitas vezes foi como uma mãe. Muito obrigada por ter sido um porto seguro em tantos momentos e por todo seu carinho e incentivo, conte sempre comigo amiga amada.

As amigas e alunas de iniciação científica (IC’s), Mariana Luna, Suzane Lessa, Amanda Ribamar e Letícia Barboza, obrigada meninas por me inspirarem e por terem me ajudado em tantos momentos importantes para conclusão deste doutorado.

A todos os demais membros do Núcleo de Pesquisa em Micronutrientes (NPqM), grupo que me acolheu tão bem e que hoje faço parte, minha gratidão eterna. Aprendi muito com cada integrante, tenho muita admiração por várias pessoas desse grupo, pois de alguma forma me inspiraram e contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional nesse período de doutorado.

Agradeço também a minha amiga Adryana Cordeiro, ser humano incrível e profissional admirável, obrigada amiga pela parceria nessa jornada, por ter compartilhado tanto comigo ter contribuído de forma tão importante na minha tese e frutos gerados a partir dela. Você é maravilhosa e fez uma grande diferença na minha trajetória. Foi Deus que nos apresentou. À minha amiga, Cristiane D'Almeida mais um presente que ganhei de Deus aqui no Rio de Janeiro e no doutorado, obrigada amiga por todo incentivo, ajuda efetiva em vários momentos da conclusão do meu trabalho e por toda companhia nesses últimos dois anos durante a convivência dentro e fora do NPqM. A você, todo meu respeito e admiração.

Ao corpo docente, técnicos, todos os colegas e até mesmo aos funcionários de serviços gerais do Programa de Doutorado em Ciências Nutricionais da Universidade Federal do Rio de Janeiro que contribuíram de várias formas como minha formação, muito obrigada!

Agradeço de forma muito especial, a professora Dra. Avany Fernandes Pereira, revisora da minha tese. Muito obrigada pelas importantes contribuições que você fez para o aprimoramento do meu trabalho.

Aos membros da minha banca examinadora, queridas professoras, Dra. Wilza Peres, Dra. Andréa Cardoso de Matos, Dra. Sílvia Pereira, Dra. Glorimar Rosa e Dra. Márcia Soares agradeço por terem me acompanhado nessa trajetória, algumas de vocês estão acompanhando a minha tese, desde a minha qualificação. Muito obrigada por terem aceitado o convite para contribuírem com a conclusão dessa jornada. Saibam que cada uma de vocês foi escolhida com muito carinho.

E, finalmente, a Prof. Dra Andrea Ramalho mais que minha orientadora, uma fiel amiga, e que em vários momentos agiu como uma mãe. Andréa, com todo respeito e admiração que guardo em relação a sua pessoa, me sinto a vontade para retirar, nesse momento todos os títulos e formalidades de tratamento, para falar com você, da forma como nos tratamos informalmente. Minha amada amiga e musa inspiradora em vários sentidos, eu já nem sei, como teria sido minha trajetória aqui no Rio, se Deus não tivesse me feito ter coragem de mudar tudo, e, buscar a oportunidade de ser orientada por você. Temporalmente, foi pouco o tempo que passamos juntas, sendo bem precisa, pouco mais de dois anos, mas isso não faz qualquer diferença, pois sinto que já te conheço uma vida toda. Obrigada por tudo que me ensinou de várias formas, obrigada por todo crescimento profissional que me permitiu me dando tantas oportunidades para aprender e evoluir, obrigada por me deixar ficar perto de você, me tornar sua amiga, parceira de vários projetos e por pensar sempre no futuro em maneiras de continuarmos juntas de alguma forma. Certamente, foi Deus que preparou tudo isso, e não sei ao certo o que o futuro nos reserva, mas sei que você já marcou minha vida pessoal e profissional e que saio do Rio uma pessoa e profissional muito melhores. Que Deus te reserve os melhores encontros pessoais e profissionais na sua vida. Saiba que minha família, Rodrigo, Bárbara e eu te amamos e estaremos sempre perto de você e torcendo para que o melhor te aconteça sempre. Obrigada por tudo que fez não só por mim, mas por todos nós.

Rio de Janeiro, 27 de junho de 2019
Ligiane Marques Loureiro

“Tudo quanto te vier à mão para fazer, faze-o conforme tuas forças”.
(Eclesiastes 9:10)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Homeostase do peso corporal.....	32
Figura 2. Mecanismos fisiopatológicos da obesidade e comorbidades.....	33
Figura 3. Fórmula do Visceral Adiposity Index (VAI) segundo gênero.....	66

Artigo 1

Figure 1. Frequency (%) of subjects by age group, according to obesity phenotypes, MHO and MUHO.....	96
Frequência (%) dos sujeitos por idade, segundo os fenótipos da obesidade, OMS e OMNS	

Artigo 2

Figure 1. Frequency (%) of adequacy and inadequacy of markers and micronutrients of bone metabolism of the sample comprising 223 adults with obesity.....	107
Frequência (%) de adequação e inadequação de marcadores e micronutrientes do metabolismo ósseo da amostra composta por 223 adultos com obesidade.	

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificação da Doença Hepática Gordurosa Não Alcóolica (DHGNA), segundo Brunt et al. (1999).....	64
Quadro 2. Estadiamento da Esteatose hepática gordurosa não alcóolica (EHGNA), segundo Brunt et al. (1999).....	64
Quadro 3. Risco de complicações metabólicas associadas à obesidade, de acordo com o perímetro da cintura, NCEP-ATPIII (2004).....	65
Quadro 4. Parâmetros de normalidades dos principais exames laboratoriais.....	67
Quadro 5. Parâmetros de normalidades dos marcadores do metabolismo ósseo.....	68

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Table 1. Clinical, Biochemical and Anthropometric Characteristics of the MHO and MUHO phenotypes.....	98
Características clínica, bioquímica e antropométrica dos fenótipos Obeso Metabolicamente Saudável e Obeso Metabolicamente Não Saudável	
Table 2. Correlation Between Bone Metabolism Variables and Anthropometric Parameters and Inflammatory Markers (HOMA-IR, Hs-CRP And Leptin) According to the MHO and MUHO Phenotypes.....	99
Correlação entre variáveis do metabolismo ósseo, parâmetros antropométricos e marcadores de inflamação (HOMA-IR, Hs-CRP e Leptina), de acordo com os fenótipos Obeso Metabolicamente Saudável e Obeso Metabolicamente Não Saudável	

Artigo 2

Table 1. Clinical, Biochemical and Anthropometric Characteristics of the MHO and MUHO phenotypes.....	108
Características clínica, bioquímica e antropométrica dos fenótipos Obeso Metabolicamente Saudável e Obeso Metabolicamente Não Saudável	
Table 2. Profile of biomarkers and micronutrients of bone metabolism according to the MHO and MUHO phenotypes.....	109
Perfil de biomarcadores e micronutrientes do metabolismo ósseo de acordo com os fenótipos Obeso Metabolicamente Saudável e Obeso Metabolicamente Não Saudável	
Table 3. Association between markers and micronutrients of bone metabolism according to the MHO and MUHO phenotypes.....	110
Associação entre marcadores e micronutrientes do metabolismo ósseo de acordo com os fenótipos Obeso Metabolicamente Saudável e Obeso Metabolicamente Não Saudável	
Table 4. Risk factors for alteration in bone metabolism according to the MHO and MUHO phenotypes.....	111
Fatores de risco para alteração do metabolismo ósseo de acordo com os fenótipos Obeso Metabolicamente Saudável e Obeso Metabolicamente Não Saudável	

Artigo 3

Table 1. Anthropometric and Biochemical Characteristics of the MHO and MUHO phenotypes.....	142
Características Antropométricas e Bioquímicas dos fenótipos OMS e OMNS	
Table 2. Mean serum concentrations of biochemical indicators of liver function and damage according to the degrees of staging of NAFLD and obesity phenotypes.....	143
Média das concentrações séricas dos indicadores bioquímicos de função e lesão hepática de acordo com graus de estadiamento da DHGNA e fenótipos da obesidade	
Table 3. Mean serum concentrations of bone metabolism biochemical markers according to the degrees of staging of NAFLD and obesity phenotypes.....	144
Média das concentrações séricas dos marcadores de metabolismo ósseo de acordo com os graus de estadiamento da DHGNA e fenótipos da obesidade	

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1.	Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP).....	181
Anexo 2.	Termo de Consentimento Livre Esclarecido.....	182
Anexo 3.	Protocolo de Coleta de Dados.....	184
Anexo 4.	Protocolo de Exposição Solar.....	186
Anexo 5.	Protocolo de Atividade Física – Protocolo de Atividade Física – <i>The International Physical Activity Questionnaire (IPAQ)</i>	187
Anexo 6.	Comprovante Artigo 1 – Aceito (Revista: Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy).....	189
Anexo 7.	Comprovante Artigo 2 – Submetido em 30/11/2018 (Revista Nutrients).....	190
Anexo 8.	Comprovante Artigo 3 – Aceito (Revista <i>Hepatic Medicine: Evidence and Research</i>).....	191

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

1,25 (OH)2D - 1,25 dihidroxivitamina D (calcitriol)

25(OH)D – 25 hidroxivitamina D (calcidiol)

ABESO – Associação Brasileira para o Estudo de Obesidade e da Síndrome Metabólica

ABSI – A body shape index

Adiponectina – Adipo

Ácidos graxos – AGs

Ácidos graxos livres – AGL

ACSM – American College of Sports Medicine

ANOVA – Análise de variância

BGYR – *Bypass* gástrico em Y de Roux

CA – Circunferência abdominal

Ca – Cálcio

CC – Circunferência da cintura

D3 – Colecalciferol

DBP – Proteína ligante da vitamina D

DHGNA – Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica

DM – Diabetes *mellitus*

DMO – Densidade mineral óssea

DP - Desvio padrão

DXA – Densitometria de energia dupla baseada em raios X

EH – Esteatose hepática

ELISA - Imunoensaio ligado a enzima

FGF – 23 Fator de crescimento de fibroblastos

GLP - 1 – *Glucagon Like Peptide*

HDL – Lipoproteína de Alta Densidade

HOMA – *Homeostatic model assentment*

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia Estatística

IMC – Índice de massa corporal

ICSI – Institute for Clinical Systems Improvement

IL-1 β – Interleucina 1 β

IL-6 – interleucina 6

IOF – International Osteoporosis Foundation

LEP- Leptina

NCEP-ATPIII – *Third Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High 3º Blood Cholesterol in Adults*

Mg – Magnésio

NHANES - *National Health and Nutrition Examination Survey*

OMS – Obesos metabolicamente saudáveis

OMNS – Obesos metabolicamente não saudáveis

P – Fósforo

PAI-1 – Inibidor do ativador do plasminogênio 1

PCR – Proteína C reativa

PTH – Paratormônio

RI – Resistência à insulina

Res – Resistina

SBCBM – Sociedade Brasileira de cirurgia bariátrica e metabólica

SM – Síndrome Metabólica

TA – Tecido adiposo

TAV – Tecido adiposo visceral

TNF α – Fator de necrose tumoral alfa

UI – Unidades internacionais

UV – Ultravioleta

VAI – Visceral Adiposity Index

VIGITEL – Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico

VD – Vitamina D

VLDL – *Very Low Density Lipoprotein (Lipoproteínas de baixa densidade)*

VDR – *Vitamin D receptor (Receptores nucleares específicos de vitamina D)*

VDRE – Fatores de transcrição heterodímeros de vitamina D

WHO – *World Health Organization*

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	21
RESUMO.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
ABSTRACT	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
1. INTRODUÇÃO	24
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	27
2.1 OBESIDADE	27
2.1.1 OBESIDADE: DEFINIÇÃO, EPIDEMIOLOGIA E ETIOLOGIA	27
2.1.2 ASPECTOS GENÉTICOS, NEUROENDÓCRINO E FISIOPATOLÓGICOS RELACIONADOS A OBESIDADE.....	28
2.1.2.1 Fatores genéticos e obesidade.....	32
2.1.2.2 FATORES NEUROENDÓCRINOS ASSOCIADOS A OBESIDADE.....	32
2.1.3 DIAGNÓSTICO, CLASSIFICAÇÃO E TRATAMENTO DA OBESIDADE.....	33
2.1.3.1 Tratamento cirúrgico para controle da obesidade.....	38
2.1.6 OS FENÓTIPOS DA OBESIDADE: OBESO METABOLICAMENTE SAUDÁVEL (OMS) E OBESO METABOLICAMENTE NÃO SAUDÁVEL (OMNS)	35
2.2 OBESIDADE, DOENÇAS ÓSSEO-METABÓLICAS E MUSCULARES NO ÂMBITO DA CIRURGIA BARIÁTRICA	37
2.3 METABOLISMO ÓSSEO E OBESIDADE.....	43
2.3.1 Tecido ósseo e aspectos fisiológicos.....	43
2.3.2 MARCADORES BIOQUÍMICOS NÃO NUTRIENTES DO METABOLISMO ÓSSEO	39
2.3.3 MICRONUTRIENTES MARCADORES BIOQUÍMICOS DO METABOLISMO ÓSSEO.....	41
2.3.4 RELAÇÃO ENTRE TECIDO ADIPOSO E METABOLISMO ÓSSEO.....	47
2.3.5 A PATOGÊNESE DAS ALTERAÇÕES ÓSSEAS NA OBESIDADE.....	48
2.4 OBESIDADE E DHGNA.....	49
2.4.1 RELAÇÃO ENTRE TECIDO ADIPOSO E PATOGÊNESE DA DHGNA	49
2.4.2 DHGNA: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, ETIOLÓGICOS E FISIOPATOLÓGICOS.....	51
2.4.2 DHGNA: DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO.....	53
2.4.2.1 DHGNA E VITAMINA D	55
2.4.2.2 O FENÓTIPO OMS E DHGNA	56
3. JUSTIFICATIVA.....	58
4. PERGUNTA DO ESTUDO E HIPÓTESES.....	59
5. OBJETIVOS	60
6. CASUÍSTICA E MÉTODOS	61

6.1 DESENHO DO ESTUDO	61
6.1.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	61
6.2 QUESTÕES ÉTICAS.....	62
6.3 COLETA DE DADOS E MÉTODOS.....	62
6.3.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA.....	62
6.3.2 AVALIAÇÃO ANTROPOMETRIA E DA PRÁTICA DE ATIVIDADE FÍSICA	65
6.3.3 AVALIAÇÃO LABORATORIAL	66
6.4 EXPOSIÇÃO SOLAR	69
6.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	69
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
7.1 ARTIGO 1.....	72
7.1.1 ABSTRACT.....	73
7.1.2 INTRODUCTION.....	74
7.1.3 MATERIAL AND METHODS	75
7.1.3.1 STUDY DESIGN AND POPULATION.....	75
7.1.3.2 DEFINITION OF THE OBESITY PHENOTYPES: MHO AND MUHO	75
7.1.3.3 ASSESSMENT OF BODY VARIABLES AND PHYSICAL ACTIVITY	76
7.1.3.4 CLINICAL ASSESSMENTS	76
7.1.3.5 EVALUATION OF CIRCULATING BIOCHEMICAL AND METABOLIC PARAMETERS.....	77
7.1.3.6 STATISTICAL ANALYSES	78
7.1.4 RESULTS.....	78
7.1.4.1 GENERAL CHARACTERIZATION OF THE STUDIED POPULATION	78
7.1.4.2 CHARACTERIZATION OF THE POPULATION ACCORDING TO THE OBESITY PHENOTYPES: MHO AND MUHO	79
7.1.4.3 CLINICAL, BIOCHEMICAL AND ANTHROPOMETRIC VARIABLES ACCORDING TO THE MHO AND MUHO PHENOTYPES.....	79
7.1.4.4 CORRELATION BETWEEN BONE METABOLISM MARKERS AND ANTHROPOMETRIC PARAMETERS (BMI AND VAI) AND INFLAMMATORY MARKERS ACCORDING TO THE MHO AND MUHO PHENOTYPES	80
7.1.5 DISCUSSION	80
7.1.5.1 GENERAL CHARACTERIZATION OF THE POPULATION, ACCORDING TO THE MHO AND MUHO PHENOTYPES	81
7.1.5.2 CLINICAL, BIOCHEMICAL AND ANTHROPOMETRIC PARAMETERS ACCORDING TO THE OBESITY PHENOTYPES: MHO AND MUHO	82

7.1.5.3 CORRELATION BETWEEN BONE METABOLISM MARKERS AND ANTHROPOMETRIC PARAMETERS (BMI AND VAI) AND INFLAMMATORY MARKERS ACCORDING TO THE MHO AND MUHO PHENOTYPES	83
7.1.6 CONCLUSION	86
ACKNOWLEDGMENTS.....	86
DISCLOSURE	87
7.1.7 REFERENCES	87
7.2 ARTIGO 2.....	100
7.2.1 ABSTRACT.....	110
7.2.2 INTRODUCTION.....	102
7.2.3 MATERIALS AND METHODS.....	103
7.2.3.1 PARTICIPANTS	103
7.2.3.2 STUDY DESIGN	103
7.2.3.3 MEASUREMENTS.....	104
7.2.3.4. STATISTICAL ANALYSIS.....	105
7.2.4 RESULTS.....	106
7.2.4.1 GENERAL CHARACTERIZATION OF THE STUDIED POPULATION	106
7.2.4.2. CHARACTERIZATION OF THE POPULATION ACCORDING TO THE MHO AND MUHO PHENOTYPES	107
7.2.4.3. ASSOCIATION AND ODDS RATIO (OR) OF THE MARKERS OF BONE METABOLISM, ACCORDING TO THE MHO AND MUHO PHENOTYPES	109
7.2.5 DISCUSSION.....	111
7.2.5.1. GENERAL CHARACTERIZATION OF THE POPULATION, ACCORDING TO THE MHO AND MUHO PHENOTYPES	112
7.2.5.2 CHARACTERIZATION OF BIOCHEMICAL MARKERS OF BONE METABOLISM, ACCORDING TO THE MHO AND MUHO PHENOTYPES	113
7.2.5.3. ASSOCIATION AND ODDS RATIO OF MARKERS AND MICRONUTRIENTS OF BONE METABOLISM, ACCORDING TO THE MHO AND MUHO PHENOTYPES	113
7.2.6 CONCLUSIONS.....	115
7.2.7 PATENTS.....	115
7.2.8 REFERENCES	115

7.3 ARTIGO 3.....	122
7.3.1 ABSTRACT:.....	122
7.3.2 INTRODUCTION.....	122
7.3.3 MATERIAL AND METHODS	123
7.3.3.1 STUDY DESIGN AND POPULATION	124
7.3.3.2 DEFINITION OF THE OBESITY PHENOTYPES: MHO AND MUHO	124
7.3.3.3 ASSESSMENT OF BODY VARIABLES.....	125
7.3.3.4 CLINICAL ASSESSMENTS	125
7.3.3.5 EVALUATION OF CIRCULATING BIOCHEMICAL PARAMETERS.....	137
7.3.3.6 DIAGNOSIS OF NAFLD – LIVER BIOPSY.....	127
7.3.3.7 STATISTICAL ANALYSES	128
7.3.4 RESULTS.....	128
7.3.4.1 GENERAL CHARACTERIZATION OF THE STUDIED POPULATION	128
7.3.4.2 CHARACTERIZATION OF THE POPULATION ACCORDING TO THE MHO AND MUHO PHENOTYPES	129
7.3.4.3 BIOCHEMICAL INDICATORS OF LIVER FUNCTION AND DAMAGE ACCORDING TO THE DEGREES OF STAGING OF NAFLD AND THE OBESITY PHENOTYPES	129
7.3.4.4. BONE METABOLISM BIOCHEMICAL MARKERS ACCORDING TO THE DEGREES OF STAGING OF NAFLD AND THE OBESITY PHENOTYPES	130
7.3.5 DISCUSSION.....	130
7.3.5.1 GENERAL CHARACTERIZATION OF THE STUDIED POPULATION	131
7.3.5.2 CHARACTERIZATION OF THE POPULATION ACCORDING TO THE MHO AND MUHO PHENOTYPES	131
7.3.5.3 BIOCHEMICAL INDICATORS OF LIVER FUNCTION AND DAMAGE ACCORDING TO THE DEGREES OF STAGING OF NAFLD ACCORDING THE OBESITY PHENOTYPES	132
7.3.5.4 BIOCHEMICAL MARKERS OF BONE METABOLISM ACCORDING TO THE DEGREES OF STAGING OF NAFLD AND THE OBESITY PHENOTYPES	145
7.3.6 CONCLUSION	134
ABBREVIATIONS	134
ACKNOWLEDGMENTS	134
DISCLOSURE	135
7.3.7 REFERENCES.....	147
8. CONCLUSÃO	145
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS	146
10. REFERÊNCIAS	147
ANEXOS	180

APRESENTAÇÃO

Esta tese é um recorte do estudo mais amplo intitulado “*Avaliação do estado nutricional de micronutrientes em indivíduos com obesidade grave submetidos à Gastroplastia Redutora em Y de Roux*”, sob a responsabilidade do Núcleo de Pesquisa em Micronutrientes - NPqM, do Instituto de Nutrição Josué de Castro - INJC da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ. O desenvolvimento deste projeto contou com a parceria do Centro Multidisciplinar de Cirurgia Bariátrica e Metabólica, localizado no município do Rio de Janeiro – RJ.

Nosso estudo aborda a associação entre um conjunto de marcadores do metabolismo ósseo com alterações bioquímicas, clínicas, antropométricas e prova de função e lesão hepática, segundo diferentes graus de estadiamento da Doença Hepática Gordurosa Não Alcóolica, em adultos com obesidade classe III, classificados como metabolicamente saudáveis e não saudáveis. Foram avaliados 232 pacientes com diagnóstico de Obesidade grave (Classe III) e comorbidades variadas. Desses, 223 indivíduos foram elegíveis para esse estudo, por atenderem os critérios de inclusão do trabalho. O período de coleta do estudo, ocorreu de novembro de 2014 a julho de 2016, no Centro Multidisciplinar de Cirurgia Bariátrica e Metabólica.

Este documento está estruturado nas seguintes seções: *introdução*, na qual é realizada abordagem geral sobre a temática que envolve esta tese; *referencial teórico*, no qual é traçada uma estruturação conceitual sobre os principais pilares da tese para o entendimento do estudo; *justificativa*; *hipóteses*; *objetivos*; *métodos*; *resultados*; *conclusões*, *considerações finais*; *referências bibliográficas*, *apêndices* e *anexos*.

A seção de resultados/discussão é composta por três manuscritos científicos. O primeiro artigo foi submetido na revista *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* e intitulado ‘*Clinic, Anthropometric and Metabolic Changes in Adults With Class III Obesity Classified as Metabolically Healthy and Metabolically Unhealthy*’. O segundo artigo foi submetido na revista *Nutrients* e intitula-se ‘*Does the Metabolically Healthy Obese Phenotype protect adults with class III obesity from biochemical alterations related to bone metabolism?*’. O terceiro manuscrito foi submetido a revista *Hepatic Medicine: Evidence and Research* e intitulado *Relationship between the biomarkers of bone metabolism and hepatic enzymes according to the stage of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and the Metabolically Healthy Obesity Phenotype*.

A seção conclusão e *considerações finais* é fundamentada nos principais resultados dos três manuscritos realizados. As referências da tese obedecem a norma NB-66 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), enquanto as referências dos artigos atendem aos requisitos técnicos das revistas.

Resumo da tese apresentada ao PPGN/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de **Doutor em Ciências Nutricionais**.

**MARCADORES DO METABOLISMO ÓSSEO E SUA RELAÇÃO COM A DOENÇA
HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOOLICA EM INDIVÍDUOS COM OBESIDADE
CLASSE III CLASSIFICADOS SEGUNDO O FENÓTIPO METABOLICAMENTE
SAUDÁVEL**

LOUREIRO, Ligiane Marques. Rio de Janeiro, 2019. Tese (Doutorado em Ciências da Nutrição) – Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Orientadora: Andréa Ramalho

Introdução: A obesidade altera os marcadores do metabolismo ósseo e hepático, segundo diferentes graus de estadiamento da Doença Hepática Gordurosa Não Alcólica. A hipótese de que o fenótipo da obesidade metabolicamente saudável, possa proteger os indivíduos das referidas alterações, motivou esse estudo. **Objetivo:** avaliar os marcadores de metabolismo ósseo e enzimas hepáticas de acordo com a DHGNA, segundo os fenótipos OMS e OMNS. **Métodos:** Estudo transversal, incluindo adultos com obesidade classe III. Para classificação dos fenótipos OMS e OMNS, o critério proposto foi o *Third Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults*. Variáveis antropométricas, Índice de adiposidade visceral (*Visceral Adiposity Index - VAI*), bioquímicas, incluindo as enzimas hepáticas e clínicas (pressão arterial sistêmica e diagnóstico da DHGNA) foram analisadas no estudo. HOMA-IR (*homeostatic model assessment insulin resistance*) foi calculado para determinar resistência a insulina. Para avaliar o metabolismo ósseo, foram analisados [fosfatase alcalina (FA) e paratormônio (PTH)] e nutrientes relacionados (vitamina D, cálcio, fósforo, magnésio, potássio, zinco e vitamina B12). O diagnóstico e estadiamento da DHGNA foi determinada por ultrassonografia de abdômen total e biópsia hepática respectivamente. As variáveis contínuas, foram expressas em média e desvio-padrão. Variáveis categóricas comparadas utilizando o teste Qui-quadrado de Pearson. Variáveis contínuas usando o teste *t Student*. Foram realizadas análises de variância de dois fatores (Two-way ANOVA), posteriormente Teste de Tukey para verificar a diferença entre os grupos. E análise de regressão logística múltipla para determinar a razão de chance de marcadores de metabolismo ósseo alterados pelos fenótipos. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando *Statistical Package for the Social Sciences* para Windows versão 21,0. O nível de significância foi de 5%. **Resultados:** 223 adultos com obesidade classe III, com idade de $41,20 \pm 10,15$ anos, sendo 32,73% OMS foi a amostra total. HOMA-IR foi maior no OMNS ($p = 0,003$). No grupo OMS, as variáveis antropométricas foram correlacionadas com os marcadores ósseos (IMC vs. Fósforo: $r = 0,31$, $p < 0,001$; IMC vs. 25 (OH) D: $r = -0,31$, $p = 0,041$). Correlações negativas foram observadas no grupo OMS (Cálcio vs. PCR: $r = -0,30$, $p = 0,017$; PTH vs. HOMA-IR: $r = -0,28$, $p = 0,017$) com significância. Após regressão logística, inadequações de cálcio (OR: 4.11; IC95%: 2.33 – 6.66), fósforo (OR: 3.03; IC95%: 1.98 – 5.79), vitamina D (OR: 5.01; IC 95% : 2.92 - 6.71) e PTH (OR: 5.45; 95% CI: 4.49 - 6.74) foram significativamente maiores no grupo OMNS em comparação ao grupo OMS. Uma subamostra, 50 indivíduos com DHGNA foram avaliados, 65% ($n=31$) com esteatose e 38% ($n=19$) com esteato-hepatite sem fibrose; 36% OMS e 64% OMNS respectivamente. Valores médios de FA, 85.44 ± 27.27 vs. 61.92 ± 17.57 ($p=0.006$); gama-glutamil transferase peptidase, 25.77 ± 15.36 vs. 30.63 ± 19.49 ($p=0.025$) e albumina 4.24 ± 0.23 vs. 3.99 ± 0.34 ($p=0.037$) foram significativamente menores nos OMS com esteatose. **Conclusões:** O fenótipo OMS não protege os adultos de alterações no metabolismo ósseo e hepático. Porém, o OMNS apresentou maior risco de alterações relacionadas ao metabolismo ósseo. E o OMS com esteatose apresentou alterações de menor gravidade que aquelas observadas nos OMNS, em relação aos marcadores estudados ósseos e hepáticos estudados.

Palavras chave: obesidade, fenótipo metabolicamente saudável, metabolismo ósseo e doença hepática gordurosa não alcoólica

MARKERS OF BONE METABOLISM AND ITS RELATIONSHIP TO NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE IN INDIVIDUALS WITH CLASS III OBESITY CLASSIFIED BY THE METABOLICALLY HEALTHY PHENOTYPE

LOUREIRO, Ligiane Marques. Thesis (PhD degree in Nutritional Sciences) – Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Advisor: Andréa Ramalho

Background: Obesity negatively affects the relationship between markers of bone and hepatic metabolism, according to different degrees of Staging of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. The hypothesis that the metabolically healthy obesity phenotype, when present, could protect individuals from the described changes, was the aim of this study. **Objective:** To evaluate the association between markers of bone and hepatic metabolism with the staging of NAFLD according to the MHO and MUHO phenotypes. **Methods:** A cross-sectional study was carried out in adults with class III obesity. To classify the Metabolically Healthy Obese (MHO) and Metabolically Unhealthy Obese (MUHO), the Third Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults criteria was proposed. Anthropometric parameters, Visceral Adiposity Index (VAI), biochemical, including the liver enzymes and clinical variables (blood pressure and diagnosis of NAFLD) were analyzed in the study. HOMA-IR (homeostatic model assessment insulin resistance) was calculated to determine insulin resistance. To evaluate bone metabolism, markers (alkaline phosphatase (AP) and parathormone (PTH) and related nutrients (vitamin D, calcium, phosphorus, magnesium, potassium, zinc and vitamin B12) were analyzed. The diagnosis and staging of NAFLD was determined by total abdomen ultrasonography and biopsy respectively. Continuous variables were expressed as mean and standard deviation. Categorical variables were compared using Pearson's Chi-square test. Continuous Variables according to the MHO and MUHO phenotypes were compared using Student's t-test. Two-way ANOVA analyzes were performed and the Tukey test, to verify the difference between the groups. Multiple logistic regression analysis was performed to determine the odds ratio (odds ratio) of markers of bone metabolism altered by phenotypes. All statistical analyzes were performed using Statistical Package for Social Sciences for Windows version 21.0. The level of significance was set at 5%. **Results:** A total sample was comprised of 223 adults with class III obesity aged 41.20 ± 10.15 years, 32,73% OMS. The HOMA-IR showed elevation in the MUHO group ($p = 0.003$). In the MUHO group, the anthropometric variables were correlated with the bone markers (BMI vs Phosphorus: $r = 0.31$, $p < 0.001$; BMI vs 25(OH)D: $r = -0.31$, $p = 0.041$). The visceral adiposity index was lower in MHO ($p = 0.001$). Negative correlations between inflammatory markers and bone markers were observed in the MHO group (Calcium vs. hs-CRP: -0.30 , $p = 0.017$; parathyroid hormone vs. HOMA-IR: $r = -0.28$, $p = 0.017$). After logistic regression, it was observed that inadequacies of calcium (OR: 4.11; 95% CI: 2.33 – 6.66), phosphorus (OR: 3.03; 95% CI: 1.98 - 5.79), vitamin D (OR: 5.01; 95% CI: 2.92 - 6.71) and PTH (OR: 5.45; 95% CI: 4.49 - 6.74) were significantly higher in the MUHO group compared to the MHO Group. A sub-sample was analyzed, 50 subjects with NAFLD, 65% ($n = 31$) with steatosis and 38% ($n = 19$) with steatohepatitis without fibrosis; 36% MHO and 64% MUHO respectively. Mean values of AP, 85.44 ± 27.27 vs. 61.92 ± 17.57 ($p = 0.006$); gamma-glutamyl transferase peptidase, 25.77 ± 15.36 Vs. 30.63 ± 19.49 ($p = 0.025$) and albumin 4.24 ± 0.23 vs. 3.99 ± 0.34 ($p = 0.037$) were significantly lower in MHO with steatosis. **Conclusion:** The MHO phenotype does not protect adults from alterations in markers of bone and hepatic metabolism. However, the MUHO phenotype presents a higher risk for alterations related to bone metabolism. Individuals with MHO phenotype with steatosis presented lower severity changes than those observed in the MUHO in relation to markers of bone and hepatic metabolism.

Keywords: obesity, metabolically healthy phenotype, bone metabolism, non-alcoholic fatty liver disease;

1. INTRODUÇÃO

Uma epidemia global crescente de sobrepeso e obesidade - "globesity" – pode ser observada em muitas partes do mundo e discute-se que se medidas de intervenção não forem adotadas, milhões de pessoas sofrerão de uma série de graves distúrbios de saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2019). A prevalência de obesidade em adultos em nível mundial no ano de 2014 foi de 13% (WHO, 2016). No que se refere à obesidade grave também conhecida como obesidade classe III, os ciclos da *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) evidenciaram aumento progressivo dessa subcategoria (SKELTON *et al.*, 2009). No ano de 2014, cerca de 2,2 milhões de homens apresentavam obesidade classe III, e entre a população do sexo feminino esse número chegou a 6,7 milhões (NCD, 2016). Para ambos, a obesidade representa grande risco para instalação e agravamento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), em especial aquelas relacionadas à dieta inadequada e à transtornos alimentares comportamentais (Da LUZ *et al.*, 2018); incluindo diabetes mellitus (BOLES *et al.*, 2017), doenças cardiovasculares (SOROP *et al.*, 2017), hipertensão arterial sistêmica (SERAVALLE & GRASSI, 2017), doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (DIVELLA *et al.*, 2019; POLYZOS *et al.*, 2017), acidente vascular cerebral (BAUMGARTNER *et al.*, 2016) e certas formas de câncer (DIVELLA *et al.*, 2019; SCHENK *et al.*, 2019; RAY *et al.*, 2018). Suas consequências para a saúde vão desde o aumento do risco de morte prematura (DIXIT, 2008) até condições crônicas graves que reduzem a qualidade de vida geral (NOKOFF *et al.*, 2019; MIL *et al.*, 2019; KIM *et al.*, 2017; TRONIERI *et al.*, 2017).

A obesidade é uma realidade para 18,9% dos brasileiros, enquanto que o sobrepeso atinge mais da metade da população (54%). O Brasil, seguindo à tendência mundial, nos últimos dez anos (2007-2017) registrou um crescimento de 56% no excesso de peso e 60% na prevalência de obesidade (BRASIL, 2018). O país já ocupa o segundo lugar entre os países do mundo, em número de cirurgias bariátricas realizadas, o que indica e confirma esse aumento progressivo da doença (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIRURGIA BARIÁTRICA E METABÓLICA – SBCBM, 2016).

A obesidade, por ser uma desordem metabólica de etiologia complexa é acompanhada de grandes modificações sistêmicas, caracterizada por um estado de inflamação crônica de baixo grau, que promove ativação do sistema imune (ENGIN *et al.*, 2017; HOTAMISLIGIL, 2006) e uma série de complicações clínicas e metabólicas (PATEL *et al.*, 2013) responsáveis pelo aparecimento de outras doenças. Dentre as quais, nos últimos anos, de forma cada vez mais frequentes, têm se destacado as doenças ósseo-metabólicas e osteomusculares, causadas

principalmente pela alteração de alguns marcadores (principalmente bioquímicos, incluindo aqueles considerados como micronutrientes) relacionados ao metabolismo ósseo (HOLICK; HOSSEIN-NEZHAD, 2013); seguida da maior ocorrência de DHGNA, um espectro, que engloba desde a esteatose hepática até esteato-hepatite não alcoólica, que é comumente considerada a forma mais avançada da doença, onde a esteatose coexiste com lesão hepatocelular e inflamação, precipitando a necrose hepática, fibrose e cirrose, além de aumentar de forma significativa o risco de carcinoma hepatocelular (CHALASANI *et al.*, 2012).

Os indivíduos com obesidade classe III possuem, na maior parte dos casos, indicação da cirurgia bariátrica e são mais propensos a complicações metabólicas incluindo aquelas relacionadas ao metabolismo ósseo (SHAPSES *et al.*, 2017; VASCONCELOS; RENATA, 2010). Essas alterações são capazes de impactar diretamente ou não outros órgãos, como é o caso, do próprio fígado (CIMINI *et al.*, 2017; POGGIOGALLE *et al.*, 2017). Por esse motivo, ainda no pré-operatório, é rotina avaliar diferentes biomarcadores que estejam envolvidos na homeostase do metabolismo ósseo e hepático, de modo a subsidiar medidas estratégicas que possam evitar ou minimizar maiores complicações no pós-operatório.

Existem diversos fatores presentes nos indivíduos com obesidade classe III que influenciam diretamente no processo de reabsorção óssea. A deficiência crônica de vitamina D, a ingestão inadequada de cálcio e o hiperparatiroidismo secundário têm sido apontados como os mais recorrentes (CABRAL *et al.*, 2016; YU, 2014; STEIN *et al.*, 2013; COMPHER *et al.*, 2008). Outras deficiências de micronutrientes (vitamina B12, ácido fólico, vitamina A, tiamina, riboflavina, niacina, vitamina B6, zinco, fósforo, magnésio e ferro) também possuem papel relevante no metabolismo ósseo e podem estar alterados em indivíduos com obesidade classe III (VIA & MECHANICK, 2017; FAÉ *et al.*, 2015; LO MENZO *et al.*, 2014; MILLER *et al.*, 2014; TOREZAN, 2013; BORDALO *et al.*, 2011).

O paratormônio (PTH), a leptina e a proteína C- reativa (PCR) que se encontram alterados na obesidade, também interferem na homeostase óssea. Estudos sugerem que esses marcadores quando alterados devido ao perfil inflamatório da obesidade, tenham papel importante no metabolismo ósseo e consequentemente, interferindo através de alguns mecanismos no metabolismo do hepático também (MANOY *et al.*, 2017; CHEN & YANG, 2015).

Quanto à DHGNA, a real incidência também não está totalmente elucidada, entretanto, é sugerido que a doença afete cerca de 6 a 45% da população mundial, sendo maior (90%) em indivíduos com obesidade grave (FAZEL *et al.*, 2016; OKUR & KARACAER, 2016; PAPPACHAN *et al.*, 2014). Apesar de algumas evidências indicarem que exista uma forte

associação entre alguns importantes marcadores do metabolismo ósseo e a progressão da DHGNA em adultos com obesidade classe III (TOVO *et al.*, 2017; TARGHER *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2012). É sabido que existe um *cross talk* entre tecido adiposo, ósseo e hepático, quando essa relação se encontra desequilibrada, como parece acontecer no caso da obesidade, as consequências deletérias geradas a saúde desses indivíduos ainda precisar ser melhor esclarecida.

Somado a esses fatos, o paradoxo da obesidade, conhecido como o fenótipo metabolicamente saudável (MS), classificado a partir de alguns critérios, dentre esses, o da *Third Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High 3º Blood Cholesterol in Adults* (NCEP-ATPIII) (BLÜHER & SCHWARZ, 2014; PRINCE *et al.*, 2014) sugere que, mesmo a obesidade sendo fator de risco para uma série de complicações metabólicas, os indivíduos quando classificados como “obesos metabolicamente saudáveis – OMS” diferentemente àqueles, “obesos metabolicamente não saudáveis – OMNS”, parecem estar mais protegidos de complicações relacionadas à gravidade da DHGNA, da resistência à insulina (RI), de alterações no perfil lipídico e marcadores de inflamação (HASHIMOTO *et al.*, 2017; MIN-KYUNG, 2015).

Contudo, apesar de alguns estudos, envolvendo pacientes com DHGNA e o fenótipo OMS (ABENAVOLI *et al.*, 2016; CHANG *et al.*, 2016) já terem sido realizados, poucos ensaios investigaram a influência desse fenótipo sobre o estadiamento da doença (HUH *et al.*, 2017).

Considerando o volume de evidências ainda limitadas no que diz respeito a investigação da relação: fenótipo OMS e metabolismo ósseo e, especificamente entre os biomarcadores ósseos e alterações hepáticas na obesidade classe III com fenótipo OMS. O objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar entre adultos com obesidade classe III, classificados como OMS e OMNS, as alterações séricas de um conjunto de marcadores do metabolismo ósseo, associando-os com variáveis clínicas, metabólicas, antropométricas, indicadores de função e lesão hepática, considerando ainda o grau de estadiamento da DHGNA dos indivíduos investigados.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Obesidade

2.1.1 Obesidade: definição, epidemiologia e etiologia

A obesidade é definida pelo acúmulo excessivo ou disfuncional de gordura corporal que pode prejudicar a saúde do indivíduo, sendo consequência do desequilíbrio existente entre a ingestão alimentar e o gasto energético (WHO, 2015).

Segundo a *World Health Organization (2016)*, a prevalência mundial da doença entre adultos em 2014 foi de 13%, sendo maior em mulheres 15% do que nos homens 11% (WHO, 2016). A incidência da obesidade aumentou de maneira preocupante, atingindo aproximadamente 266 milhões de homens e mulheres em todo o mundo nas últimas décadas (NDC, 2016). Por esse motivo, e por se associar a importantes comorbidades, a obesidade tem sido considerada uma epidemia global, representando ônus nos gastos com saúde pública em todos os países, sejam eles desenvolvidos ou em desenvolvimento, como é o caso do Brasil (OLIVEIRA, 2013).

A obesidade é uma condição complexa, com sérias dimensões sociais e psicológicas, que afeta praticamente todos os grupos etários e socioeconômicos. Em 1995, havia cerca de 200 milhões de adultos com obesidade em todo o mundo e outros 18 milhões de crianças com menos de cinco anos classificadas como obesas. A partir de 2000, o número de adultos com obesidade aumentou para mais de 300 milhões. A epidemia da obesidade não se restringe às sociedades industrializadas; nos países em desenvolvimento, estima-se que mais de 115 milhões de pessoas sofrem de problemas relacionados à obesidade (WHO, 2019).

De acordo com IASO (2010) mais de um bilhão de adultos estão acima do peso ideal, dentre eles, 475 milhões são considerados obesos. No que se refere à obesidade grave, os ciclos da NHANES evidenciaram aumento progressivo dessa subcategoria, aumentando de 0,8% para 3,8% nas últimas décadas (SKELTON *et al.*, 2009).

Em estudo realizado pela “*Mckinsey Global Institute*” (DOBBS *et al.*, 2014), estimou-se que a obesidade provoca despesas anuais da ordem de R\$ 5,2 trilhões em todo o mundo, e, no Brasil, os custos anuais foram de R\$ 3,57 bilhões, chegando a uma soma de custos econômicos relacionados à obesidade em torno de 2,4% do Produto Interno Bruto brasileiro.

O Brasil, acompanhando à tendência mundial, também tem registrado aumento no número dos casos de obesidade (IBGE, 2010). Após 36 anos, foi constatado pela Pesquisa de Orçamento Familiares (POF) de 2008-2009, que a obesidade cresceu mais de quatro vezes entre

os homens, de 2,8% para 12,5%, e mais de duas vezes entre as mulheres, de 8% para 16,9%. Nos últimos dez anos, teve um crescimento de 26,3% no excesso de peso e 60% na prevalência de obesidade. Cerca de 18,9% dos brasileiros estão obesos, com frequência semelhante entre homens 18,1% e mulheres 19,6% (BRASIL, 2017). De forma geral, o excesso de peso e a obesidade estão mais relacionados ao risco de morte global do que o baixo peso (WHO, 2015).

O Brasil atualmente é o quinto país em número de obesos no mundo, o quadro é visto como extremamente sério, sendo necessárias medidas de prevenção e controle (WHO, 2016). Em 2014, dados do estudo de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL) demonstraram que dentre os 27 estados brasileiros, o estado do Rio de Janeiro, ocupando a 8º posição, foi um dos que apresentou maior frequência de obesidade, 19% entre adultos (BRASIL, 2015). Em 2016, o estado esteve na 6º posição quando considerado a frequência de sobrepeso, 55,8% na população em geral (BRASIL, 2017).

O aumento significativo da prevalência dessa doença é resultado principalmente de mudanças no estilo de vida, com maior ingestão de alimentos refinados, gorduras saturadas, açúcares e outros, somado ao menor gasto energético pela atividade física, (WHO, 2016; JENSEN *et al.*, 2014; INSTITUTE FOR CLINICAL SYSTEMS IMPROVEMENT – ICSI, 2013; HERRERA & LINDGREN, 2010; MARTI *et al.*, 2008). Todos esses fatores, favorecem o ganho de peso excessivo e está intimamente relacionado com maior risco de desenvolver a obesidade e comorbidades (BRASIL, 2017; CERCATO *et al.*, 2008).

A etiologia complexa e multifatorial da obesidade resulta da alteração e/ou associação de múltiplos fatores: genéticos, endócrino-metabólicos, psicológicos, ambientais (BERTHOUD & KLEIN., 2017; SHEIKH *et al.*, 2017; ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DE OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA - ABESO, 2016; AMYOT *et al.*, 2012; HERRERA & LINDGREN 2010; WHO, 2003) e mais recentemente relacionados à composição e função da microbiota intestinal (LIJUAN SUN *et al.*, 2018; HALL *et al.*, 2017; SCHEITHAUER *et al.*, 2016; ESSER *et al.*, 2014) e sua relação com a produção de alguns sais biliares (LIU *et al.*, 2017).

2.1.2 Aspectos genéticos, neuroendócrinos e fisiopatológicos relacionados a obesidade

2.1.2.1 Fatores genéticos e obesidade

Vários genes susceptíveis à doença têm sido identificados, porém um número limitado desses genes tem apresentado uma interação com componentes ambientais capazes de alterar

vias metabólicas relacionadas ao balanço energético (TORKAMANI & TOPOL, 2019; HINNEY & GIURANNA, 2017; PIGEYRE *et al.*, 2016).

Em âmbito mundial o que se tem observado é que a obesidade monogênica, que é resultado da mutação ou deficiência de um único gene corresponde a 5% dos casos de obesidade, no qual 11 genes estão relacionados (KOIKE *et al.*, 2018 ; RIVERA *et al.*, 2017; SHEIKH *et al.*, 2017; PIGEYRE *et al.*, 2016; HINEY *et al.*, 2010). E quando considerada a obesidade classe III essa ocorrência é menor que 5% e ainda sim, sendo muito heterogênea entre si (CAMPBELL, 2017). Já em relação a obesidade poligênica, que ocorre devido a presença simultânea de variação de DNA em múltiplos genes (HOSNEY *et al.*, 2017; OYEYEMI *et al.*, 2017; REDDON *et al.*, 2016; REES *et al.*, 2012; VOGEL *et al.*, 2011), aproximadamente 227 variantes genéticas envolvidas em diferentes vias biológicas (sistema nervoso central, detecção e digestão de alimentos, diferenciação de adipócitos, sinalização de insulina, metabolismo lipídico, biologia muscular e hepática, além da microbiota intestinal) já foram identificadas e ainda se encontram em plena expansão (TORKAMANI & TOPOL, 2019; LIJUAN SUN *et al.*, 2018; HINNEY & GIURANNA, 2017; LESLEY & CAMPBELL, 2017; SHEIKH *et al.*, 2017; PIGEYRE *et al.*, 2016).

2.1.2.2 Fatores neuroendócrinos associados a obesidade

A obesidade é um distúrbio complexo causado por vários fatores de risco genéticos e não genéticos como já discutido, contudo, nos últimos anos, ficou claro que os fatores externos, são os mais relevantes em sua incidência. Nesse sentido, os fatores neuroendócrinos se destacam, pois por meio de diversas vias metabólicas o nosso organismo é capaz de manter-se em balanço energético regular (LEITE *et al.*, 2014; SERPA NETO *et al.*, 2007; HILTON & LOUCKS, 2000).

Vários sinais ocorrem em função da interação com neurônios do núcleo arqueado no terceiro ventrículo hipotalâmico, como resultado funcional dos hormônios reguladores da fome no hipotálamo. Leptina e insulina estimulam a síntese de pró-opiomelanocortina (POMC) em determinados neurônios. Ocorre então clivagem desta proteína, pela proconvertase 1 (PC1), em hormônio estimulante de melanócito (α -MSH) que, através dos receptores de melacortina 4 e 3 (MC4R e MC3R), suprimem os neurônios orexigênicos e estimulam os anorexigênicos. Por diversas vias, envolvendo ácido gama-aminobutírico (GABA), MC3R e Y1R, os neurônios NPY (neuropeptídeo Y) / AGRP (proteína relacionada ao agouti) e α -MSH / CART (o fator de transcrição cocaína-anfetamina dependente) sofrem auto-regulação.

E a partir daí, há o aumento do processo de termogênese e estímulo a saciedade em períodos de muita oferta energética (LV *et al.*, 2018; CUI *et al.*, 2017). Além disso, os fatores neuroendócrinos são capazes também, de promover o inverso, estimulando a sensação de fome e inibindo a termogênese em momentos de privação do organismo (DONATO JÚNIOR *et al.*, 2004). Dentre esses mediadores, os que se destacam são os hormônios insulina (ANTHONY *et al.*, 2006), grelina (HOWICH *et al.*, 2017; PERELLO *et al.*, 2012), e leptina (THON *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2010).

A leptina age diretamente no sistema neuroendócrino, atuando como um adipostato, que tem a capacidade de reduzir a secreção e melhorar a resistência à insulina, e inibir a lipogênese, contudo nos obesos esse processo homeostase corporal não acontece dessa forma. Devido o aumento da massa gorda, deveria ocorrer maior síntese de leptina e consequente inibição da fome, somado ao estímulo ao gasto energético (GONG *et al.*, 2018). E na perda de peso, os níveis séricos de leptina cairiam e os de grelina aumentariam, estimulando assim, a fome e inibindo a perda de energia através da termogênese (LV *et al.*, 2018; CUI *et al.*, 2017).

Nos indivíduos com obesidade, entre outros fatores, a presença de um quadro de resistência hipotalâmica à ação da insulina e leptina leva ao aumento das concentrações de leptina e diminuição de grelina, comprometendo a homeostase corporal e levando a inflamação crônica de baixo grau (LOPEZ-JARAMILLO *et al.*, 2014), Figura 1.



Figura 1. Homeostase do peso corporal.

Fonte: NETO *et al.*, 2007. Adaptado por Loureiro, (2019).

2.1.2.3 Fisiopatologia de obesidade associada a ocorrência de comorbidades

A obesidade, por ser uma desordem metabólica, caracterizada pelo acúmulo de tecido adiposo (TA) é acompanhada de grandes modificações sistêmicas em decorrência entre vários fatores, da hipertrofia ou hiperplasia dos adipócitos (WHO, 2011) o que leva a inflamação crônica subclínica de baixo grau (HOTAMISLIGIL, 2006).

Nos indivíduos com obesidade quando comparados aos eutróficos, vários mecanismos são acionados, responsáveis pelo aumento das concentrações de adipocinas pró-inflamatórias (fator de necrose tumoral alfa – TNF- α , interleucina 1 β - IL-1 β , interleucina 6 - IL-6, inibidor do ativador do plasminogênio 1 - PAI-1, proteína C reativa – PCR, resistina – Res, e, leptina - Lep), e redução das adipocinas anti-inflamatórias (adiponectina - Adipo) (HURSTIN & HURSTIN, 2012). Cada um desses mecanismos, levam a desfechos desfavoráveis, que culminam na maior ocorrência de vários distúrbios metabólicos, conforme pode ser observado na Figura 2.

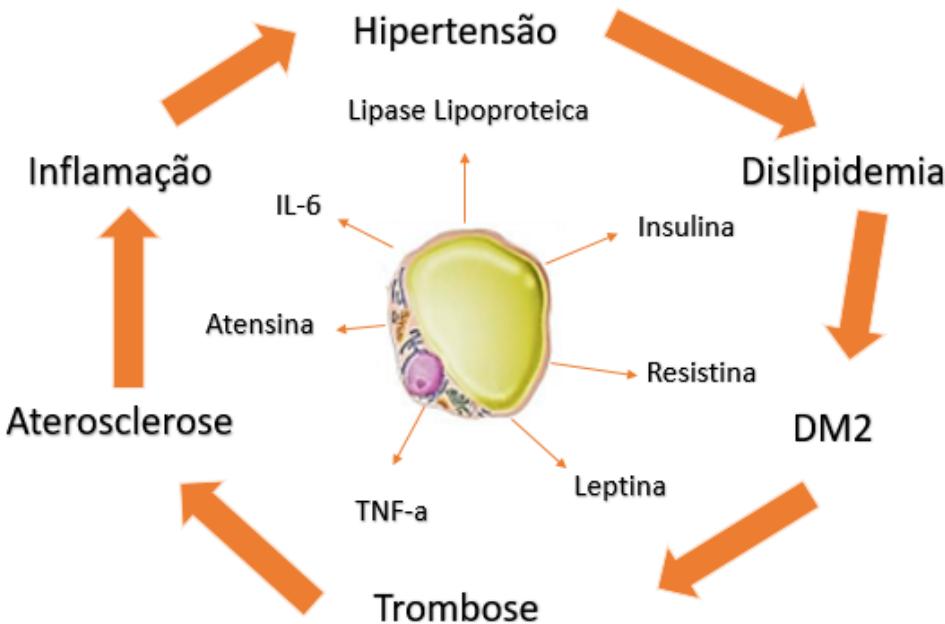


Figura 2. Mecanismos fisiopatológicos da obesidade e comorbidades.

Fonte: BIAGINONI, 2015. Adaptado por Loureiro, (2019).

Devido aos altos níveis séricos de leptina, relacionados a resistência hipotalâmica os indivíduos com obesidade não apresentam respostas esperadas ao estímulo por este hormônio (BELGARDT *et al.*, 2009; VELOSO, 2006) e que quando associados a problemas no transporte da insulina (ANTHONY *et al.*, 2006), estimulam maior liberação de marcadores inflamatórios (THON *et al.*, 2016).

A inflamação de baixo grau presente na obesidade e induzida por dieta hiperlipídica, pelas citocinas como TNF- α , IL-6 e IL-1 β , também promove sua síntese (PHILIPS & PRINS, 2008). Outros marcadores inflamatórios presentes, como a JNK e NF- $\kappa\beta$ fosforilam em serina diversos mediadores e, além de potencializar a resistência à leptina, também induzem esse quadro ao sinal da insulina (DE SOUZA *et al.*, 2005; KHON *et al.*, 2005).

Esse quadro pró-inflamatório leva à maior resistência à insulina (RI), maior acúmulo de ácidos graxos livres (AGL) no fígado, tecido adiposo e músculo esquelético, além de uma série de complicações metabólicas (PATEL *et al.*, 2013) que levam ao aparecimento de outras doenças (SCHERNTHANER *et al.*, 2016; SCHOLZ *et al.*, 2015; CATSBURG *et al.*, 2014; JUNG *et al.*, 2014; RONDANELLI *et al.*, 2014).

Dentre as quais, estão a DHGNA (ABENAVOLI & PETA, 2014; ARISH & JORNAYVAZ, 2013) e as doenças ósseo-metabólica (VERHEYEN *et al.*, 2017) e osteomuscular (TOVO *et al.*, 2017; CHOI, 2016) que são causadas principalmente por alterações de alguns marcadores do metabolismo ósseo e hepático.

É crescente o número de estudos que apontam que essas doenças estão se tornando graves problemas de saúde pública, especialmente por sua estreita associação com a obesidade (ABEVANOLI *et al.*, 2016; NASABIAN *et al.*, 2016). Contudo, há necessidade de um maior volume de informações sobre a relação da obesidade com as alterações de marcadores do metabolismo ósseo e sua possível correlação com a DHGNA.

2.1.3 Diagnóstico, classificação e tratamento da obesidade

Para o diagnóstico nutricional e a classificação da obesidade, se utiliza como ferramenta o Índice de massa corporal (IMC), calculado pela razão entre a massa corporal total em kilogramas e a estatura em metros ao quadrado (kg/m^2) (WHO, 2004).

O IMC é um bom indicador, mas não totalmente correlacionado com a gordura corporal. Portanto, o ideal para melhor avaliação da composição corporal é que ele seja usado em conjunto com outros métodos de determinação de gordura corporal (circunferências, dobras cutâneas, bioimpedância elétrica e dupla emissão de raios X) (LEE & GALLAGHER, 2008). Contudo, a combinação do IMC com medidas de distribuição de gordura pode minimizar alguns problemas do uso desse indicador de forma isolada. A escolha de cada um deles, deve levar em consideração o custo e benefício antes de tudo (ABESO, 2016).

Outra medida antropométrica, que pode ser correlacionada com IMC é o perímetro da cintura (PC), que reflete melhor o conteúdo de gordura visceral e também se associa muito à gordura corporal total (ABESO, 2016). Pode-se realizar essa medida no maior perímetro abdominal entre a última costela e a crista ilíaca (WHO, 2000). Outros indicadores corporais têm sido sugeridos para maior enriquecimento de informações acerca do diagnóstico nutricional de indivíduos com obesidade. Dentre eles, o Índice de adiposidade visceral (do inglês, *Visceral Adiposity Index - VAI*), que é um modelo matemático que estima adiposidade visceral baseando-se no perfil antropométrico e lipídico dos indivíduos (AMATO *et al.*, 2010).

Kang et al (2017) em estudo realizado com 2.204 indivíduos com fenótipo OMS observaram que maiores valores de VAI estiveram associados com perfil metabólico mais comprometido após 41 meses de acompanhamento desses, dentre os quais 46% após esse período tornaram-se OMNS. Esse índice também foi o que melhor se correlacionou com o

prognóstico dos OMS, sendo considerado um bom preditor na determinação da conversão do fenótipo do OMS para OMNS.

Em outro estudo o VAI foi fortemente associado com hiperuricemia, independente do fenótipo OMS (DONG *et al.*, 2017), apresentou correlação com o fenótipo da cintura hipertrigliceridêmica e maior risco ao desenvolvimento do diabetes (DU *et al.*, 2014), além disso, o aumento dos valores de VAI tem sido associado a elevação progressiva da hiperglicemia e aos maiores valores RI (YANG *et al.*, 2015).

Na população brasileira para classificação de sobrepeso e obesidade, correlacionada com outras Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNTs) e risco de mortalidade são utilizados os pontos de cortes de IMC propostos pela WHO (2000).

A obesidade em adultos é definida, portanto, com IMC maior ou igual a 30 kg/m², podendo ser classificada em diferentes classes ou graus: obesidade classe I (IMC entre 30 e 34,9 kg/m²) com risco elevado, classe II (IMC entre 35 e 39,9 kg/m²) com risco muito elevado e a obesidade classe III (IMC maior ou igual a 40 kg/m²) considerada grave, com risco muitíssimo elevado (WHO, 2000).

O tratamento convencional da obesidade, assim como suas causas, também é multifatorial e inclui dieta hipocalórica, prática de exercícios e mudanças comportamentais (ABESO, 2016; AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE– ACSM, 2014). Em alguns casos, de acordo com a gravidade é indicado o tratamento farmacológico e em último caso a intervenção cirúrgica (ABESO, 2016; SBCBM, 2016).

É valido ressaltar, que nos últimos anos vêm crescendo o número de cirurgias bariátricas realizadas no Brasil, em 2016, esse número aumentou 7,5% em comparação com o ano de 2015. Os dados apontam que no ano de 2016 cerca de 100.512 pessoas fizeram a cirurgia, o número supera em cerca de 7 mil procedimentos das 93,5 mil cirurgias realizadas no ano de 2015 (SBCBM, 2016).

O Brasil já ocupa o segundo lugar entre os países do mundo em número de cirurgias realizadas, e esses dados indicam o aumento progressivo da gravidade da obesidade no país (SBCBM, 2016), além de apontarem à necessidade de uma maior atenção nos cuidados com este grupo.

2.1.3.1 Tratamento cirúrgico para controle da obesidade

No caso dos indivíduos diagnosticados com obesidade graus II e III, o que se tem observado é que a combinação dos tratamentos comportamental e farmacológico não alcançado

o sucesso esperado, uma vez que a perda de peso promovida pelo uso de medicamentos antiobesidade é frequentemente inferior a 10% do peso corporal e, muitas vezes, acompanhada de reganho de peso (WYATT, 2013).

Nesse sentido, a cirurgia bariátrica vem sendo utilizada como uma opção terapêutica em pacientes obesos cujos tratamentos convencionais não apresentaram resultados plenamente eficientes, e é considerada atualmente o tratamento mais bem-sucedido e duradouro para a obesidade (O'BRIEN *et al.*, 2013). Entretanto, segundo a SBCBM (2017) para a indicação cirúrgica deve se obedecida a análise de três critérios: IMC, idade e tempo da doença. É também obrigatória a constatação de “intratabilidade clínica da obesidade”, através de um endocrinologista.

As cirurgias bariátricas são classificadas de acordo com a modificação anatômica e funcional que proporcionam e são divididas em restritivas, disabsortivas e mistas, que combinam a restrição gástrica com algum grau de disabsorção intestinal, como a gastroplastia redutora com *Bypass Gástrico em Y de Roux* (BGYR). E, atualmente são os procedimentos mais realizados no mundo, devido ao seu componente anatômico, o qual apresenta excelente ação sobre a perda de peso, com manutenção em longo prazo, associado aos efeitos neurais e hormonais que contribuem para a diminuição do apetite e maior eficiência sobre a remissão das comorbidades e melhora da qualidade de vida (THURNHEER *et al.*, 2012).

Contudo, é importante ressaltar que os efeitos da cirurgia bariátrica devem ser considerados, pois podem ocorrer tanto em curto prazo, como tardiamente. Dentre os mais frequentes pode-se citar deficiências nutricionais e suas implicações (WYATT, 2013; THURNHEER *et al.*, 2012), alterações no metabolismo ósseo e perda de massa óssea no pós-operatório são efeitos adversos importantes que têm sido relatados mais recentemente (SHANBHOGUE *et al.*, 2017).

2.1.6 Os fenótipos da obesidade: obeso metabolicamente saudável (OMS) e obeso metabolicamente não saudável (OMNS)

Nos últimos anos, o paradoxo da obesidade, um novo conceito, a Obesidade Metabolicamente Saudável vem sendo investigado, nele, o fenótipo conhecido como “obeso metabolicamente saudável - OMS” é apresentado como fator de proteção para algumas complicações metabólicas, quando comparado com aqueles obesos considerados metabolicamente não saudáveis (GUTIÉRREZ-GROBE *et al.*, 2017; ABENAVOLI *et al.*, 2016; CHANG *et al.*, 2016; GONÇALVES *et al.*, 2016; HWANG *et al.*, 2015; CAMHI;

KATZMARZYK, 2014; CHANG et al., 2014; HEIANZA et al., 2014). Esses indivíduos classificados como OMS, embora possuam excesso de gordura corporal, apresentam maior sensibilidade à insulina, melhor perfil lipídico, glicídico, inflamatório e menor comprometimento hepático e de pressão arterial (PUJIA et al., 2016; LEE et al., 2015; KRAMER et al., 2013; KARELIS, 2008).

A prevalência desse fenótipo em adultos varia entre 6,3-31,5% (DING et al., 2015). Estima-se que entre 10 a 34% dos adultos obesos sejam metabolicamente saudáveis, sendo mais frequente no sexo feminino, em populações brancas não hispânicas e nos indivíduos mais novos (BLÜHER; SCHWARZ, 2014; SAMAROPOULOS et al., 2013).

A obesidade metabolicamente saudável tem sido relacionada principalmente ao diabetes, as doenças cardiovasculares e mais recentemente à DHGNA (CHANG et al., 2016; GONÇALVES et al., 2016; HASHIMOTO et al., 2015; TARGHER et al., 2015; ANSTEE et al., 2013). Contudo, até o momento, não há estudos que tenham avaliado em obesos graves, classe III, as alterações de um conjunto de marcadores do metabolismo ósseo, que estariam entre as principais responsáveis pelo aumento na incidência de doenças ósseo-metabólicas e ósseo-musculares observado nos últimos anos.

Vários critérios com o objetivo de caracterizar tal fenótipo têm sido sugeridos em pesquisas recentes (GUTIÉRREZ-GROBE et al., 2017; HUH et al., 2017; CHANG et al., 2016; LEE et al., 2015). O critério para identificação da Síndrome Metabólica (SM) proposto pelo NCEP-ATPIII tem sido um dos utilizados para definir o fenótipo OMS. Tal critério tem como variáveis integrantes da classificação: a obesidade abdominal, alterações de HDL-c, triglicerídeos (TG), glicemia e da pressão arterial sistêmica. De forma que, um indivíduo OMNS, se apresentar três ou mais dos cinco componentes da SM (GRUNDY et al., 2004).

Essa é uma classificação já bem consolidada na literatura, que incluem as avaliações bioquímicas, clínicas e antropométricas de fácil obtenção e ainda considera diferentes fatores de risco metabólico. No entanto, não dispensa a necessidade de uma padronização consistente na identificação do fenótipo OMS, já que esse consenso seria importante não apenas do ponto de vista epidemiológico, mas, principalmente clínico.

Embora alguns estudos já tenham sido realizados sobre o fenótipo OMS e a DHGNA, alguns mecanismos ainda permanecem desconhecidos. Além disso, novas evidências sugerem que existe uma forte relação entre a obesidade, o metabolismo ósseo e DHGNA (RODRÍGUEZ et al., 2014) que necessitaria, portanto, de mais investigação.

2.2 Obesidade, doenças ósseo-metabólicas e musculares no âmbito da cirurgia bariátrica

Embora a obesidade tenha sido associada, por muitos anos, a um baixo risco de fraturas (NIELSON *et al.*, 2012), existem evidências crescentes de que alguns dos fatores liberados pelo tecido adiposo podem ter um efeito deletério na massa óssea e muscular (DUTRA *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2015; POONPET & HONSAWEK, 2014; LEVINE & CRIMMINS, 2012; KOHARA *et al.*, 2011)

Nos últimos anos, as doenças ósseo-metabólicas e ósseo-musculares em níveis epidemiológicos estão cada vez mais relacionadas à obesidade, acometendo especialmente os indivíduos com obesidade classe III, que apresentam indicação para cirurgia bariátrica (BANO *et al.*, 2017; MANOEY *et al.*, 2017; MURRAY *et al.*, 2017; TANAKA *et al.*, 2013).

A hipótese de que a obesidade está relacionada à maior prevalência de sarcopenia, doença osteomuscular, e, fortemente associada a outras doenças ósseo-metabólicas como osteoporose e osteoartrite vêm sendo confirmada (DEMIRAG *et al.*, 2017; MANOY *et al.*, 2017; MURRAY *et al.*, 2017; PERNA *et al.*, 2017; COMPSTON, 2015; COMPSTON *et al.*, 2014; JANSSEN, 2010). Os principais mecanismos relacionados a essas doenças, envolvem a hiperleptinemia (KOHARA *et al.*, 2011), altas concentrações de PCR (YANG *et al.*, 2015), IL-6 (DUTRA *et al.*, 2017), RI (LEVINE & CRIMMINS, 2012) entre outros marcadores inflamatórios comuns na obesidade (POONPET & HONSAWEK, 2014), incluindo também as alterações de marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo, como PTH, fofatase alcalina, cálcio, vitamina D, zinco, fósforo, magnésio entre outros que tem papel fundamental na manutenção da saúde óssea desses indivíduos (FISHER *et al.*, 2017; JAFARI-NASABIAN *et al.*, 2017; ORMSBEE *et al.*, 2014; CLEMENS, 2014; GRÖBER *et al.*, 2013; BORDALO *et al.*, 2011).

As alterações metabólicas causadas pela perda de massa óssea e muscular levam a maior fragilidade óssea, comprometimento da mobilidade e aumento da taxa de mortalidade entre os obesos, mesmo antes da cirurgia bariátrica (KIM *et al.*, 2016; EDWARDS & BUEHRING, 2015; WANNAMETHEE & ATKINS, 2015).

E nesse espectro de doenças surgiu ainda um novo conceito, o da “obesidade osteosarcopênica ou obesidade sarcopênica”, uma síndrome englobando osteopenia, osteoporose, sarcopenia e obesidade (DEMIRAG *et al.*, 2017; MANOY *et al.*, 2017; MURRAY *et al.*, 2017; PERNA *et al.*, 2017), que é especialmente prejudicial devido redistribuição da gordura e sua infiltração nos ossos e músculos, sendo resultado das modificações significativas de vários marcadores ósseo-metabólicos citados anteriormente e que estão cada vez mais

frequentes na obesidade classe III (JAFARI-NASABIAN *et al.*, 2017; SZLEJF *et al.*, 2017; ILICH *et al.*, 2016; HITA-CONTRERAS *et al.*, 2015; ORMSBEE *et al.*, 2014).

À luz dessas informações, e considerando a obesidade com toda a sua complexidade, investigar possíveis alterações de alguns marcadores do metabolismo ósseo em indivíduos com obesidade grave, ainda no período pré-operatório, parece ser importante, pois facilitará o estabelecimento de estratégias preventivas, reduzindo ou até impedindo maiores complicações metabólicas em relação a saúde óssea, especialmente no pós-operatório, onde observa-se aumento da perda de massa óssea por vários mecanismos.

Os mecanismos propostos de perda óssea após a cirurgia bariátrica se dividem em quatro categorias: descarga mecânica, efeitos nutricionais, alterações no intestino e efeitos do tecido adiposo. Todas as vias acabam por afetar a perda óssea, seja reduzindo a função dos osteoblastos (formação), seja aumentando a função dos osteoclastos (reabsorção) (FOLLI *et al.*, 2012).

Esses eventos em longo prazo levam a maior risco de doenças ósseas portanto, predispondo à fratura e a outros distúrbios ósseo-metabólicos estruturais (JAFARI-NASABIAN *et al.*, 2017; SZLEJF *et al.*, 2017; ILICH *et al.*, 2016; HITA-CONTRERAS *et al.*, 2015; ORMSBEE *et al.*, 2014). O aumento da perda óssea, pode ser explicada também pela diminuição do estradiol em consequência da perda de tecido adiposo e outras condições associadas à perda de peso pós cirurgia, tais como aumento do PTH, um aumento do cortisol, ou uma diminuição do estresse corporal sobre os ossos, além da deficiência crônica principalmente de vitamina D e cálcio (BORDALO *et al.*, 2011).

2.3 Metabolismo ósseo e Obesidade

2.3.1 Tecido ósseo e aspectos fisiológicos

O osso é um tecido conectivo altamente especializado, composto de matriz orgânica (colágeno) mineralizada por cristais de hidropatita, combinado com elasticidade e rigidez. Apesar de sua aparente inércia, o osso é um órgão de constante atividade metabólica (FLORENCIO-SILVA *et al.*, 2015). Suas principais funções incluem: suporte, movimentação, proteção de órgãos nobres (como crânio e a coluna) e reservatório de íons (STAGI *et al.*, 2013). É formado por três principais tipos de células: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Os osteoblastos são células jovens de intensa atividade metabólica que se originam do mesênquima da medula óssea e tem a função de sintetizar a matriz óssea.

A fosfatase alcalina (FA) presente em níveis elevados na superfície das membranas citoplasmáticas de osteoblastos e pré-osteoblastos parece quando liberada, contribuir para o início da mineralização e o progressivo crescimento dos cristais de hidroxiapatita (KINI & NADEESH, 2012).

Em outro momento, os osteoblastos são convertidos em osteócitos, fixados na matriz óssea, sendo fundamentais para manutenção e sustentação do osso (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008; NOVACK & TEITELBAUM, 2008). O tecido hematopoético sob a ação do fator estimulador de colônia de macrófagos e de RANKL (receptor ativador do fator nuclear K-B), estimula a diferenciação dos osteoclastos, que são células multinucleadas responsáveis pela reabsorção óssea (LI *et al.*, 2000).

2.3.2 Marcadores bioquímicos não nutrientes do metabolismo ósseo

Para identificação do *turnover* ósseo avaliar os marcadores de formação e reabsorção é importante. Os marcadores de formação óssea medem a atividade de osteoblastos por meio da detecção de produtos provenientes da ação desse tipo celular ou produtos derivados do metabolismo de procolágeno. Enquanto que os marcadores de reabsorção óssea indicam os produtos da degradação de osteoclastos ou de colágeno (HLAING & COMPSTON, 2014).

Dentre os principais marcadores bioquímicos de formação óssea, destacam-se a fosfatase alcalina, fosfatase alcalina óssea, a osteocalcina e propeptídeos amino terminal do prócolágeno do tipo 1. E no que se refere aos marcadores de reabsorção, estão a hidroxiprolina, hidroxilisina, piridinolina, deoxipiridinolina, telopeptídeos de colágeno tipo 1 e excreção urinária de cálcio (NAYLOR & EASTELL, 2012; WALSH *et al.*, 2010; BERNARDI *et al.*, 2004).

Adicionalmente, considera-se outros marcadores bioquímicos, sendo esses, alguns nutrientes e hormônios para avaliar o metabolismo ósseo. Eles são ótimos parâmetros laboratoriais, acessíveis financeiramente, não invasivo, de fácil uso na prática clínica e que possibilitam também o diagnóstico das desordens nesse metabolismo. Apresentam ainda, outras aplicações, como predição de perda óssea, identificação de risco primário ou secundário para osteoporose e fraturas, além da predição de resposta a tratamentos e identificação de hiper-supressão do *turnover* ósseo em pacientes no tratamento a longo prazo da osteoporose (HLAING & COMPSTON, 2014). Entre os principais marcadores, os que frequentemente são investigados na prática clínica são, a fosfatase alcalina, o cálcio sérico, o PTH e a vitamina

(25OH)D (FLEET, 2017; SHIMIZU *et al.*, 2015; AUNG, 2014; SEO *et al.*, 2012; SUZUKI, 2011; CRANEY *et al.*, 2007)

A fosfatase alcalina, marcador de formação óssea tende a estar em maior concentração quando há deficiência de vitamina D, sendo influenciada pela homeostase de PTH, Cálcio e Vitamina D (CRISTAKOS *et al.*, 2011; SARAIVA; LAZARETTI-CASTRO, 2002).

O cálcio (Ca), um cátion divalente (Ca^{2+}) é essencial para manutenção do tecido ósseo (HOGAN, 2005). Suas concentrações são mantidas pela interação de hormônios calcitrôpicos, principalmente pelo PTH e a vitamina D, ambos agindo em órgãos como, intestino, rins e esqueleto (VIMALESWARA *et al.*, 2013; MOLINA, 2007).

O PTH é um hormônio peptídico com 84 aminoácidos produzido pelas paratireóides e secretado diante da queda da calcemia, evento recorrente em indivíduos obesos graves, mesmo antes da cirurgia bariátrica (WOLF *et al.*, 2015; HOGAN, 2005). Nos rins, induz o aumento da reabsorção tubular de cálcio e da excreção de fósforo, além de estimular a 1α -hidroxilase. No esqueleto promove o aumento da reabsorção óssea, além de ser o principal responsável por regular de forma aguda e rápida o cálcio sérico (VILAÇA *et al.*, 2015; CUSANO *et al.*, 2013).

A vitamina D, hormônio esteróide, cuja principal fonte é a produção cutânea pela ação dos raios ultravioleta (UV) sobre a 7-deidrocolesterol, dá origem a colecalciferol, que sofre em seguida, duas hidroxilações. A primeira, no fígado, formando a 25 hidroxivitamina D (25OHD) (forma mais abundante e que reflete os estoques corporais) e a segunda, nos rins, formando a 1,25 hidroxivitamina D (1,25OHD). Essa última, é formada a partir de um processo enzimático sistematicamente controlado pelo PTH e por concentrações baixas de fósforo que também desempenha um papel importante no metabolismo ósseo (GAFNI *et al.*, 2015). A 25OHD estimula a absorção de cálcio e fósforo no intestino, aumentando a sua concentração plasmática e reprimindo a transcrição e secreção do PTH (HOLLICK & CHENT, 2008; CRANEY, 2007).

Ao longo da vida o tecido ósseo mantém-se em atividade por meio de um processo acoplado de reabsorção-formação, que caracteriza a remodelação óssea (VILAÇA *et al.*, 2015). Entretanto, nos casos de obesidade grave e em indivíduos submetidos à cirurgia bariátrica esse processo pode sofrer algumas alterações.

A densidade mineral óssea (DMO) também é um marcador do metabolismo ósseo, sendo um parâmetro capaz de determinar a quantidade mineral, além de ser o principal determinante da resistência do tecido ósseo. Para determinação da DMO, a densitometria de dupla energia baseada em raios X (DXA) é o principal método, mostra-se excelente para predição de fraturas e monitoramento do tratamento de desordens ósseas, apresenta ótima

precisão e mínima exposição à radiação, consistindo em um método não invasivo, que necessita de curto tempo de realização (JÄRVENPÄÄ *et al.*, 2014).

2.3.3 Micronutrientes marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo

O osso é fortemente influenciado pela ingestão de vários nutrientes. Entre aqueles mais relatados na literatura estão cálcio, proteína, vitamina D, fósforo e magnésio (KELLY *et al.*, 2016; LO MENZO *et al.*, 2014). Atualmente, sabe-se que outras vitaminas (vitamina C, vitamina K e vitaminas do complexo B, em especial B12) e minerais (ferro, potássio, manganês, cobre, boro etc) são importantes para saúde óssea (KELLY *et al.*, 2016; PALACIOS, 2006).

Na obesidade, em especial, na classe III é frequente no pré-operatório ou quando submetido à cirurgia bariátrica, a presença de deficiência de vários micronutrientes (WOLF *et al.*, 2015; YOSSEF *et al.*, 2007). Dentre as deficiências mais prevalentes estão as, de vitamina D, vitamina B12, ácido fólico, vitamina A, vitamina C, tiamina, riboflavina, niacina, vitamina B6, cálcio, zinco e ferro (FAÉ *et al.*, 2015; MILLER *et al.*, 2014; LO MENZO *et al.*, 2014; TOREZAN, 2013; BORDALO *et al.*, 2011). Alguns desses nutrientes serão detalhados a seguir.

Os nutrientes cálcio e vitamina D exercem papel fundamental na manutenção da saúde óssea e estão envolvidos em diversas vias metabólicas (SEO *et al.*, 2012; SUZUKI, 2011; CRANEY *et al.*, 2007; BARBA; RUSSO, 2006; PARIKH; YANOVSKI, 2003). Estudos indicam que suas deficiências em longo prazo, sobretudo quando associados à obesidade, aumentam o risco de fraturas, e, ainda podem estar associados à maior prevalência de osteoporose, osteoartrite, sarcopenia e mais recentemente, a obesidade osteosarcopênica (SHIMIZU *et al.*, 2015; AUNG, 2014; AVENELL *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2013).

O cálcio é o mineral mais abundante no corpo, no osso é um marcador metabólico que deve estar sempre em equilíbrio com o sangue. Aproximadamente 50% do cálcio sérico está ligado a proteínas circulantes, principalmente albumina, 40% no estado livre, ionizado, que é a forma fisiologicamente ativa e 10% ligados com ânios séricos (WIEGERT *et al.*, 2012).

Como dito anteriormente, o PTH, o calcitriol (forma biologicamente da vitamina D₃ ou 1,25-di-hidroxivitamina D ou 1,25 [OH]₂D₃) e a calcitonina (secretada pela glândula tireóide) mantém o cálcio sérico total (CaST) numa concentração normal entre 8,8 a 10,2 mg/dL (ANGLEY, 2007). A absorção de cálcio ocorre por dois mecanismos (transporte ativo e transferência passiva). O mecanismo de transporte ativo ocorre principalmente no duodeno e no jejuno proximal; é saturável e controlado pela ação do calcitriol. Esse hormônio aumenta a captura de cálcio na mucosa intestinal. O segundo mecanismo, não é saturável e dependente da

vitamina D (FLEET, 2017; AUNG, 2014; CHRISTAKOS *et al.*, 2011; CRANEY, 2007; PALACIOS, 2006).

Um dos principais marcadores laboratoriais para avaliação do estado nutricional do cálcio, além do cálcio sérico total (CaST) e cálcio urinário (CaU) é cálcio sérico ionizável (CaSI). O CaST não pode ser usado de forma isolado, pois devido ao forte mecanismo homeostático, seus níveis se mantêm constantes sob várias condições clínicas. Além disso, sofre influência do pH sanguíneo e dos níveis séricos de fósforo e de albumina (DENARDIN *et al.*, 2007). O decréscimo de 0,1g/dL na albumina abaixo do seu valor de normalidade (4g/dL), leva o CaST a uma diminuição aproximadamente 0,8 mg/dL (COSTA *et al.*, 2008).

A hipoalbuminemia diminui os níveis da CaST, mas não afeta os níveis da CaSI, tornando este último o exame de concentrações mais fidedigno quando a suspeita de alteração de proteínas. Em contrapartida, a alcalose metabólica diminui a porcentagem do CaSI, promovendo aumento do fósforo sérico (ANGLEY, 2007). A hipoalbuminemia é comum em pacientes obesos com esteatose hepática dependendo da gravidade da doença, especialmente nos quadros já evoluindo para cirrose (ABEVANOLI *et al.*, 2016).

Em relação a vitamina D, ela é necessária para manter as concentrações normais de cálcio e fósforo, que por sua vez, são necessários para mineralização adequada dos ossos entre várias funções (CRANEY, 2007). Não está somente relacionada ao metabolismo do cálcio, fósforo e ósseo, cuja sua deficiência, ainda que subclínica já se estabelece com hipocalcemia leve, hiperparatiroidismo reacional e perda de massa óssea (HIRAVANI *et al.*, 2017; VERHEYEN *et al.*, 2017) mas também participa da patogênese de várias doenças, dentre elas, as doenças ósseo-metabólicas, osteomusculares (SHIMIZU *et al.*, 2015; AVELL *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2013) e a DHGNA (SEVERTON *et al.*, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2014; MOOM *et al.*, 2012).

Em estudo longitudinal que reuniu 548 indivíduos com obesidade com ou sem complicações metabólicas, observou-se correlação negativa entre as concentrações de 25OHD e o IMC dos participantes (AGBAHT *et al.*, 2014). Reforçando a hipótese de que os indivíduos obesos são mais propensos a essa deficiência. No estudo de Vineswaran et al. (2013) com 42.024 indivíduos foi observada essa mesma associação. Nele foi demonstrado que cada aumento de 1kg/m² do IMC estaria associado com 1,15% de redução da 25(OH)D.

Contudo, Seo et al. (2013) quando avaliaram a obesidade sarcopênica em relação aos níveis plasmáticos de vitamina D, não encontraram a mesma associação. É valido ressaltar, que a apesar dos indivíduos avaliados terem sido obesos também, a obesidade sarcopênica utiliza

mais critérios para o diagnóstico, que vão além do IMC. No estudo houve associação negativa da vitamina D com gordura visceral.

Para avaliar a concentração de vitamina D o melhor indicador do estado nutricional é a 25 (OH)D₃ plasmática, sendo a forma predominantemente circulante e a forma de armazenamento no organismo. É o marcador mais fidedigno, principalmente quando associada ao PTH e a homeostase de cálcio (GAFNI *et al.*, 2015; MORRIS; ANDERSON, 2011). A deficiência de vitamina D (DVD), cálcio e alterações hormonais como hiperparatiroidismo secundário quando não tratados resultam em doenças ósseas, (BANO *et al.*, 2017; MMURRAY *et al.*, 2017; TANAKA *et al.*, 2013; BORDALO *et al.*, 2011).

A DVD é determinada quando as concentrações de 25(OH)D₃ estão abaixo de 20 ng/dL, resultando em diminuição de cálcio e fósforo, que por sua vez, estimulam a secreção de PTH. O PTH aumenta a produção renal de 1,25 (OH)₂D₃ de modo que essa se encontra em níveis normais ou elevados nos estágios iniciais da deficiência, tornando-a um indicador menos sensível, quando avaliado de forma isolada. O hiperpatireoidismo secundário é muito comum em indivíduos com obesidade grave principalmente, e que cursam com outras deficiências nutricionais (VERHEYEN *et al.*, 2017; WOLF *et al.*, 2015; CRANEY, 2007).

O fósforo, magnésio, zinco e a vitamina B12 são outras deficiências que podem ocorrer. Esses nutrientes podem estar reduzidos em indivíduos com obesidade e os seus déficits podem estar relacionados à gravidade da doença (KELLY *et al.*, 2016; LO MENZO *et al.*, 2014). Suas necessidades podem ficar aumentadas no pós-operatório de cirurgia bariátrica, por isso a importância de serem avaliados antes de qualquer intervenção, a fim de minimizar às complicações metabólicas após cirurgia.

O fósforo é o segundo mineral mais abundante no organismo. É encontrado na natureza na forma de fosfato inorgânico ou livre (10%), ligados a proteínas (10%) e complexados com cálcio e o magnésio (80%). Sua função principal no metabolismo ósseo é se combinar com o cálcio para propiciar a rigidez aos ossos (CHRISTAKOS *et al.*, 2011; PALACIOS, 2006). No sangue seu nível é regulado principalmente, pelo controle de sua excreção e reabsorção urinária no túbulo proximal. Em paralelo, fisiologicamente o PTH e, em menor grau, a calcitonina agem reduzindo o transporte máximo de fosfato e, consequentemente, sua excreção. Outro hormônio, fosfatonina, semelhante ao PTH, inibe a reabsorção tubular do fosfato, aumentando a sua excreção. Entretanto, a 1,25 (OH)₂D₃ atua aumentando a reabsorção tubular de fosfato e, portanto, diminuindo sua excreção (VERHEYEN *et al.*, 2017; WIEGERT *et al.*, 2012).

A concentração de fósforo sérico normal é de 2,7 a 4,5 mg/dL. Não existe marcador laboratorial fidedigno para avaliação nutricional corporal do fósforo, pois reflete menos de 1%

do mineral total do corpo; a maioria existente encontra-se fixada no osso e tecidos moles (WIEGERT *et al.*, 2012; PALACIOS, 2006).

O magnésio é um mineral determinante em quase todas as reações orgânicas, participando de cerca de 300 sistemas enzimáticos. O conteúdo de magnésio está dividido em três grandes compartimentos do corpo: cerca de 65% do mineral encontra-se no osso, 34% no espaço intracelular (principalmente nos músculos cardíaco e esquelético e no fígado) e apenas 1% nos fluidos extracelulares e no plasma (BARBAGALLO & DOMINGUEZ, 2000). Aproximadamente 33% do magnésio no plasma está ligado a proteínas, principalmente a albumina (25%) (WIEGERT *et al.*, 2012). O PTH, a calcitonina e o glucagon estimulam a reabsorção renal do magnésio. A vitamina D aumenta a sua absorção (ORCHARD *et al.*, 2016).

A vitamina D para ser convertida na forma ativa é dependente de uma enzima hidrolase que necessita de magnésio. A secreção de PTH é dependente de monofostato de adenosina cíclico (cAMP), o qual por sua vez é sintetizado a partir do Mg-ATP. Portanto, o magnésio tem papel fundamental na regulação de toda absorção e metabolismo de cálcio, através da sua ação na ativação de vários homônios (PTH, calcitonina, vitamina D), de modo que praticamente todas as reações fundamentais do cálcio dependem da presença efetivamente adequada de magnésio (HITA-CONTRERAS *et al.*, 2015; PALACIOS, 2006; CRANEY, 2007). Os sintomas clínicos da hipomagnesemia, definido como magnésio sérico inferior a 1,7 mg/dL, são fraqueza, formigamento, tremor, entre outros. A hipermagnesemia é definida como magnésio sérico superior a 2,3 ng/dL incluem, náuseas, vômitos sudoreses, rubor, sonolência (WIEGERT *et al.*, 2012). A dosagem do magnésio sérico (MgS) ou plasmático é o indicador do estado nutricional mais utilizado, no entanto é um exame pouco sensível.

No estudo prospectivo “the Women's Health Initiative Observational Study” que avaliou 73. 684 mulheres menopausadas concluíram que o baixo consumo de magnésio esteve associado ao menor densidade mineral óssea (DMO) (ORCHARD *et al.*, 2014). Mulheres obesas e com DHGNA parecem ter maior risco de perda de massa óssea (TARGHER *et al.*, 2015), osteoporose e obesidade sarcopênica (NASABIAN *et al.*, 2017; SZLEJF *et al.*, 2017). Uma metanálise recente, também observou uma correlação significativa e inversa entre a ingestão de magnésio e o risco de menor DMO no pescoço femoral e quadril total (FARSINEJAD-MARJ, 2016).

O zinco é um marcador relevante no metabolismo ósseo (PALACIOS, 2006). É encontrado ligado a proteínas em praticamente todas as células do organismo e na estrutura cristalina do osso e nas enzimas ósseas. É necessário para a atividade osteoblástica adequada, inibe a ação dos osteoclastos, sendo importante para a formação de enzimas ósseas (como a

fosfatase alcalina), aumenta atividade da vitamina D, sendo dessa maneira, determinante para a formação óssea adequada (CRANEY, 2007). A deficiência de zinco pode representar até 45% na massa óssea, inclusive com a deterioração da arquitetura trabecular, com diminuição e estreitamento da trabécula, podendo ser um importante fator de risco para osteoporose (HIRAVANI *et al.*, 2017; HITA-CONTRERAS *et al.*, 2015; AUNGE, 2014).

Após sua transferência para o intestino, o zinco se liga a albumina, sendo transportado para fígado, de onde é liberado na circulação, formando um complexo com a albumina (70%) (WIEGERT *et al.*, 2012). O zinco sérico (ZnS) ou plasmático é atualmente o mais utilizado para avaliação do estado nutricional desse mineral, apesar de sua baixa sensibilidade e especificidade assim como o MgS (KELLY *et al.*, 2016). Os seus níveis plasmáticos estão sujeitos a uma variedade de estímulos (ingestão dietética, exercício físico, infecções dentre outros). Apesar de ser sensível para os casos de deficiência moderada a grave, o ZnS não detecta deficiência leve. Até o momento, nenhum método disponível tem essa sensibilidade suficiente para detecção desses estágios de deficiência (HOJYO & FUKADA 2016).

A vitamina B12 é um termo que se refere ao grupo de quatro cobalaminas (Cbl), incluindo metil-Cbl e adenosil-Cbl, os dois co-fatores enzimáticos de metionina sintase e metilmalonil-CoAmutase, respectivamente (GUILAND; AIMONE-GASTIN, 2013). A cobalamina sérica ainda é o método mais utilizado para o diagnóstico da deficiência de vitamina B12, visto que é um exame de baixo custo. Entretanto, substratos de duas enzimas dependentes dessa vitamina, ácido metilmalônico (NMA) e homocisteína (HCY) têm sido as técnicas mais acuradas para avaliar a deficiência intracelular (CARMEL, 2011).

Uma das consequências mais frequentes da obesidade grave, especialmente após cirurgia bariátrica é a anemia que ocorre devido a deficiência de ferro ou de vitamina B12 (VIA & MECHANICK, 2017; HANNIBAL *et al.*, 2016; WENG *et al.*, 2015; KWON *et al.*, 2013), seguida de perda mineral óssea, entre outras complicações metabólicas (MANGAIN *et al.*, 2016).

Em uma revisão sistemática, que reuniu dados de estudos até 2012 foi demonstrada a importância de estratégias que previnam e gerenciem a deficiência dessa vitamina em pacientes candidatos ou que já foram submetidos à cirurgia bariátrica, devido ao fato da mesma ser recorrente em indivíduos com obesidade grave (MAJUNDER *et al.*, 2013).

Alvarez et al. (2014) em estudo transversal, realizado após um ano de pós-operatório de cirurgia bariátrica, observaram que dos 40 pacientes avaliados 13% cursavam com deficiência de vitamina B12. Enquanto que Silva et al. (2016) ao avaliar os dados retrospectivos de 286

pacientes submetidos a diferentes técnicas de cirurgia bariátrica encontraram frequência de inadequação de 16,9% na amostra.

Clinicamente essa deficiência leva a deterioração neurológica e anemia megaloblástica e, quando não tratada, à morte. A deficiência subclínica de B12 (geralmente estabelecida a partir de soro total <200 pmol/L) ocorre de forma assintomática ou com sintomas genéricos bastante sutis que muitas vezes são atribuídos erroneamente a distúrbios não relacionados (HANNIBAL *et al.*, 2016).

Níveis séricos normais de NMA situam-se entre 0,08 a 0,56 µmol/L, enquanto que os de homocisteína situam-se entre 5 e 15 µmol/L. Os valores menores de 150 pg/mL (110 pmol/L) já denotam deficiência em todas as idades (CLARCK, 2007).

No que se refere ao metabolismo ósseo e a vitamina B12, Garcia et al. (2014) sugerem um mecanismo pelo qual a deficiência materna de vitamina B12 pode comprometer a massa óssea da prole. Um fornecimento materno ineficiente de vitamina B12 para a prole reduz a síntese hepática de taurina e provoca resistência ao hormônio do crescimento, atenuando a sinalização hepática do transdutor de sinal e ativador da transcrição 5 (STAT5). Estes eventos diminuem os níveis circulantes de factor de crescimento semelhante a insulina (IGF-1) e, portanto, o efeito anabólico do IGF-1 em osteoblastos. Em adultos ainda são necessários mais estudos para justificar essa possível associação.

A vitamina B12 assim como outros micronutrientes, parece ter alguma participação na etiologia, tratamento e prevenção de doenças relacionadas ao metabolismo ósseo (KELLY *et al.*, 2016), contudo, os possíveis mecanismos ainda não estão bem esclarecidos e os estudos mostram resultados controversos especialmente no que se refere a menor incidência de fraturas (LOPEZ *et al.*, 2017; VAN WIJNGAARDEN *et al.*, 2014).

É fato que os todos os micronutrientes, em especial, os que foram descritos desempenham algum papel especialmente de forma sinérgica que é importante para saúde óssea e, portanto, relevante para prevenção de doenças que resultam das alterações desse metabolismo (KELLY *et al.*, 2016; PRICE, 2012; CAO, 2011).

As doenças ósseas alteram o padrão de produção dos marcadores bioquímicos, sejam eles nutrientes ou não, pois eles retratam a formação ou reabsorção ósseas. Normalmente, como o processo de formação é estreitamente ligado ao de reabsorção, um marcador que reflete reabsorção também reflete formação, entretanto, algumas condições, como a obesidade pode alterar esse processo (CAO, 2011).

2.3.4 Relação entre tecido adiposo e metabolismo ósseo

Recentemente, vários estudos têm sugerido que existam interações entre o tecido adiposo e tecido ósseo (JAFARI-NASABIAN *et al.*, 2017; HITA-CONTRERAS *et al.*, 2015; GONELLI *et al.*, 2013). Sabe-se que os adipócitos e osteoblastos têm origem na mesma célula precursora da medula óssea, em respostas a diferentes estímulos autócrinos, parácrinos e endócrinos (CAO, 2011). Os mecanismos envolvidos na interação gordura e osso ainda não estão bem esclarecidos. No entanto, acredita-se que a leptina, uma adipocina secretada pelos adipócitos em proporção à massa corporal, em maior quantidade em obesos, desempenhe um papel relevante na osteogênese (BARBOUR *et al.*, 2012).

Em experimento realizado com animais, camundongos obesos e hipogonádicos, livres da ação de leptina (portadores de mutações na molécula da leptina – ob/ob ou em seu receptor – db/db) mostraram um aumento importante da massa óssea, sugerindo influência direta da leptina sobre osteogênese (KYUNG *et al.*, 2009). Outras evidências, mostraram sua participação ativa na homeostase óssea (CONFAVREUX *et al.*, 2009).

A leptina atua por meio de neurônios localizados na região ventro-medial do hipotálamo em duas vias distintas e antagônicas: estimula o sistema nervoso simpático (SNS), que atua com os receptores $\beta 2$ nos osteoblastos (células responsáveis pela síntese de matriz óssea), levando a produção de RANKL (receptor ativador do fator nuclear K-B) e à diferenciação de osteoclastos. Ela também age via CART (*cocaine-and amphetamine related transcriptI*), por mecanismos ainda desconhecidos, inibindo a diferenciação de osteoclastos. Assim, sua atuação final é uma ação anti-osteogênica (CAO, 2011).

A evidência de que a leptina interfere no metabolismo ósseo, motivou a busca por um *feedback* dos osteoclastos na modulação do metabolismo energético. Estudos evidenciaram a existência de uma substância produzida pelos osteoclastos: a osteocalcina, um componente da matriz óssea extracelular, responsável pela fixação óssea (COMPSTON, 2013; CAO, 2011; REINHER; ROTH, 2010). Essa substância promove na célula β -pancreática, proliferação e aumento da secreção de insulina e no TA, aumento da produção de adiponectina (GOWER & CASAZZA, 2013).

Em ensaios clínicos, foi encontrada correlação inversa entre osteocalcina, fosfatase alcalina e níveis de marcadores metabólicos, como glicemia em jejum, insulinemia, índice HOMA (*homeostatic model assessment*) e IMC (CHEN; YANG *et al.*, 2015; ONG *et al.*, 2014; SCHIN *et al.*, 2014; GONELLI *et al.*, 2013; ZILLIKENS *et al.*, 2010).

2.3.5 A patogênese das alterações ósseas na obesidade

Na obesidade, por ser o tecido adiposo infiltrado com uma quantidade aumentada de macrófagos (LEE *et al.*, 2015). Além de produzir outros fatores pró-inflamatórios, incluindo IL-6, PCR e as adipocinas (adiponectina e leptina) envolvidas na inflamação crônica (GONCALVES *et al.*, 2016; KRAMER *et al.*, 2013). Esses eventos parecem estar envolvidos na patogênese das alterações ósseas, pois podem aumentar a reabsorção óssea através da regulação das citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF α . Essas citocinas são capazes de estimular a atividade dos osteoclastos através da regulação da via RANKL / RANK / OPG (AZAMAR-LLAMAS *et al.*, 2017; SHAPSES *et al.*, 2017).

Alguns estudos sugerem também que as citocinas pró-inflamatórias são mediadores primários que levam a osteopenia ou osteoporose. A perda acelerada de osso na menopausa está ligada ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF-a, IL-1 e IL-6 (DEMIRAG *et al.*, 2017; ORMSBEE *et al.*, 2014; POONPET & HONSAWEK, 2014).

Entretanto, alguns pesquisadores sugerem que o mecanismo fisiopatológico relacionado à osteoporose, seja outro, e que esse, envolva o crescente acúmulo de gordura dentro da medula óssea, conhecida por afetar a diferenciação e função dos osteoblastos, ao mesmo tempo, que aumenta a atividade osteoclástica e afeta ainda mineralização óssea (GUNARATNAM *et al.*, 2014; WAUQUIER *et al.*, 2013).

Nesse sentido, um estudo, que utilizou tomografia computadorizada para avaliação da gordura visceral e DMO, demonstrou que a gordura na medula óssea se correlacionava positivamente com a gordura visceral e negativamente com o fator de crescimento da insulina tipo I (*insulin-like growth factor*- IGF-1) em mulheres com obesidade. Os autores sugerem que os efeitos prejudiciais da gordura visceral sobre a saúde óssea poderiam ser mediados, em parte, pelo acúmulo de gordura na medula óssea, estabelecendo uma relação entre obesidade central e osteoporose (BREDELLA *et al.*, 2011).

Em uma meta-análise que incluiu estudos observacionais, avaliando 398.610 mulheres, baixos valores de IMC foram associados com maior risco de fratura de quadril e menor risco de fraturas osteoporóticas, fratura de tíbia e fibula, antebraço distal e braço (resultados ajustados para a DMO). Enquanto, valores elevados de IMC foram associados com maior risco de fratura na parte superior do braço (úmero e cotovelo) e de todas as fraturas osteoporóticas (JOHANSSON *et al.*, 2014).

Outro ponto a ser considerado é a redução de peso dos obesos, pois essa leva à diminuição dos níveis circulantes de estrogênio, promovendo aumento da atividade

osteoclástica, elevando níveis de citocinas como, IL-1, IL-6 e TNF α . Outra alteração a ser observado diz respeito à restrição alimentar com a ingestão inadequada de cálcio e proteína, influenciando assim o eixo Cálcio-PTH com aumento na atividade osteoclástica (SHAPES & RIEDT, 2006).

A leptina uma das citocinas mais importantes hiper-secretada pelo tecido adiposo de obesos, parece explicar a maior parte dos efeitos que a gordura tem sobre o osso. Por meio do envolvimento direto ou indireto com a remodelação óssea, desempenhando um papel significativo em muitas doenças ósseas, como osteoporose, osteoartrite, obesidade sarcopênica, artrite reumática, tumores ósseos e até mesmo fraturas (JAFARI-NASABIAN *et al.*, 2017; ILICHI *et al.*, 2016; CHEN; YANG *et al.*, 2015).

A hiperglicemia, outra alteração comum em obesos graves, afeta o esqueleto em ambos os níveis da matriz óssea celular e extracelular. Estudos *in vitro* têm demonstrado que elevados níveis de glicose aumentam a diferenciação/fusão de osteoclastos, resultando em um ambiente de maior reabsorção. A nível tecidual, a hiperglicemia afeta a matriz óssea orgânica através do acúmulo de produtos finais de glicação avançada (AGEs) que levam à menor resistência óssea (GIMBLE & NUTALL, 2012; CAO, 2011).

De fato, o tecido adiposo apresenta complexas relações bioquímicas e hormonais, interagindo com diversos sistemas e aparelhos. A relação “gordura e osso” necessita de mais investigação. Nos últimos anos, além da interação entre tecido adiposo e metabolismo ósseo, vem sendo ressaltada a possível relação desses com DHGNA, que também é muito comum entre obesos graves, que cursam com alterações de marcadores ósseos e metabólicos (TOVO *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2016; TARGHER *et al.*, 2015).

2.4 Obesidade e DHGNA

A obesidade está relacionada com o espectro das alterações hepáticas conhecidas como DHGNA (CHOI *et al.*, 2017; PUJIA *et al.*, 2016). Os indivíduos com DHGNA têm até 4,4 vezes mais chance de desenvolver hepatocarcinoma que a população em geral e essa estimativa piora quando está associado à obesidade (HEINRICH *et al.*, 2017).

2.4.1 Relação entre tecido adiposo e patogênese da DHGNA

A patogênese da DHGNA tem relação com os produtos liberados pelo adipócito como, a leptina, o TNF α , a resistina, o angiotensinogênio, além da produção de AGL. A leptina

aumentada tem relação com a fibrogênese da doença (FABBRINI *et al.*, 2010). Chitturi et al. (2002) estudaram níveis de leptina em indivíduos obesos com esteatose comparados com grupo normal e observaram que a leptina, o peptídeo C e a idade foram fatores preditores independentes da gravidade da esteatose, mas não da inflamação ou fibrose. No estudo de Chalasani et al. (2003) a maior secreção de leptina esteve associada com a progressão da DHGNA.

O TNF- α está aumentado em indivíduos obesos e diabéticos é o responsável pelo aumento da RI comprometendo moléculas sinalizadoras de ação (BLOOMGARDEN, 2017; ABEVANOLI *et al.*, 2016; BARROS *et al.*, 2016; LEITE *et al.*, 2014). A resistina está associada a RI (BERKA & Verna, 2016), ao aumento da produção hepática da glicose e a diminuição da captação pelo adipócito *in vitro* (PAN *et al.*, 2015). A adiponectina tem relação inversa com tecido adiposo visceral e positiva a sensibilidade de insulina (SI). Assim, em pacientes com DHGNA, são encontrados níveis baixos de adiponectina, a qual estimula a utilização e a oxidação de glicose pelo fígado por ativação da proteína quinase acionada pela monofosfato de adenosina (AMPK) (DONGIOVANNI *et al.*, 2015). Conforme observado a obesidade tem forte associação à DHGNA. Na distribuição central de gordura corporal há maior RI e maior produção de AGL.

O principal mecanismo envolvido na DHGNA é a RI. Quando há RI, os tecidos adiposo, muscular e hepático tornam-se ineficientes para metabolizar a glicose e ácidos graxos (AG), levando ao aumento dos AGL circulantes, que em seguida, inibem a captação periférica da glicose induzida pela insulina, agravando ainda mais a RI (CHOI *et al.*, 2017; ANGULO, 2002). Em resumo, a produção de TG pelo hepatócito está aumentada (lipogênese hepática), a beta-oxidação está diminuída e a secreção de VLDL (*very low-density lipoprotein*) também. Todos esses eventos culminam na esteatose hepática (EH), que por definição histológica, se caracteriza pelo acúmulo de gordura em mais de 5% dos hepatócitos (FARREL *et al.*, 2012; HUBSCHER, 2006). Para que se possa caracterizar a DHGNA, o critério mais aceito é a ingestão de menos de 140g de álcool por semana para homens e 70g de álcool para mulheres (CHALASANI *et al.*, 2012).

As alterações de enzimas hepáticas, métodos de imagem mostrando a presença da esteatose e a exclusão de outras doenças do fígado são por vezes considerados como critérios clínicos de diagnóstico. Contudo, somente a biópsia hepática é capaz de demonstrar o estadiamento da doença (ABENAVOLI *et al.*, 2016).

Todas as citocinas produzidas pelo tecido adiposo, em especial, Lep, Res, angiotensinogênico, TNF α e interleucinas que levam a RI, estão envolvidas na patogênese da DHGNA (POLYZOS *et al.*, 2016; WREE *et al.*, 2011).

A obesidade central está mais relacionada à progressão da DHGNA por estar associada ao acúmulo de gordura nos órgãos abdominais. O tecido adiposo visceral (TAV) é mais predisposto a lipólise devido a sua menor sensibilidade à insulina, maior sensibilidade a glicocorticoides e maior número de receptores adrenérgicos (YOO *et al.*, 2010). Os AGL liberados a partir dessa lipólise são usados pelo fígado como uma importante fonte de energia.

Outro mecanismo que também pode estar envolvido na progressão da DHGNA está relacionado à leptina. Uma revisão sistemática e meta-análise (POLYZOS et al., 2016) que incluiu 2612 indivíduos (775 controles e 1837 pacientes com DHGNA) relataram que foram observados níveis circulantes de leptina mais elevados na esteatose do que nos controles, sobretudo naqueles que tinha a DHGNA em maior gravidade.

Nos estudos que incluíram indivíduos com obesidade, os níveis séricos de leptina também estavam elevados, especialmente naqueles que eram obesos com o diagnóstico de DHGNA. Esses achados sugerem que tais pacientes sejam resistentes à ação desta adipocina.

A hipótese é que a leptina participe de etapas importantes no desenvolvimento da DHGNA. Acredita-se que a leptina ao estimular a desfosforilação do receptor do substrato de insulina e a redução da gliconeogênese, possibilite o desenvolvimento da EH. Além disso, a leptina por ter uma ação pró-inflamatória, é capaz de aumentar a secreção de TNF- α , IL-6 e IL-12, contribuindo para maior inflamação favorecendo o agravamento da doença até a fibrose hepática (BEKAERT *et al.*, 2016; POLYZOS *et al.*, 2016; ABENAVOLI; PETA, 2014).

2.4.2 DHGNA: aspectos epidemiológicos, etiológicos e fisiopatológicos

O espectro da DHGNA é uma condição clínica patológica que alcança desde a esteatose hepática (acúmulo de ácidos graxos no fígado) não alcoólica, em que não há mudanças inflamatórias, até a esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), caracterizada por resposta inflamatória e lesão dos hepatócitos, com ou sem fibrose (CHALASANI *et al.*, 2012; FARREL *et al.*, 2012). Quanto à progressão da esteatose para esteato-hepatite essa é microscopicamente caracterizada por acúmulo de gordura, inflamação e balonização dos hepatócitos, corpúsculos de Mallory e fibrose (CHALASANI *et al.*, 2012). Nem todos evoluem para esteato-hepatite, contudo vários fatores (genéticos, ambientais, citocinas inflamatórias, peroxidação lipídica e

disfunção mitocondrial) parecem estar envolvidos e vem sendo amplamente investigados. Nos dias atuais, representa à doença hepática mais comum no ocidente (FAZEL *et al.*, 2016).

Os dados sobre prevalência da DHGNA variam de acordo com a casuística e metodologia para seu diagnóstico. Entretanto, é sugerido que a doença afete cerca de 6 a 45% da população mundial, sendo maior, 70%, em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 e chegando a 90% em obesos graves com dislipidemias e RI (FAZEL *et al.*, 2016; OKUR; KARACAER, 2016; PAPPACHAN *et al.*, 2014).

Em países ocidentais, está presente em mais de 30% da população (LOOMBAR & SANYAL, 2013; BROWNING *et al.*, 2010) e nas populações asiáticas varia de 6% a 25% (FAN, 2007). No Brasil, a frequência da DHGNA na população em geral é desconhecida, entretanto, em estudos em que pacientes foram avaliados por biópsia hepática e/ou ultrassonografia abdominal, a frequência da doença foi de 96% (FEIJÓ *et al.*, 2013), 64 % (BARROS *et al.*, 2016), 43 %(VILAR *et al.*, 2015) e 38% (DE SOUZA *et al.*, 2014), estando de acordo com os dados de prevalência conhecidos em outros países.

Diversos autores já demonstraram que a DHGNA tem forte associação com várias doenças, como, diabetes mellitus (BLOOMGARDEN, 2017; LEITE *et al.*, 2014), obesidade (CHOI *et al.*, 2017; MACHADO; CORTEZ-PINTO, 2016), doenças cardiovasculares, (BREA *et al.*, 2017; VILAR *et al.*, 2015), síndrome metabólica (BALESTRI *et al.*, 2016; BARROS *et al.*, 2016; ERASLAN *et al.*, 2013) entre outras.

A etiologia da doença é multifatorial e inclui fatores genéticos (ex: polimorfismo de novos marcadores genéticos como variantes do PNPLA3) (SEVERSON *et al.*, 2016), dietéticos (ex: frutose), RI (POLYZOS *et al.*, 2009) e adipocinas (POLYZOS *et al.*, 2016) bem como outros com potencial associação, mas que dependem de ativação, como é o caso, dos disruptores metabólicos (POLYZOS *et al.*, 2015) e da própria disbiose que pode ocorrer na microbiota intestinal (DOLBERIS *et al.*, 2017; BASHIARDES, 2016; POLYZOS *et al.*, 2012).

A patogênese da DHGNA também está relacionada a vários mecanismos (Figura 9), entretanto, ainda não está bem esclarecida. Tem sido associada principalmente à RI no fígado e no tecido adiposo (CHOI *et al.*, 2017).

No fígado existe a diminuição de 50% da depuração da glicose e incapacidade de diminuir a produção de glicose hepática. No tecido adiposo, ocorre uma alteração na inibição de AGL, diminuição da captação da glicose e inibição da oxidação de gorduras (ABEVANOLI *et al.*, 2016; FABBRINI *et al.*, 2010).

Portanto, as primeiras alterações que levam ao acúmulo de gordura no fígado consistem na modificação da captação, síntese e degradação ou secreção das moléculas de gorduras

decorrente da RI, que pode ser causada por obesidade (FEIJÓ *et al.*, 2013), diabetes (BLOOMGARDEN, 2017), fator genético (ANSTEE *et al.*, 2016; POLYZOS & MANTZOROS, 2015) entre outros.

A RI sistêmica, que parece ser o principal determinante da patogênese ocorre independentemente de fatores como, peso, percentual de gordura corporal e visceral (BERKA & Verna, 2016). E dessa forma, a oferta de AGL aumenta, especialmente quando houver elevação da gordura visceral, excesso de lipídeos da dieta, aumento da síntese de AGL pelo próprio fígado e redução da síntese e/ou secreção de lipídeos como a lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL). Todos esses eventos, somado ao excesso de ferro intra-hepático, que representa um cofator de estresse oxidativo na progressão da DHGNA, culminam na EH (GAMBINO *et al.*, 2016; MACHADO; CORTEZ-PINTO, 2016).

O excesso de AGL dentro do hepatocito faz com que seja extrapolada a capacidade funcional e metabólica da mitocôndria, levando a disfunção da biogênese mitocondrial, cursando com resposta inflamatória, formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e indução do citocromo P450 2E1 (CYP2E1) (LIU *et al.*, 2017; FARREL *et al.*, 2012).

Além de toda a cascata de eventos com liberação de marcadores inflamatórios, que afetam diversos tecidos, dentre eles, adiposo e muscular (FABBRINI *et al.*, 2010), um estudo recente (LIU *et al.*, 2017) sugere que os pacientes com esteatose que apresentem expressão maior do citocromo P450 2E1, evoluam mais facilmente para EHNA.

2.4.2 DHGNA: diagnóstico e tratamento

Na maioria das vezes o diagnóstico não pode ser realizado nos estágios iniciais da doença em função da mesma progredir de forma silenciosa, por ser assintomática ou com sintomas inespecíficos.

Em muitos casos o diagnóstico é dado pela elevação das enzimas hepáticas (aspartato aminotransferase – AST, alanina aminotransferase – ALT e Gama Glutamil Transpeptidase – GGT), alteração de marcadores metabólicos (perfil lipídico sérico, ácido úrico, microalbumina na urina, PCR, fibrinogênio, PAI-1 e FA) e através de ultrassonografia (US) ou tomografia de abdômen em exames de rotinas para avaliar outras comorbidades. Outro método diagnóstico utilizado é a biópsia hepática, que avalia melhor o estadiamento da DHGNA. Possibilita avaliar os graus de esteatose e fibrose e identificar alterações necroinflamatórias (BARROS *et al.*, 2016; BRUNO *et al.*, 2014; SCHWERGER *et al.*, 2014; FABBRINI *et al.*, 2010).

Segundo Vajro et al. (2012) as definições clínicas patológicas da esteatose hepática, são: a) DHGNA: Doença hepática gordurosa não alcoólica, que é a forma mais benigna da doença, o estágio 1, ou esteatose simples, com leve inflamação; ou termo resumido para todo o espectro da doença; b) Esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), o segundo estágio da doença. É a esteatose hepato celular macro-vesicular com inflamação portal, com ou sem fibrose portal, na ausência de balonização e fibrose perissinusoidal; c) Cirrose: é o estágio mais avançado da fibrose - estágio 3 (fibrose estendida até os portais adjacentes, fibrose em ponte) e estágio 4, ou seja, cirrose, com perda da estrutura normal do fígado.

No que se refere ao tratamento, apesar de não haver ainda um padrão, esse inclui mudanças muito semelhante aquelas propostas para o tratamento de outras DCNTs como a obesidade, com alterações de hábitos de estilo de vida, que incluem dieta com consumo de alimentos fontes de antioxidantes principalmente, prática de exercícios, favorecendo assim a melhora do estado nutricional do paciente, com perda de peso (na maioria dos casos) e aumento da aptidão física, favorecendo os parâmetros metabólicos como RI, glicemia, lipemia, função hepática e outros marcadores inflamatórios.

Entretanto, dependendo da gravidade da doença, ainda são indicados os tratamentos farmacológicos e intervenção cirúrgica, especialmente quando a DHGNA está associada a obesidade grave, o que é muito frequente (ABESO, 2016; RINELLA, 2015; PEARLMAN & LOOMBA, 2014; MAFA & LOTERSZTAJN, 2013)

Com os avanços das pesquisas e falta de intervenções terapêuticas padronizadas para o tratamento da doença hepática gordurosa, alguns novos agentes que ativam ou inibem a sinalização de receptores nucleares como os PPAR- α , PPAR- β/δ , PPAR- γ , FXR e LXR têm sido sugeridos como promissores e possíveis alvos terapêuticos, por estarem envolvidos na modulação da homeostase dos nutrientes e de energia. Uma recente revisão, trouxe os principais achados sobre as funções desses receptores na patogênese da doença hepática gordurosa, em especial da DHGNA, e propôs uma discussão sobre as perspectivas futuras para desenvolver estratégias farmacológicas eficazes dirigidas a esses alvos (TANAKA *et al.*, 2017). Tudo tendo como base a relação existente entre o eixo fígado-cérebro-intestino.

Com relação a esse eixo, estudos ressaltam a importância da microbiota intestinal nos mecanismos de progressão dessa doença e, portanto, sinalizam que a microbiota seja mais um alvo nas estratégias de tratamento da doença. Nesse sentido, algumas intervenções como o consumo de alimentos fontes de fibras, amido resistente, prebióticos e uso de probióticos entre outros, vêm sendo considerados como parte da terapêutica no espectro das condutas dietéticas

a serem adotadas para pacientes com DHGNA (DOLBERIS *et al.*, 2017; BASHIARDES, 2016).

2.4.2.1 DHGNA e vitamina D

A presença de deficiências nutricionais é frequente principalmente no quadro de obesidade (RAMALHO, 2009). A DVD merece destaque nesse sentido, pois guarda relação não só com a obesidade como também com a progressão da DHGNA (GONZALEZ-MOLERO *et al.*, 2013), cuja prevalência em pacientes obesos graves excede os 90% (CHALASANI *et al.*, 2012; PRAVEENRA *et al.*, 2007).

Gonzalez-Molero et al. (2013) em estudo realizado com pacientes com obesidade classe III confirmaram que DVD parece ser fator de risco para obesidade. Os indivíduos com obesidade, inclusive os que apresentam doenças hepáticas são mais susceptíveis à deficiência e à insuficiência de vitamina D. No estudo de Eraslan et al. (2013) isso pode ser explicado, uma vez que, a nível hepático, há uma alteração na síntese de 25(OH)D pela presença de EH, frequente nesses indivíduos.

Em se tratando dos indivíduos com obesidade grave ou classe III esses são os que mais apresentam maior inadequação da vitamina D, e isso pode ser devido a exposição solar limitada, resultante de alterações no estilo de vida, que incluem uso de roupas mais fechadas, perda da mobilidade e redução do nível de atividades ao ar livre. As concentrações séricas de 25(OH)D variam inversamente em relação ao IMC, esse fato é atribuído à lipossolubilidade desse hormônio e sua biodistribuição no tecido adiposo (WIMALAWANSA, 2016; CHESNEY, 2012).

Apesar da relação entre a DHGNA e a vitamina D não está totalmente esclarecida, em ensaio clínico realizado com pacientes adultos, foi mostrado que a vitamina D desempenhou um papel importante na regulação de estresse oxidativo, reduzindo os marcadores de inflamação hepática (SHARIFI *et al.*, 2014), e em estudos com animais (ROTH *et al.*, 2012) através da produção de citocinas pró-inflamatórias. Outros estudos também experimentais já demonstraram o papel importante da vitamina D na fibrose hepática (POTTER *et al.*, 2013).

Em um estudo recente (LI *et al.*, 2017) a 1,25(OH)D3 vitamina foi utilizada de forma eficiente na terapêutica contra esteato-hepatite induzida por autofagia em camundongos que foram alimentados com uma dieta hiperlipídica por 4 semanas. Houve redução dos marcadores de inflamação e do metabolismo lipídico no fígado gorduroso dos camundongos avaliados. Os autores sugerem que o mecanismo de proteção observado, seja explicado pelo papel

imunomodulador e regulador da vitamina D nas vias da homeostase intracelular em respostas a diferentes fatores de estresse oxidativo.

Rubén Díez Rodríguez et al. (2014) avaliaram a biópsia hepática de 110 pacientes submetidos à cirurgia bariátrica, um dos objetivos era analisar a relação da histologia hepática com vitamina D e marcadores renovação óssea (PTH, osteocalcina e colagénio carboxi-terminal de ligação cruzada). Foi observado que apesar de 70% dos pacientes terem apresentados baixas concentrações de vitamina D ou hiperparatiroidismo secundário, nenhum dos componentes da histologia hepática foi associado com a vitamina D ou com os parâmetros do metabolismo ósseo. Assim, neste estudo não se evidenciou essa relação da vitamina D com a DHGNA.

Uma meta-análise observou que os pacientes com DHGNA apresentaram 1,26 vezes mais probabilidade de serem deficientes em vitamina D (IC 95%: 1,17-1,35). Contudo, em 14 estudos analisados não encontraram associação entre os níveis de vitamina D e a progressão da DHGNA. (LI *et al.*, 2013; KATZ *et al.*, 2010). E apenas em quatro dos dezessete estudos incluídos nessa meta-análise, a DHGNA foi diagnosticada por biópsia hepática, ou seja, isso pode ter influenciado os resultados em razão da forma como se avaliou o grau de estadiamento da doença.

Recentemente, outra revisão e meta-análise reuniu 6 estudos, totalizando 974 pacientes com DHGNA. E notou que não houve diferença entre os níveis de 25(OH)D quando comparado com os graus de gravidade histológica da DHGNA avaliado por escores de fibrose (NAS). Concluindo, que não há qualquer relação, entre as concentrações de 25(OH)D com o grau de estadiamento da DHGNA (JARUVONGVANICH *et al.*, 2017).

É indiscutível os avanços no campo da pesquisa, especialmente em relação ao papel da vitamina D em diversos tecidos, dentre esses, o fígado. Contudo, em virtude das informações disponíveis até o momento, outras investigações são necessárias para fornecer mais informações sobre novos mecanismos na fisiopatologia DHGNA, quando associada a deficiência de vitamina D.

2.4.2.2 O Fenótipo OMS e DHGNA

A obesidade e a DHGNA possuem forte correlação como descrito anteriormente. Nos últimos anos, crescem o número de evidências que investigam a associação do fenótipo da OMS com a DHGNA.

Chang et al. (2016) observaram em estudo retrospectivo que a incidência da DHGNA se associou positivamente com o IMC, evidenciando a sua forte relação com a obesidade e que

o fenótipo OMS, independentemente de anormalidades metabólicas, pode aumentar o risco de DHGNA. Um estudo transversal, que reuniu 1040 pacientes com DHGNA, e incluiu 428 desses pacientes na pesquisa avaliou a presença de fibrose hepática entre OMS e OMNS e observaram que os OMS apresentaram prevalência (16,25%) significativamente menor de fibrose hepática avançada que os OMNS (28%) (GUTIÉRREZ-GROBE *et al.*, 2017).

Min-Kyung et al. (2015) em estudo prospectivo, observaram que o risco de desenvolvimento de DHGNA foi mais elevado (OR, 2,862) em indivíduos que eram metabolicamente não saudáveis (MNS), tanto no início do estudo como após 4 anos de segmento, em comparação com indivíduos que se mantiveram metabolicamente saudáveis (MS) durante o período de acompanhamento, estudando o grupo dos indivíduos com sobrepeso MS como referência, a razão de chance (OR) para desenvolver a doença foi (1,731) para os OMS, (1,877) para aqueles com sobrepeso MNS e (2,501) para os OMNS. E concluíram que o risco de desenvolver DHGNA foi menor para os OMS que em indivíduos OMNS.

Recentemente, em estudo de coorte retrospectivo, reuniu 14.093 japoneses (7557 homens e 6736 mulheres) e, incluiu indivíduos com sobrepeso e obesidade, considerando quatro fatores metabólicos (diminuição da glicemia de jejum, hipertensão arterial sistêmica, hipertrigliceridemia e baixa concentração de lipoproteína-colesterol de alta densidade (HDLc) para a definição do fenótipo OMS (menos de dois fatores) ou metabolicamente não saudáveis (MNS) (dois ou mais). Foram divididos em: sobrepeso MNS (9755 indivíduos), sobrepeso MS (2547 indivíduos) e OMS (1791 indivíduos), a DHGNA foi diagnosticada por ultrassonografia de abdômen. E os achados mostraram que a EH teve um impacto clínico na progressão do sobrepeso metabolicamente saudável para metabolicamente não saudável (HASHIMOTO *et al.*, 2017).

No entanto, apesar de algumas evidências sugerirem que o fenótipo MS se comporte de maneira diferente em relação às variáveis metabólicas importantes para progressão da DHGNA, possivelmente protegendo de graves alterações aqueles considerados como OMS, alguns mecanismos não estão esclarecidos, e, portanto, mais estudos são necessários para elucidar os questionamentos que permanecem.

3. JUSTIFICATIVA

Considerando o aumento progressivo da prevalência de obesidade (classe III) em adultos, sua importância clínica frente às complicações ósseo-metabólicas e ao agravamento da DHGNA, parece importante, investigar se esses indivíduos classificados em OMS poderiam estar mais protegidos dessas complicações.

Até o momento, há escassez de estudos com propósito de avaliar um conjunto de marcadores do metabolismo ósseo e sua relação com outras variáveis bioquímicas (incluindo as relacionadas a função e lesão hepática) e indicadores antropométricos em adultos com diagnóstico de obesidade classe III, classificados pelos fenótipos OMS e OMNS que cursem com DHGNA em seus diferentes graus de estadiamento.

4. PERGUNTA DO ESTUDO E HIPÓTESES

4.1 Pergunta

O fenótipo OMS atua como fator de proteção para alterações nas concentrações plasmáticas de marcadores do metabolismo ósseo e enzimas hepáticas, de acordo com grau de estadiamento da DHGNA em adultos obesos classe III?

4.2 Hipóteses

Hipótese Nula (H0): O fenótipo OMS não protege de alterações nas concentrações plasmáticas de marcadores do metabolismo ósseo e enzimas hepáticas, de acordo com grau de estadiamento da DHGNA em adultos obesos classe III.

Hipótese Alternativa (H1): O fenótipo OMS protege de alterações nas concentrações plasmáticas de marcadores do metabolismo ósseo e enzimas hepáticas, de acordo com grau de estadiamento da DHGNA em adultos obesos classe III

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

- Avaliar os marcadores de metabolismo ósseo e as enzimas hepáticas em adultos com obesidade classe III, classificados segundo os fenótipos OMS e OMNS.

5.2 Objetivos específicos

- Classificar adultos com obesidade classe III de acordo com os fenótipos OMS e OMNS usando o critério preconizado pelo NCEP ATPIII
- Caracterizar as variáveis clínica, bioquímica e antropométrica em adultos com obesidade classe III, de acordo com os fenótipos OMS e OMNS
- Comparar as principais alterações plasmáticas e *status* nutricional dos marcadores de metabolismo ósseo em adultos com obesidade classe III de acordo com os fenótipos OMS e OMNS.
- Determinar a razão de chance para alteração dos marcadores ósseos de acordo com os fenótipos OMS e OMNS
- Correlacionar os marcadores de metabolismo ósseo com IMC, VAI, HOMA-IR, PCR e leptina sérica segundo os fenótipos OMS e OMNS
- Analisar a relação entre marcadores de metabolismo ósseo e enzimas hepáticas (prova de função e lesão hepática) considerando diferentes graus de estadiamento da DHGNA, segundo os fenótipos OMS e OMNS

6. CASUÍSTICA E MÉTODOS

6.1 Desenho do estudo

Trata-se de estudo descritivo, observacional do tipo transversal. É uma parte do projeto mais amplo intitulado “Avaliação do estado nutricional de micronutrientes em indivíduos com obesidade grave submetidos à Gastroplastia Redutora em Y de *Roux*”, sob a responsabilidade do Núcleo de Pesquisa em Micronutrientes - NPqM, do Instituto de Nutrição Josué de Castro - INJC da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ.

A amostra estudada composta de adultos com diagnóstico de obesidade grave (Classe III), no período pré-operatório foi obtida por conveniência e a sub-amostra com dados de biópsia hepática, no período pós-operatório, por amostragem sistemática. A coleta de dados ocorreu no período de novembro de 2014 a julho de 2016, no Centro Multidisciplinar de Cirurgia Bariátrica e Metabólica (CMCBM) no município do Rio de Janeiro – RJ.

Para classificação do fenótipo da obesidade metabolicamente saudável (OMS), o critério utilizado foi o proposto pelo *Third Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults* (NCEP ATPIII) (GRUNDY *et al.*, 2004). Foi considerado como obeso metabolicamente não saudável (OMNS) aqueles que apresentavam alterados ≥ 3 dos 5 critérios seguintes: (1) perímetro da cintura (PC) $> 102\text{cm}$ para homens e $> 88\text{cm}$ para mulheres; (2) glicemia de jejum $\geq 100\text{ mg/dL}$; (3) triglicerídeos em jejum $\geq 150\text{ mg/dL}$; (4) High Density Lipoprotein (HDL) $< 40\text{mg/dL}$ para homem s e $< 50\text{mg/dL}$ para mulheres; e (5) Pressão Arterial $\geq 130/\geq 85\text{ mmHg}$.

6.1.1 Critérios de inclusão e exclusão

O estudo investigou indivíduos adultos de ambos os sexos com IMC $\geq 40\text{ kg/m}^2$ (diagnosticados com obesidade classe III) e idade ≥ 20 e < 60 anos. Os critérios de exclusão foram: gravidez ou lactação, história e / ou presença de doença renal crônica (definida pela taxa de filtração glomerular estimada (TFG) $< 60\text{ mL / min / 1,73 m}^2$), doenças hepáticas (exceto doença hepática gordurosa não alcoólica) (NAFLD), síndrome do cólon irritável, cirurgias restritivas e disabsortivas prévias, neoplasias, ingestão alcoólica superior a 20g / dia para mulheres e 40g / dia para homens, uso de suplementos multivitamínicos e minerais.

6.2 Questões éticas

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (Anexo 1), sob parecer n. 011/06-CEP. A inclusão dos pacientes elegíveis ao projeto foi realizada mediante autorização formal, por meio de assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 2). Todos os pacientes, no momento da consulta com a nutricionista/pesquisadora do CMCBM, foram informados sobre os objetivos, procedimentos do projeto, incluindo riscos e benefícios de acordo com a Resolução nº 196 do Conselho Nacional de Saúde, legislação vigente da aprovação do projeto. Na ocasião foi esclarecido aos pacientes que seus prontuários poderiam ser selecionados para estudo posteriormente, porém só seriam utilizados caso houvesse autorização por meio da assinatura do TCLE e essa não seria obrigatória.

6.3 Coleta de dados e Métodos

A coleta de dados, na primeira etapa foi realizada com auxílio de formulário (Anexo 3), previamente testado e desenvolvido para o estudo, preenchido por um único entrevistador (nutricionista/pesquisadora) no momento da consulta nutricional ocorrida no CMCBM. Todas as informações coletadas foram inseridas nos prontuários dos pacientes. O segundo momento, ocorreu, quando a pesquisadora do NPQM/ UFRJ consultou e selecionou o banco de dados com os prontuários dos pacientes do CMCBM elegíveis para seu estudo.

Os sujeitos que compunham a amostra foram submetidos às avaliações clínica, antropométrica e bioquímica, além de terem respondido questões relacionadas aos seus hábitos de prática de atividade física e exposição solar. Todas as análises foram realizadas de acordo com os métodos a seguir.

6.3.1 Avaliação Clínica

As variáveis clínicas consideradas foram aquelas determinadas pelas frequências da DHGNA e hipertensão arterial sistêmica (HAS) da amostra estudada.

O protocolo adotado para medida de pressão arterial (PA) seguiu as recomendações internacionais, tendo que estar o sujeito de bexiga vazia, não cruzar as pernas, não fumar uma hora antes das medidas e não conversar no momento da aferição. Realizou-se a medida da PA por método indireto sendo utilizados tensiômetros portáteis (marca OMRON HEM 705 CP),

com braçadeiras adequadas à medida da circunferência braquial do paciente, com alcance de 0 a 300 mmHg e precisão de ± 3 mmHg.

Todas exigências técnicas para adequada obtenção da PA, bem como a definição do ponto de corte igual ou acima de 130/85 mmHg já considerado pré-hipertenso, seguiram o critério NCEP ATP III (GRUNDY et al., 2004), obedecendo também às especificações das VII Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial – (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA – SBC, 2016). O diagnóstico de HAS foi realizado por um médico especializado durante as consultas pré-cirurgia.

O diagnóstico de DHGNA foi determinado por uma ultrassonografia abdominal completa, conduzida por um único médico com experiência em diagnóstico por imagem, seguindo a metodologia proposta por Pratt & Kaplan (2002) usando uma unidade C display, Philips® 2-5 MHz Convex transdutor (Barueri, São Paulo, Brasil). E por meio de biópsia hepática realizada por laparoscopia no momento da cirurgia bariátrica.

A avaliação histológica, referente a biópsia hepática, foi realizada pela retirada de 4 mm de espessura do lobo esquerdo do fígado por punção usando com agulha Menghini de 16G x 15 cm (Euromed, Minas Gerais, Brasil). As avaliações histológicas globais foram realizadas pelo mesmo patologista, que não teve conhecimento dos dados bioquímicos e clínicos dos pacientes, pela coloração de partes por hematoxilina-eosina, tricromo de Masson e mancha azul prusiana de Perls (Interlab, São Paulo, Brasil). O hematoxilina-eosina permite visualizar de forma geral a arquitetura acinar, infiltrados inflamatórios e alterações em hepatócitos. O Masson verifica a presença de fibrose, seja portal, peri-sinusoidal ou ao redor de veias centrolobulares. Já o Perl's verifica a presença de depósitos de ferro (BRUNT et al., 1999).

A classificação da DHGNA e o estadiamento da fibrose hepática foram estabelecidos de acordo com a proposta de Brunt et al. (1999). A classificação (Quadro 1) foi realizada considerando a presença de esteatose macro-vesicular (esteatose simples) e atividade necro-inflamatória (presença de EHNA). O estadiamento da fibrose foi realizado em indivíduos com EHNA, conforme Quadro 2.

Quadro 1. Classificação da Doença Hepática Gordurosa Não Alcóolica (DHGNA).

Classificação da DHGNA	
Esteatose macro-vesicular	Grau 0: sem esteatose;
	Grau 1 (leve): <33% de acumulação de gordura em hepatócitos;
	Grau 2 (moderado): entre 33% e 66% dos hepatócitos afetados;
	Grau 3 (grave): > 66% dos hepatócitos afetados.
Atividade necroinflamatória (EHNA)	Grau 0: sem esteatose;
	Grau 1 (leve)
	Grau 2 (moderado)
	Grau 3 (grave)

Fonte: BRUNT *et al.*, (1999).

Quadro 2. Estadiamento da Esteatose hepática gordurosa não alcóolica (EHGNA).

Estadiamento da EHGNA	
Fibrose hepática	Estágio 0: sem esteatose;
	Estágio 1: presença de fibrose pericelular ou perisinusoidal na Zona 3, focal ou extensa;
	Estágio 2: presença de fibrose pericelular ou perisinusoidal na Zona 3 associada à presença de fibrose periportal focal ou extensa;
	Estágio 3: presença de fibrose pericelular ou perisinusoidal na Zona 3 e pontes fibróticas focais ou extensas;
	Estágio 4: cirrose.

Fonte: BRUNT et al. (1999).

6.3.2 Avaliação antropometria e da prática de atividade física

A avaliação antropométrica foi realizada por avaliador único (Nutricionista), durante a consulta de rotina, pré-cirurgia bariátrica dos pacientes. E, incluiu a medida de massa corporal (Kg) e altura (cm) para cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC) de acordo com WHO (2000), o perímetro da cintura (PC), mensurado com base em Lohman et al. (1988), com pontos de cortes segundo NCEP ATP III (GRUNDY et al., 2004) e o índice de adiposidade visceral (VAI, *Visceral Adiposity Index*), que além de dados antropométricos, considera variáveis bioquímicas, sendo estimado de acordo com Amato et al. (2010). Todas as mensurações foram realizadas em duplicata, com variações aceitas até 0.5 cm (para PC e altura) e média calculada.

A altura (usando um estadiômetro Sany®) e o peso (usando uma balança eletrônica da plataforma Welmy® com capacidade máxima de pesagem de 300 kg) foram medidos com os participantes em pé, sem sapatos e roupas externas pesadas. O IMC foi calculado com o peso dividido pela altura ao quadrado (Kg/m^2). O ponto de corte adotado para classificação da obesidade classe III foi $\geq 40\text{kg}/\text{m}^2$, segundo WHO (2000).

A medida do diâmetro do PC foi mensurada com auxílio de uma fita antropométrica inelástica (marca Sanny®), com o paciente em pé, o abdômen relaxado, os braços ao lado do corpo e os pés juntos, sem vestimentas externas pesadas e bolsos vazios, expirando suavemente. A fita circundou o indivíduo no maior diâmetro abdominal. A medida foi realizada no final da expiração normal do indivíduo conforme descrito por Lohman et al. (1988). Foram utilizados como pontos de corte as recomendações do NCEP-ATP III (GRUNDY et al., 2004), conforme quadro 3.

Quadro 3. Risco de complicações metabólicas associadas à obesidade, de acordo com o perímetro da cintura, NCEP-ATPIII (2004).

Gênero	Recomendações PC (cm)
Homem	> 102cm para homens
Mulher	> 88cm para mulheres

Fonte: GRUNDY et al., (2004).

Para avaliar a distribuição de gordura corporal dos indivíduos com obesidade classe III, foi selecionado o Índice de Adiposidade Visceral (*Visceral Adiposity Index - VAI*), que é

um modelo matemático empírico, específico de gênero, baseado em dados antropométricos simples (IMC e PC) e parâmetros bioquímicos (TG e HDL-c) e é indicativo de distribuição e função da gordura relacionadas ao risco cardiometabólico.

Foram utilizadas às formulas para os sexos masculinos e femininos (Figura 6) proposta por Amato et al. (2010).

$$\text{Females: VAI} = \left(\frac{\text{WC}}{36.58 + (1.89 \times \text{BMI})} \right) \times \left(\frac{\text{TG}}{0.81} \right) \times \left(\frac{1.52}{\text{HDL}} \right),$$

$$\text{Males: VAI} = \left(\frac{\text{WC}}{39.68 + (1.88 \times \text{BMI})} \right) \times \left(\frac{\text{TG}}{1.03} \right) \times \left(\frac{1.31}{\text{HDL}} \right),$$

Figura 3. Fórmula do Visceral Adiposity Index (VAI) segundo gênero

Fonte: AMATO et al. (2010).

A atividade física foi avaliada por meio do Questionário Internacional de Atividade Física (IPAQ, *International Physical Activity Questionnaire*) (Anexo 4) em sua versão curta, segundo Craig et al. (2003), classificando os voluntários em sedentários, insuficientemente inativos, ativos ou muito ativos.

6.3.3 Avaliação laboratorial

Para avaliação das variáveis bioquímica, um total de 5 ml de amostras de sangue foi obtido por punção venosa após 12 horas de jejum para determinação de perfil glicídico (glicemia de jejum e insulina basal), de perfil lipídico (colesterol total, triglicerídeos, HDL-c e LDL-c), prova de função e lesão hepática (albumina, AST, ALT, GGT e FA), marcadores do metabolismo ósseo [PTH, FA, Vitamina D (25OHD), Cálcio iônico e Fósforo sérico, Magnésio sérico, Potássio sérico e Zinco] e marcadores de inflamação (PCR e Leptina). Todas as análises foram realizadas em laboratórios de análises clínicas com certificação e convênio com CMCBM, parceiro do NPqM/UFRJ.

Nos quadros 4 e 5 estão descritos os principais parâmetros bioquímicos analisados com seus pontos de corte e metodologia respectivamente.

Quadro 4. Parâmetros de normalidades dos principais exames laboratoriais

Parâmetros	Ponto de corte	Método	Referência
Perfil Glicídico			
Glicemia em jejum	≥100 mg/dL	Enzimático	NCEP ATPIII Grundy et al., (2004)
Insulina Basal	24,9 UI/mL	FR-CLAE	-
Perfil Lipídico			
Colesterol Total	< 190 mg/dL	Enzimático colorimétrico	SBC (2016)
Triglicerídeos	≥150 mg/dL	Enzimático colorimétrico	NCEP ATPIII Grundy et al., (2004)
Lipoproteína de Alta Densidade (HDL-c)	< 40mg/dL para homens < 50mg/dL para mulheres	Método de inibição seletiva	
Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL-c)	< 100 mg/dL	Método de inibição seletiva	SBC (2016)
Provas de Função e Lesão Hepática			
Albumina	3,5-5,0 g/dL	Colorimétrico	Bahia (2014)
Aspartato Aminotransferase (AST) ou TGO	< 40 U/L	Cinético UV	
Alanina Aminotransferase (ALT) ou TGP	< 41 U/L	Cinético UV	
Gama Glutamil Transpeptidase (GGT)	5-60 U/L	Enzimático colorimétrico	

FR-CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa;

- Foram adotados os pontos de cortes do laboratório que realizou as análises;

A RI foi estimada pela fórmula de avaliação do Modelo de Homeostase-Resistência à Insulina (HOMA-IR) (MATTHEWS *et al.*, 1985), pelo cálculo: HOMA-IR = insulinemia de jejum (mU/L) x glicemia de jejum (mmol/L)/ 22,5. O ponto de corte foi $\geq 2,5$ (DURWARD *et al.*, 2012).

A proteína C-reativa (PCR) foi quantificada pelo método nefelométrico, com ponto de corte $> 0,3$ mg/dL para determinar inflamação. As concentrações (mg/L) foram calculadas a partir de uma curva elaborada com um soro padrão, testado em diferentes diluições (PEARSON *et al.*, 2003).

A análise das concentrações séricas de leptina foi feita a partir do método ELISA, de maneira duplicata, em equipamento BRIO (*Basic Robotic Immuno Assay Operator*), sendo as amostras de soro descongeladas à temperatura ambiente do laboratório (19º a 23ºC).

Quadro 5 – Parâmetros de normalidades dos marcadores do metabolismo ósseo

Parâmetros	Ponto de corte	Método	Referência
25(OH)D	≤ 20 ng/mL (deficiência), ≥ 20 ng/mL e < 29 ng/mL (insuficiência) ≥ 30 ng/mL e < 100 ng/mL (adequado)	HPLC-UV	Hossein-Nezhad & Holick (2013)
Cálcio iônico	$< 1,0$ mmol/L ou < 4 mg/dL Adequado: 1,0 a 1,4 mmol/L ou 4 a 5,6 mg/dL	Dosagem direta por eletrodo seletivo	WHO, (1996)
Fósforo sérico	$< 2,5$ mg/dL Adequado: 2,7 a 4,5 mg/dL	método calorimétrico	Daly; Ertlingshausen, (1972)
Magnésio sérico	$< 1,7$ mg/dL Adequado: 1,8 a 2,3 mg/dL	método calorimétrico	Lowenstein; Stanton, (1974)
Potássio sérico	$< 2,7$ mEq/ dL	HPLC-UV	WHO, (1996)

	Adequado: 2,7 a 4,5 mEq/dL		
Zinco sérico	< 70 mcg/dL Adequado: 70 a 150 mcg/dL	método calorimétrico	Iyengar; Woittiez, (1988)
Vitamina B12 sérica	< 271 pg/mL	HPLC-UV	Carmel et al. (2003) Lindgren et al. (1999) Snow, (1999)
PTH	Hiperparatireoidismo secundários: > 53,0 pg/mL Ou < 130,0 U/L	Imunoenzimático por quimioluminescência	Kao, (1982)
FA	< 130,0 U/L Adequado: Adultos (40 a 130 U/L)	Cinético enzimático colorimétrico	Bramer et al. (2005)

HPLC – UV: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector Ultravioleta

6.4 Exposição Solar

Para a complementação da avaliação do estado nutricional de vitamina D, foi realizada pesquisa de exposição solar dos pacientes integrantes do estudo, mediante a aplicação de protocolo validado por Hanwell *et al.* (2010). Este protocolo avalia tempo e frequência de exposição ao sol e as partes do corpo expostas permitindo, assim, a obtenção de pontuação que permita quantificar esta exposição solar. Foi perguntado se estes pacientes têm hábito de uso do protetor solar (Anexo 5). Como os pacientes foram acompanhados durante o período de um ano, a influência das estações do ano não representaram um viés para as análises.

6.5 Análises estatísticas

Para verificar a normalidade da amostra foi realizado o teste Kolmogorov-Smirnof. As variáveis contínuas, foram expressas em média e desvio-padrão. Variáveis categóricas foram comparadas utilizando o teste Qui-quadrado de Pearson. Parâmetros clínicos, bioquímicos, antropométricos, marcadores de metabolismo ósseo e de função e lesão hepática segundo os fenótipos OMS e OMNS foram comparados usando o teste *t Student*. Foram realizadas análises de variância de dois fatores (Two-way ANOVA) para comparar os marcadores de metabolismo ósseo (Vitamina D, cálcio, FA e PTH) e indicadores de função e lesão hepática (AST, ALT,

GGT e albumina), segundo os fenótipos OMS e OMNS e os graus de estadiamento da DHGNA. O teste de Tukey foi realizado para verificar a diferença entre os grupos estudados.

Para testar a homogeneidade das proporções entre variáveis categóricas foi aplicado o teste Qui-quadrado de Pearson, Teste exato de Fisher e para as variáveis contínuas foi utilizada a Correlação Linear de Pearson. Foi realizada análise de regressão logística múltipla para determinar *odds ratio* – OR (razão de chance) de marcadores de metabolismo ósseo alterados por fenótipos obesos metabolicamente saudável e obeso metabolicamente não saudável. Todos as análises estatísticas foram realizadas usando *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS, Chicago IL) para Windows versão 21,0. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seção de resultados e discussão está dividida em três artigos elaborados para esta tese de doutorado.

Artigo 1: *Clinic, Anthropometric and Metabolic Changes in Adults With Class III Obesity Classified as Metabolically Healthy and Metabolically Unhealthy*

(Alterações clínicas, antropométricas e metabólicas em adultos com Obesidade Classe III classificados como Metabolicamente Saudáveis e Não Saudáveis)

Artigo 2: *Does the Metabolically Healthy Obese Phenotype protect adults with class III obesity from biochemical alterations related to bone metabolism?*

(O Fenótipo Obeso Metabolicamente Saudável protege adultos com obesidade classe III de desenvolverem alterações bioquímicas relacionadas ao metabolismo ósseo?)

Artigo 3: *Relationship between the biomarkers of bone metabolism and hepatic enzymes according to the stage of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and the Metabolically Healthy Obesity Phenotype*

(Relação entre biomarcadores do metabolismo ósseo e enzimas hepática segundo o estadiamento da Doença Hepática Gordurosa Não Alcólica e o fenótipo da obesidade metabolicamente saudável)

7.1 Artigo 1

Loureiro, LM. et al. ***Clinic, Anthropometric and Metabolic Changes in Adults With Class III Obesity Classified as Metabolically Healthy and Metabolically Unhealthy***

Artigo submetido ao periódico *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy.*

(Anexo 6)

(Alterações clínicas, antropométricas e metabólicas em adultos com Obesidade Classe III classificados como Metabolicamente Saudáveis e Não Saudáveis)

7.1.1 Abstract

Purpose: To describe clinical, biochemical and anthropometric profiles in adults with class III obesity classified by obesity phenotypes. **Patients and methods:** This is a cross-sectional study with patients classified in MHO and MUHO according to the NCEP-ATP III. Anthropometric, biochemical and clinical variables were analyzed. **Results:** A total of 223 subjects were evaluated and 32.73% were classified as MHO and 67.26% as MUHO, respectively. The evaluation of the insulin resistance homeostasis model (HOMA-IR) showed elevation in the MUHO group ($p = 0.003$). There were no significant differences regarding age, body mass index (BMI), C-reactive protein (CRP), calcium and phosphorus between groups. In the MUHO group, the anthropometric variables were correlated with the bone markers (BMI vs Phosphorus: $r = 0.31, p < 0.001$; BMI vs 25(OH)D: $r = -0.31, p = 0.041$). The visceral adiposity index was lower in MHO ($p = 0.001$). Negative correlations between inflammatory markers and bone markers were observed in the MHO group (Calcium vs. hs-CRP: $-0.30, p = 0.017$; parathyroid hormone vs. HOMA-IR: $r = -0.28, p = 0.017$). **Conclusion:** MHO individuals present important metabolic alterations, such as those observed in MUHO, although with lower prevalence and severity. Continuous monitoring of these individuals is suggested, given the transient nature of the MHO phenotype.

Keywords: obese; phenotype; bone markers; inflammatory markers.

7.1.2 Introduction

The prevalence of overweight and obesity continues to increase exponentially around the world¹, so that the severe obesity classified as class III obesity has become the most prominent in recent years.² It has been well established that excessive body fat increases the risk of development of Metabolic Syndrome (MS), which includes abdominal adiposity, dyslipidemia, hyperglycemia, hypertension, insulin resistance, as well as increased inflammatory status.³ Other comorbidities, mainly characterized by hepatic⁴ and bone metabolism impairments⁵ have been more recurrent, among those individuals with severe obesity.⁶⁻⁹ They are favored not only by the inflammatory profile of obesity but also by nutritional deficits¹⁰, especially related to micronutrients (such as vitamin D, calcium, phosphorus and others)^{11,12}, hyperleptinemia^{13,14}, increased release of inflammatory cytokines¹⁵, of C-reactive protein (CRP) secretion¹⁶ by changes in markers such as parathyroid hormone (PTH), alkaline phosphatase (AP)¹⁷⁻¹⁹ and liver enzymes.²⁰

However, it has been shown that there are individuals with obesity who appear to be more protected from these metabolic changes since they present the metabolically healthy obesity phenotype (MHO). Although presenting excess body fat, such individuals have a less compromised metabolic profile than those classified into the metabolically unhealthy obesity phenotype (MUHO).²¹

Researches which focus on the characterization of the clinical, biochemical and metabolic profiles of individuals with class III obesity and include the MHO phenotype, are still scarce. Most studies to date have investigated only other classes of obesity.^{15,22-24} The existence of the MHO phenotype has become increasingly recognized.²⁵ The prevalence of this phenotype varies significantly between studies, from 10 to 40% in the adult population.²⁵ The lack of harmonization in the criteria for defining the obesity phenotype plays an important role in the discrepancies observed between the studies.²⁶ However, the healthy condition of the MHO phenotype has been widely debated, and studies have reported controversial and conflicting results.²⁷ A meta-analysis has shown that it is not clear that adults with MHO are at increased risk of all-cause mortality²⁸, but they still present risks for the development of Type 2 Diabetes Mellitus (DM2) and cardiovascular diseases (CVDs).^{27,29} Interestingly, the MHO phenotype can be modified since several studies, with up to 10 years of follow-up, showed that 43.3% to 47.6% of subjects with MHO transitioned to the MUHO phenotype.³⁰⁻³² In view of the need for further studies that evaluate the different profiles in the obesity phenotypes (MHO and MUHO), especially in their most severe stages, the objective of the present study was to

describe the difference between clinical, biochemical and anthropometric profiles in adults with class III obesity classified by both phenotypes, with the aim of identifying possible differences that may support more assertive intervention strategies for these individuals in a clinical practice.

7.1.3 Material and methods

7.1.3.1 Study design and population

This is a descriptive, cross-sectional study with a convenience sample including adults with class III obesity³⁴, attended at the Multidisciplinary Center for Bariatric and Metabolic Surgery (MCBMS) in Rio de Janeiro – RJ, Brazil. Data collection occurred from November 2014 to July 2016.

Adults of both genders were included, mean age ≥ 20 and < 60 years and body mass index (BMI) ≥ 40 kg/m² (diagnosed with class III obesity). Exclusion criteria were as follow: pregnancy or lactation, history and/or presence of chronic kidney diseases (defined by estimated glomerular filtration rate (GFR) < 60 mL/min/1.73m²)³⁵, liver diseases (except non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)), acute or chronic infections, elevated serum calcium levels, irritable bowel syndrome, previous restrictive and disabsorptive surgeries, neoplasias, diagnosis of endocrinopathies (hyperparathyroidism, hypothyroidism, hypercortisolemia), alcohol intake exceeding 20g/day for women and 40g/day for men, use of multivitamin and mineral supplements. This study was approved by the Research Ethics Committee of *Hospital Universitário Clementino Fraga Filho* (HUCFF) of the *Universidade Federal do Rio de Janeiro* (UFRJ) (Federal University of Rio de Janeiro) under the Scientific Advice in accordance with Resolution nº 196 of the National Health Council (Research Protocol number 011/06-CEP). Inclusion of patients in the project was carried out through their formal authorization with the signing of the Informed Consent Form.

7.1.3.2 Definition of the obesity phenotypes: MHO and MUHO

For classification of the obesity phenotypes, the criterion used was proposed by the Third Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (NCEP-ATP III).³⁶ The subjects who showed alterations in ≥ 3 of the following 5 criteria were considered metabolically

unhealthy obese (MUHO): (1) waist circumference (WC) >102cm for men and >88cm for women; (2) fasting glucose ≥ 100 mg/dL; (3) fasting triglycerides ≥ 150 mg/dL; (4) High Density Lipoprotein (HDL) <40mg/dL for men and <50mg/dL for women; and (5) Blood Pressure $\geq 130/\geq 85$ mmHg. And the metabolically healthy obese (MHO) phenotype was defined as obesity without metabolic syndrome (i.e. BMI ≥ 40 kg/m² and presence of 2 components of metabolic syndrome).

7.1.3.3 Assessment of body variables and physical activity

Height (using a Sany stadiometer) and weight (using a Welmy electronic platform scale with maximum weighing capacity of 300 kg) were measured with the participants standing without shoes and heavy outer garments. BMI was calculated as weight divided by height squared (Kg/m²), according to the World Health Organization (WHO).³⁴ Waist circumference (WC) was measured based on Lohman et al³⁷ with cutoff points according to the NCEP-ATP III.³⁶ The measurement of the diameter (cm) of the waist circumference (WC) was performed with the patient standing straight, abdomen relaxed, arms beside the body and feet together without heavy outer garments and with emptied pockets, breathing out gently. To complement the nutritional diagnosis of individuals with obesity, one body indicator was selected, the visceral adiposity index (VAI), which is an empirical mathematical model, gender-specific, based on simple anthropometric data (BMI and WC) and biochemical parameters (TG, LDL-c and HDL-c), indicative of fat distribution and function, and was calculated according to Amato.³⁸ All measurements were performed in duplicate by a single trained observer and variations up to 0.5 cm were accepted and mean was calculated. Physical activity was evaluated through the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) in its short version.³⁹

7.1.3.4 Clinical assessments

The clinical variables considered by the study were those determined from the frequencies of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and systemic hypertension (SH). Data on NAFLD and SH were obtained through the medical records of the patients. The diagnosis of NAFLD was determined by a complete abdominal ultrasound (CAU), conducted by a single physician with expertise on imaging diagnosis, following the methodology proposed by Pratt & Kaplan⁴⁰ using a unit C display, Philips® 2-5 MHz Convex transducer (Barueri, São Paulo, Brazil). SH was diagnosed by a professional expert, following the methodology proposed by

the VII Brazilian Guidelines of Systemic Hypertension (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA – SBC, 2016).⁴¹

7.1.3.5 Evaluation of circulating biochemical and metabolic parameters

For biochemical and metabolic evaluation, a total of 5 ml blood sample was obtained via venipuncture after 12 hours of fasting for biochemical evaluations to determine glucose and basal insulin, lipid profile and inflammatory profile. The overall analyses were performed in laboratory with certifications, in partnership with the Center for Research in Micronutrients of the Institute of Nutrition of the UFRJ and the MCBMS.

Laboratory tests were conducted in the serum to characterize the lipid profile (total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c) and triglycerides), to evaluate glucose, insulin, high-sensitivity and the inflammatory profile of the sample.

The serum concentrations of total cholesterol and triglycerides were analyzed by the enzymatic colorimetric method (Labtest Diagnóstica S.A., Minas Gerais, Brazil), and the Low-Density Lipoprotein Cholesterol (LDL-c) and High-Density Lipoprotein Cholesterol (HDL-c) fractions were obtained by the selective inhibition method. LDL-c fraction was calculated in accordance with the Friedewald's formula.⁴² Blood glucose was obtained by the enzymatic colorimetric method (Labtest Diagnóstica S.A., Minas Gerais, Brazil). Basal insulin was quantified by reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) and the cutoff point adopted was 24.9 IU/mL. The cutoff points for total cholesterol and fractions, triglycerides and fasting glucose were those established by the NCEP-ATP III criteria.³⁶

The evaluation of the inflammatory markers of the subjects included: insulin resistance (IR), serum c-reactive protein and leptin levels. Insulin resistance was estimated by the formula of the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) as follows: fasting insulin (μ IU/ml) x fasting glucose (mg/dL)/405⁴³, with ≥ 2.5 cutoff point.⁴⁴

High-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) was quantified by the nephelometric method and the cutoff point to determine inflammation was >0.3 mg/dL⁴⁵, analyzed using the Tina-quant® C-reactive protein latex ultrasensitive assay (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, German). Leptin measurement was quantified using commercially available ultrasensitive ELISA kits according to the manufacturer's recommendations (Abcam, Cambridge, MA, USA).

The bone metabolism markers selected for study were: parathyroid hormone, alkaline phosphatase, 25(OH)D, calcium and phosphorus. Parathyroid hormone (PTH) was analyzed by the immunoenzymatic method by chemiluminescence⁴⁶ and serum alkaline phosphatase (AP) by the kinetic colorimetric enzymatic method⁴⁷, both with cutoff points for inadequacy >53.0 pg/mL (secondary hyperparathyroidism) and <130.0 U/L, respectively. The serum concentration of 25(OH)D was quantified by high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection method (HPLC-UV) (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil). The nutritional status of vitamin D was analyzed by the quantification of the serum concentrations of 25(OH)D, and cutoff points were ≤ 20 ng/mL (deficiency), ≥ 20 ng/mL and <29 ng/mL (insufficiency) and ≥ 30 ng/mL and <100 ng/mL (adequacy).⁴⁸ For complementing vitamin D evaluation, a study on the sun exposure of the participants was carried out by the application of a protocol validated by Hanwell et al.⁴⁹ Phosphorus was the serum mineral quantified by the calorimetric method, with the cutoff points respectively for inadequacy <2.5 mg/dL.⁵⁰ The nutritional status of calcium was determined by quantification of serum concentrations of ionic calcium by direct dosage by selective electrode and the cutoff point for inadequacy was <4 mg/dL.⁵¹

7.1.3.6 Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)⁵² for Windows version 21.0, IBM Corporation (Armonk NY, USA). To verify the normality of the sample, the Kolmogorov-Smirnov test was performed. Continuous variables were expressed as mean and standard deviation (SD). Clinical, biochemical, anthropometric parameters, bone metabolism and inflammatory markers, calculated according to the MHO and MUHO phenotypes, were compared using the Student's t-test. The Pearson's chi-square test was applied to assess the categorical variables according to the MHO and MUHO groups and that test was used to test the homogeneity of proportions among the categorical variables. The Pearson's Linear Correlation was used for the continuous variables. The significance level adopted was 5% ($p<0.05$).

7.1.4 Results

7.1.4.1 General characterization of the studied population

A total of 232 adults with obesity were recruited and were in the preoperative period of bariatric surgery. Of these, a total of 9 adults were excluded from the study because they did not meet any of the eligibility criteria, 2 were 60 years of age, 3 were diagnosed with class II obesity and the remainder, 4 because they had important information which could not be provided at the time of the consultation with the nutritionist for data collection. The sample comprised 223 adults, mostly sedentary (79.82%), diagnosed with class III obesity, 76.23% females and 23.77% males, mean age of 41.20 ± 10.15 years, and no statistical difference between genders was observed ($p=0.061$). SH, NAFLD and IR were present respectively in 70.40%, 97.58% and 76.23% of the studied sample. And in respect to the bone metabolism parameters studied, 97.31% showed inadequacy of AP, 83.86% vitamin D deficiency, 79.82% inadequacy of PTH, 26.46% calcium deficiency and 12.11% phosphorus deficiency. Sun exposure time (min) among the individuals with obesity was 13.2 ± 5.2 minutes/day, with reported use of sunscreen in 80% of the adults assessed, and no statistical difference was observed between them after their classification into MHO and MUHO phenotypes ($p=0.254$).

7.1.4.2 Characterization of the population according to the obesity phenotypes: MHO and MUHO

According to the classification of subjects, based on the NCEP-ATP III criteria, 32.73% were categorized as MHO and 67.26% as MUHO. Mean age between the MHO and MUHO groups was 38.86 ± 10.65 and 42.34 ± 9.73 years respectively, and a statistical difference was found between the phenotypes ($p=0.020$). With respect to the physical activity level, mostly the obesity phenotypes, MHO and MUHO respectively, were considered sedentary 82.19% vs 78.67% ($p= 0.073$). The remainder was considered inadequately inactive, 17.81% vs 21.33%, and no statistical difference ($p=0.597$) was observed between the groups. In Figure 1, we can note a higher frequency (66.67%) of MUHO between the range of 35-56 years of age, while in MHO, the highest frequency (78.09%) was between 21-49 years of age, therefore the majority of younger subjects studied had the MHO phenotype.

7.1.4.3 Clinical, biochemical and anthropometric variables according to the MHO and MUHO phenotypes

The prevalence of NAFLD and IR were significantly higher ($p<0.001$) in the MUHO group, when compared to the MHO. As for the other metabolic variables (clinical and

biochemical) present in the NCEP-ATP III classification criteria, the prevalence of 36% of SH in the MHO group was significantly lower ($p<0.001$) when compared to the MUHO group where it reached 87%.

Similarly, significantly lower values of fasting glucose (mg/dL) 91.03 ± 15.99 vs. 106.81 ± 30.42 ($p<0.001$), insulin (mg/dL) 16.36 ± 8.97 vs. 19.73 ± 11.67 ($p=0.018$) and TG (mg/dL) 123.04 ± 140.94 vs. 190.25 ± 239.38 ($p=0.009$) were found, in addition to significantly higher concentrations of HDL-c (mg/dL) 52.25 ± 11.64 vs. 42.49 ± 8.96 ($p<0.001$) in the MHO group, when compared to the MUHO group.

We found statistically significant differences between the means of the anthropometric parameters, the VAI, 4.28 ± 3.56 vs. 7.93 ± 8.70 ($p=0.001$) and of the inflammatory marker, HOMA-IR 3.74 ± 2.32 vs. 5.40 ± 4.22 ($p=0.002$) regarding the MHO and MUHO groups, respectively. In the analyzed profile of bone metabolism markers selected for the study, AP showed a significant difference between the groups ($p=0.016$), lower in the MHO group (Table 1).

7.1.4.4 Correlation between bone metabolism markers and anthropometric parameters (BMI and VAI) and inflammatory markers according to the MHO and MUHO phenotypes

Table 2 shows, in the MUHO group, a positive correlation between phosphorus and BMI ($r=0.313$; $p<0.001$); and a negative correlation between 25(OH)D and BMI ($r=-0.307$; $p=0.041$). When considering VAI, a negative correlation with calcium ($r=-0.265$; $p=0.043$) and a positive correlation with phosphorus ($r=0.369$; $p=0.039$) were also observed. In the MHO group, no correlation was found between the bone metabolism variables and the body parameters studied.

When the inflammatory markers were analyzed, in the MHO group we found two negative correlations, the first, calcium with hs-CRP ($r =-0.295$; $p = 0.017$) and the second, PTH with HOMA-IR ($r =-0.279$; $p = 0.017$); and no correlation was found with leptin. In the MUHO group, no correlation was found between bone metabolism markers and inflammatory markers.

7.1.5 Discussion

The strong point of this study is the fact that it was one of the few to report, in individuals with Class III obesity, the relationship between the MHO phenotype and a set of biochemical

variables and body fat distribution with importance for metabolic profile. The study presents two main findings. The first is the presence of the phenotype which, regardless of the classification in MHO or MUHO, was associated with changes in clinic, anthropometric and metabolic variables. The second is the combination of obesity with metabolically unhealthy status which was associated with greater impairment of the variables studied.

7.1.5.1 General characterization of the population, according to the MHO and MUHO phenotypes

We found a prevalence of the MHO phenotype (32.73%) in our study, according to the NCEP-ATP III criteria. Some evidence shows that 20-30% of individuals with obesity are classified as MHO.^{53,54} Data from the longitudinal study, ELSA-Brazil, which evaluated 14,545 adults and also used, as one of its criteria, the NCEP-ATP III, found prevalence of 26.8% of MHO⁵⁵, which is lower than the prevalence found in our study. Other authors have reported frequencies of 14.9%⁵⁶, 19.5%⁵⁴, 36.6%⁵⁷ and 39.2%.⁵⁸ This variability can be explained by the study design, the characteristics of the population investigated, the number of individuals evaluated and the lack of standardization of a single criterion for the definition of the MHO phenotype. In those studies, different classes of obesity were evaluated, using different methods to classify the MHO phenotype, which could also justify the differences found. Regarding age, there was association with the MHO phenotype. Among the older adults with obesity (35-56 years of age) we found a higher prevalence (66.67%) related to the MUHO phenotype. Following the trend of previous findings^{31,59}, in our study, subjects classified as MUHO were significantly older than the ones classified as MHO. The MHO phenotype appears to be a transient status^{57,60} for about one-third of individuals.⁶¹ We cannot state that this transition occurred with some of our individuals classified as MUHO since our study is a cross-sectional study, therefore, without follow-up. Longitudinal studies have shown that the MHO status, because unstable, progresses to an unhealthy metabolic state in a considerable proportion of patients.^{32,62} However, there is still no consensus as to the time for this progression and whether all individuals will transition to the MUHO phenotype, since some remained as MHO.³³ Recent evidence also suggests that the MHO phenotype is related to a healthy lifestyle⁶³, including diet quality⁶⁴ and practice of physical activity.⁶⁵ In the present study, it was possible to observe that among the evaluated subjects there was no association of the MHO or MUHO phenotypes with the habit of practicing or not physical activity, as described in the study by Donini et al.⁶⁶ Although the underlying determinants and molecular mechanisms of this phenotype are not yet

fully elucidated, the accumulated evidence suggests that it is influenced not only by environmental factors (i.e; diet and exercise) but also by biological and genetic factors⁶¹, which could help to justify the result found in our study.

7.1.5.2 Clinical, biochemical and anthropometric parameters according to the obesity phenotypes: MHO and MUHO

The fat content in the liver is an additional marker that has been considered very important in the context of the MHO phenotype definition. The prevalence of NAFLD appears to be significantly lower in MHO adults compared to MUHO.^{23,67} In our study, we found a high frequency (97.58%) of NAFDL among obese individuals, mainly in the MUHO group (94%), suggesting that there is an important relationship with the MHO phenotype that needs to be further investigated.

In our study, even among MUHO subjects, there was a higher prevalence of hypertension and IR (84%), suggesting that there is a relation between this parameter and the MHO phenotype. Our results are in accordance with previous findings^{55,54,68,69,70}, but the values we found for prevalence of hypertension and IR were higher when compared to these studies. Probably, this discrepancy is explained by the difference in the severity of obesity studied among the selected studies since our work was the only one among them evaluating class III obesity.

Despite the fact that both phenotypes presented significant inadequacy in four of the five variables of the NCEP-ATP III criteria with the exception of CA, which we believe did not defer since we evaluated individuals with severe class III obesity.^{71,72} Hypertension was the one that was most strongly associated with the MHO phenotype, presenting a high prevalence (87%) among the MUHO. Those findings highlight the importance of the profile of the variables that make up the MHO phenotype classification criterion.

Obese individuals have different patterns of body fat distribution and are related to different metabolic phenotypes⁶⁰. In our study, we found significantly lower values of VAI in the MHO subjects when compared to the MUHO, which showed that this tool was sensitive to detect the difference found between the phenotypes. This fact leads us to suggest that there is a difference between the MHO and MUHO phenotypes with regard to the site of greater deposition of body fat. In accordance with our study, Kang et al (2017)⁷³ in a study with 2,204 individuals with the MHO phenotype observed that higher VAI values were associated with a more compromised metabolic profile, MUHO. And these authors, in the same study, also

observed that VAI correlated better with the MHO prognosis and was considered a good predictor in the determination of the conversion of the MHO phenotype to MUHO.

HOMA-IR is influenced by the mechanisms of the inflammation typical of the obesity, reflects the conditioned IR among other factors by the action of inflammatory cytokines secreted by adipose tissue. The differences found between the phenotypes can be justified by environmental genetic aspects and due style, which are not yet very well understood. Our results are, in agreement with other studies, which also present greater sensitivity to insulin, better lipid profile, glycogen, inflammation and lower hepatic and blood pressure impairment^{60,69-70}.

Although the difference between the majority of the studied bone metabolism markers (calcium, phosphorus, vitamin D, and PTH) was not significant in the groups, these data deserve attention since they are involved in metabolic disorders common in individuals with obesity. Several studies indicate that deficits in calcium, vitamin D and phosphorus in the long term, especially when associated with obesity, increase the risk of fractures and may be associated with a higher prevalence of osteoporosis, osteoarthritis, sarcopenia^{74,75} and other factors such as osteosarcopenic obesity^{4, 76} and liver diseases.^{71,77} Vitamin D deficiencies, calcium and hormonal changes such as secondary hyperparathyroidism, when untreated, result in bone diseases.^{7,78} We observed that AP was related to the MHO phenotype. Higher plasma concentrations of the marker were observed in the most metabolically compromised phenotype, MUHO. This marker tends to be more concentrated when there is vitamin D deficiency. It is also influenced by the homeostasis of PTH, calcium and vitamin D.⁷⁹ Therefore, even if the other markers have not differed between the phenotypes, MHO and MUHO, it is important to evaluate in a deeper way the significance of the observed changes in our study since they are indicative of greater bone remodeling.

We believe that the differences in the clinical, biochemical, anthropometric and metabolic profile between MHO and MUHO groups observed in our study, added to other findings reported by several other prior studies, are results of several mechanisms still not clarified for interaction between genetic, environmental and behavioral factors. These factors affect the distribution of abdominal fat, accumulation of visceral and ectopic fat in the liver and muscle, IR, and determine the MHO phenotype⁶¹, and can increase or decrease the risk for several diseases.

7.1.5.3 Correlation between bone metabolism markers and anthropometric parameters (BMI and VAI) and inflammatory markers according to the MHO and MUHO phenotypes

In our study, we noted that among the MUHO individuals, plasma vitamin D levels varied inversely with BMI ($r=-0.307, p=0.04$). Previous findings have shown results similar to ours, where obese individuals presented lower serum vitamin D values when compared to normal weight ones. In addition, the plasma concentration of vitamin D was negatively correlated with body weight, BMI and fat mass.^{80,81} In the study by Vimaleswaran et al (2013)⁸² with 42,024 obese individuals, the same correlation was observed. It was shown that each increase of 1kg / m² of BMI would be associated with 1.15% reduction of 25(OH)D. However, Seo et al (2012)⁸³, when they evaluated sarcopenic obesity in relation to plasma levels of vitamin D did not find the same association. It is worth emphasizing that despite the fact that the individuals evaluated were also obese, sarcopenic obesity applies more criteria for diagnosis, which go beyond BMI. In the study, there was a negative association of vitamin D with visceral fat.

It is evident that vitamin D is related to obesity, and the correlation found in our study can be attributed to the liposolubility of this hormone and its biodistribution in the adipose tissue.⁸⁴ The literature also reports that there are a number of possible mechanisms that can cause the lowest concentration of 25(OH)D in obesity, since that is multifactorial. Among them, there could be deficiency due to less exposure to sunlight⁸⁵, the lack of the habit of using sunscreen⁸⁷ as observed throughout the studied sample, regardless of the classification from the obesity phenotypes, in addition to the age factor^{80,87}, considering that the individuals classified as MUHO were older than the MHO in our study, which could therefore favor the occurrence of vitamin D deficiency, as well as changes in the binding protein or metabolism of this vitamin.⁸⁶

In the MUHO group, the correlations found between indicators of phosphorus and BMI ($r=-0.313, p=0.00$) and VAI ($r=0.369, p=0.04$), respectively, as well as between VAI and calcium ($r =-0.265, p=0.04$), can be partly explained by the deficiency of vitamin D, its secondary endpoints in the metabolism of these two nutrients (phosphorus and calcium), in addition to any more compromised clinical and metabolic profile of the group when compared to MHO. We believe that the difference between the profile of body and visceral adiposity observed in the phenotypes was significantly more impaired in the MUHO phenotype. When it was associated with vitamin D deficiency as a function of the greater volume of body tissue in the obese⁷⁴ it favored the changes in the concentrations of serum calcium and phosphorus. Calcium and phosphorus play a key role in the maintenance of bone metabolism^{17,88,89} and their deficits are related to severity of obesity.^{90,91} Calcium is the most abundant mineral in the body, and the bone is a metabolic marker that must always be in balance with the blood. Phosphorus

is the second most abundant mineral in the body. Its main function in bone metabolism is to combine with calcium to provide bone stiffness.⁷⁹

Although no significant difference was found between the plasma vitamin D levels between the MHO and MUHO groups, MUHO, which is the most metabolically compromised phenotype, seems to have been more affected by vitamin D deficiency. Since there was a correlation with the BMI parameter, it may indirectly have influenced the correlations found of other markers (calcium and phosphorus) with VAI.

Regarding the HOMA-IR and the hs-CRP parameters, despite the high plasma levels of hs-CRP, they did not differ significantly between the phenotypes. In the MHO group, the inverse correlation of CRP with serum calcium levels ($r = -0.295, p = 0.01$) can be explained by the probable link between the pathophysiological mechanisms of obesity and other syndromes such as osteoporosis, osteoarthritis, osteopenia, sarcopenia and sarcopenic obesity, diseases that are often associated with class III obesity^{5-7,74} and that quite possibly could be affecting a significant number of subjects in the studied sample. These diseases are characterized by long-term deficiency of nutrients such as calcium, vitamin D and increased secretion of PTH⁹² which are influenced by mechanisms of the inflammatory framework typical of obesity^{16,93,94} and characterized by higher levels of tumor necrosis factor alpha (TNFα), leptin, CRP, IR and other inflammatory cytokines in the adipose tissue.⁹⁵

This hypothesis, related to inflammation, may explain the correlation between HOMA-IR and PTH ($r = 0.279; p = 0.02$). The HOMA-IR parameter also reflects the inflammatory profile and it was significantly less compromised in the MHO group: This fact could influence the secretion of PTH from vitamin D deficiency. PTH is often used as an indicator of vitamin D status.⁹⁶ Normally, low levels of 25(OH)D provide lower calcium absorption and increased bone turnover.⁷⁴ Even though no significant difference was found between the groups in relation to vitamin D, the most preserved clinical and metabolic profile was impacted differently, justifying this correlation because it was less IR. In the study by Choi et al (2016)⁴, a progressive association between HOMA-IR and vitamin D levels was observed regardless of sarcopenic obesity in men. HOMA-IR and C-reactive protein were correlated with sarcopenic obesity in women.⁷⁶ In the skeleton, PTH promotes the increase of bone resorption, besides being the main responsible for regulating acutely and rapidly the serum calcium.^{97,98}

The correlations found in our results need further investigation. No previous study, to our knowledge, has evaluated the correlation of this set of biochemical markers (clinical, anthropometric and metabolic) with the MHO phenotype in individuals with class III obesity, with promising results that could contribute to the development of complementary studies.

However, we assume limitations in the present study: the reduced number of variables related to the inflammatory profile, the fact that it is a cross-sectional design study, so it was impossible to determine a causal relationship between the variables that were analyzed, as well as the impossibility of evaluating the stage of NAFDL since we only had data of complete abdominal ultrasound.

7.1.6 Conclusion

The MHO phenotype does not protect adults with class III obesity from developing clinic, anthropometric and metabolic changes that can negatively impact on the health of these individuals. Our study highlights that the MHO present important metabolic alterations such as those observed in the MUHO, although with lower prevalence and severity. This also occurs if we consider other clinical and metabolic variables outside the classificatory profile proposed by the NCEP-ATP III. These findings suggest continuous monitoring of these individuals in order to prevent the progression of the alterations evaluated, since MHO seems to be a transient status, aiming at the effective reduction of the metabolic risks to which these individuals are exposed. In addition, the results presented here seem promising for the development of future studies related to obesity phenotypes and as such we suggest the conduction of further longitudinal studies to investigate the phenotype stability, the significance of our findings and the impact of the correlations observed.

Abbreviations

Metabolic Syndrome (MS); C- reactive protein (CRP); Alkaline phosphatase (AP); Metabolically healthy obesity phenotype (MHO); Metabolically unhealthy obesity phenotype (MUHO); Waist circumference (WC).

Acknowledgments

Financial Support: The authors acknowledge the support received from *Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro* (FAPERJ - Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support of the State of Rio de Janeiro; Scientist of Our State), *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq- National Council for Scientific and Technological Development) and CAPES – Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education within the Ministry of Education of Brazil.

Author Contributions: A.R. conceived and designed the experiments; L.M.L., M.L., A.C., S.:and C.S. performed the experiments; R.M. analyzed the data; L.M.L., A.C., M. L., R. M. and A.R wrote the paper.

Disclosure

The author reports no conflicts of interest in this work.

7.1.7 References

1. Ng M, Fleming T, Robinson M, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet.* 2014;384:766-781. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60460-8.
2. NCD. Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19·2 million participants. *Lancet.* 2016;387(10026):1377-96. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30054-X.
3. National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation.* 2002;106:3143-3421.
4. Choi KM. Sarcopenia and sarcopenic obesity. *Korean J Intern Med.* 2016;31(6):1054-1060. doi: 10.3904/kjim.2016.193.
5. Tovo C, Fernandes SA, Buss C, de Mattos AA. Sarcopenia and non-alcoholic fatty liver disease: Is there a relationship? A systematic review. *World J Hepatol* 2017;28(9):326-332. doi: 10.4254/wjh.v9.i6.326.
6. Chen YY, Fang WH, Wang CC, et al. Body fat has stronger associations with bone mass density than body mass index in metabolically healthy obesity. *PLoS ONE* 2018;13(11):e0206812. doi: 10.1371/journal.pone.0206812.
7. Bano G, Trevisan C, Carraro S, et al. Inflammation and sarcopenia: A systematic review and meta-analysis. *Maturitas.* 2017;96:10-15. doi: 10.1016/j.maturitas.2016.

8. Fazel Y, Koenig AB, Sayiner M, Goodman ZD, Younossi ZM. Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease. *Metabolism*. 2016;65(8):1017–25. doi: 10.1016/j.metabol.2016.01.012.
9. Targher G, Lonardo A, Rossini M. Nonalcoholic fatty liver disease and decreased bone mineral density: is there a link? *J Endocrinol Invest*. 2015;38(8):817–82. doi: 10.1007/s40618-015-0315-6.
10. Wolf E, Utech M, Stehle P, Büsing M, Stoffel-Wagner B, Ellinger S. Preoperative micronutrient status in morbidly obese patients before undergoing bariatric surgery: results of a cross-sectional study. *Surg Obes Relat Dis*. 2015;11(5):1157–1163. doi: 10.1016/j.sobrd.2015.03.018.
11. Via MA, Mechanick JI. Nutritional and Micronutrient Care of Bariatric Surgery Patients: Current Evidence Update. *Curr Obes Rep* 2017;6(3):286–296. doi: 10.1007/s13679-017-0271-x.
12. Faé C, Liberali R, Coutinho VF. Deficiência de nutrientes a longo prazo no pós-operatório de cirurgia bariátrica – revisão sistemática. *SaBios* 2015;10(2):46–53.
13. Manoy P, Anomasiri W, Yuktanandana P, et al. Elevated serum leptin levels are associated with low vitamin D, sarcopenic obesity, poor muscle strength, and physical performance in knee osteoarthritis. *Biomarkers* 2017;19:1-8. doi: 10.1080/1354750X.2017.1315615.
14. Chen XX, Yang T. Roles of leptin in bone metabolism and bone diseases. *J Bone Miner Metab*. 2015;33(5):474–485. doi: 10.1007/s00774-014-0569-7.
15. Hashimoto Y, Hamaguchi M, Fukuda T, Ohbora A, Kojima T, Fukui M. Fatty liver as a risk factor for progression from metabolically healthy to metabolically abnormal in non-overweight individuals. *Endocrine* 2017;57(1):89–97. doi: 10.1007/s12020-017-1313-6.
16. Yang CW, Li CI, Li TC, et al. Association of Sarcopenic Obesity with Higher Serum High-Sensitivity C-Reactive Protein Levels in Chinese Older Males - A Community-Based Study (Taichung Community Health Study-Elderly, TCHS-E). *PLoS One* 2015;10(7):e0132908. doi: 10.1371/journal.pone.0132908.
17. Jafari-Narsabian :Osteosarcopenic obesity in women: impact, prevalence, and management challenges. *Int J Womens Health*. 2017;9:33–42. doi: 10.2147/IJWH.S106107.

18. Szelj C, Parra-Rodríguez L, Rosas-Carrasco O. Osteosarcopenic Obesity: Prevalence and Relation with Frailty and Physical Performance in Middle-Aged and Older Women. *J Am Med Dir Assoc.* 2017;18(8):733e1-733e5. doi: 10.1016/j.jamda.2017.02.023.
19. Cabral JAV, Souza GP, Nascimento JA, Simonetti LF, Marchese C, Sales-Peres SH. Impact of vitamin D and calcium deficiency in the bones of patients undergoing bariatric surgery: a systematic review. *Arq Bras Cir Dig.* 2016;29(1 Suppl. 1):120-123. doi: 10.1590/0102-6720201600S10029.
20. Bekaert M, Verhelst X, Geerts A, Lapauw B, Calders :Association of recently described adipokines with liver histology in biopsy proven non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review. *Obes Rev.* 2016;17(1):68-80. doi: 10.1111/obr.12333
21. Hinnouho GM, Czernichow S, Dugravot A, Batty GD, Kivimaki M, Singh-Manoux A. Metabolically healthy obesity and risk of mortality: does the definition of metabolic health matter? *Diabetes Care* 2013;36:2294-2300. doi: 10.2337/dc12-1654
22. Pujia A, Gazzaruso C, Ferro Y, et al. Individuals with Metabolically Healthy Overweight/Obesity Have Higher Fat Utilization than Metabolically Unhealthy Individuals. *Nutrients* 2016;8(1). doi: 10.3390/nu8010002.
23. Chang Y, Jung HS, Zhang Y, et al. Metabolically healthy obesity and the development of nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Gastroenterol.* 2016;111(8). doi: 10.1038/ajg.2016.178.
24. Blüher S, Schwarz :Metabolically healthy obesity from childhood to adulthood - Does weight status alone matter? *Metabolism* 2014;63(9):1084-1092. doi: 10.1016/j.metabol.2014.06.009.
25. Primeau V, Coderre L, Karelis AD, et al. Characterizing the profile of obese patients who are metabolically healthy. *Int J Obes* 2011;35: 971e81. doi: 10.1038/ijo.2010.216.
26. Ortega FB, Lavie CJ, Blair SN. Obesity and cardiovascular disease. *Circ Res* 2016; 118:1752e70. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306883.
27. Lassale C, Tzoulaki I, Moons KGM, et al. Separate and combined associations of obesity and metabolic health with coronary heart disease: a pan-European case-cohort analysis. *Eur Heart J* 2018;39(5):397-406. doi: 10.1093/eurheartj/ehx44.
28. Zheng R, Zhou D, Zhu Y. The long-term prognosis of cardiovascular disease and all-cause mortality for metabolically healthy obesity: a systematic review and meta-analysis. *J Epidemiol Community Health* 2016;70(10):1024–31. doi:10.1136/jech-2015-206948.

29. Bell JA, Kivimaki M, Hamer M. Metabolically healthy obesity and risk of incident type 2 diabetes: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Obes Rev* 2014;15(6):504–15. doi: 10.1111/obr.12157.
30. Al-khalidi B, Kimball SM, Kuk JL, Ardern CI. Metabolically healthy obesity, vitamin D, and all-cause and cardiometabolic mortality risk in NHANES III. *Clin Nutr* 2018;S0261-5614(18):30090-6. doi:10.1016/j.clnu.2018.02.025.
31. Achilike I, Hazuda HP, Fowler SP, Aung K, Lorenzo C. Predicting the development of the metabolically healthy obese phenotype. *Int J Obes (Lond)* 2015;39(2):228–34. doi.org: 10.1038/ijo.2014.113.
32. Eshtiaghi R, Keihani S, Hosseinpanah F, Barzin M, Azizi F. Natural course of metabolically healthy abdominal obese adults after 10 years of follow-up: the Tehran lipid and glucose study. *Int J Obes (Lond)* 2015;39(3):514–9. doi: 10.1038/ijo.2014.176.
33. Hamer M, Bell JA, Sabia S, Batty GD, Kivimaki M. Stability of metabolically healthy obesity over 8 years: the English longitudinal study of ageing. *Eur J Endocrinol* 2015;173(5):703–8. doi:10.1530/eje-15-0449.
34. World Health Organization (WHO) Obesity: preventing and managing the global epidemic. Geneva: WHO, 2004.
35. National Kidney Foundation. KDOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification, 2002. Available from: http://www2.kidney.org/professionals/kdoqi/guidelines_ckd/p4_class_g1.htm. Accessed November 20, 2017.
36. Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN, et al. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Circulation* 2004;110(2):227-39.
37. Lohman T, Caballero B, Davis S. Pathways: A school-based program for the primary prevention of obesity in American Indian children. *J Nutr Sept* 1998.
38. Amato MC, Giordano C, Galia M, et al. Visceral Adiposity Index: a reliable indicator of visceral fat function associated with cardiometabolic risk. *Diabetes Care* 2010;33(4):920-2. doi: 10.2337/dc09-1825.
39. Craig CL, Marshall AL, Sjostrom M, et al. International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. *MedSci Sports Exerc.* 2003.
40. Pratt DS, Kaplan MM. Avaliação da função hepática [Liver function assessment]. In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson LR, editors.

Harrison medicina interna [Harrison internal medicine], 15th ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2002:1813-6.

41. Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC). VII Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. 2016. Available from:http://publicacoes.cardiol.br/2014/diretrizes/2016/05_HIPERTENSAO_ARTERIAL.pdf. Accessed February 2, 2016.
42. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972;18(6):499-502.
43. Matthews DR., Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28(7):412-9.
44. Durward CM, Hartman TJ, Nickols-Richardson SM. All-cause mortality risk of metabolically healthy obese individuals in NHANES III. *J Obes* 2012;2012:460321. doi: 10.1155/2012/460321.
45. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: Application to clinical and public health practice: A Statement for Healthcare Professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation*, 2003;107:499-511.
46. Kao PC. Parathyroid hormone assay. *Mayo Clin Proc.* 1982.
47. Bramer JA, Abudu AA, Tillman RM, Carrter SR, Sumathi VP, Grimer RJ. Pre and post chemotherapy alkaline phosphatase levels as prognostic indicators in adults with localized osteosarcoma. *Eur J Cancer.* 2005;41(18):2846-52.
48. Holick MF, Chen TC. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr.* 2008;87(4):1080S-6S.
49. Hanwell HEC, Vieth R, Cole DE, et al. Sun exposure questionnaire predicts circulating 25-hydroxyvitamin D concentrations in Caucasian hospital workers in southern Italy. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010;121(1-2):334–337. doi: 10.1016/j.jsbmb.2010.03.023.
50. Daly JA, Erttingshausen G. Direct method for determining inorganic phosphate in serum with the “CentrifilChem”. *Clin Chem.* 1972;18(3):263-5.
51. World Health Organization (WHO). The World Health Report, Fighting disease, fostering development. 1996. Available from: www.who.int/whr/1996/en/. Accessed June 6, 2016.

52. IBM Cor:Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.
53. Goday A, Calvo E, Vázquez LA, et al. Prevalence and clinical characteristics of metabolically healthy obese individuals and other obese/non-obese metabolic phenotypes in a working population: results from the Icaria study. *BMC Public Health* 2016;16:248. doi: 10.1186/s12889-016-2921-4.
54. Latifi SM, Karandish M, Shahbazian H, Taha JM, Cheraghian B, Moradi M. Prevalence of Metabolically Healthy Obesity (MHO) and its relation with incidence of metabolic syndrome, hypertension and type 2 Diabetes amongst individuals aged over 20 years in Ahvaz: A 5 Year cohort Study (2009–2014). *Diabetes Metab Syndr.* 2017;11(Suppl. 2):S1037-S1040. doi: 10.1016/j.dsx.2017.07.036.
55. Diniz MFH, Beleigoli AMR, Ribeiro ALP, et al. Factors associated with metabolically healthy status in obesity, overweight, and normal weight at baseline of ELSA-Brasil. *Medicine*, May. 2016;95(27):e4010. doi: 10.1097/MD.0000000000004010.
56. Hwang YC, Hayashi T, Fujimoto WY, et al. Visceral abdominal fat accumulation predicts the conversion of metabolically healthy obese subjects to an unhealthy phenotype. *Int J Obes (Lond)*. 2015;39(9):1365–1370. doi: 10.1038/ijo.2015.75.
57. Phillips CM. Metabolically healthy obesity: definitions, determinants and clinical implications. *Rev Endocr Metab Disord.* 2013;14(3):219–27. doi: 10.1007/s11154-013-9252-x.
58. Huh JH, Kim KJ, Kim SU, et al. Obesity is more closely related with hepatic steatosis and fibrosis measured by transient elastography than metabolic health status. *Metabolism*, Jan. 2017;66:23-31. doi: 10.1016/j.metabol.2016.10.003.
59. Van Vliet-Ostaptchouk JV, Noutio ML, Slagter SN, et al. The prevalence of metabolic syndrome and metabolically healthy obesity in Europe: a collaborative analysis of ten large cohort studies. *BMC Endocr Disord.* 2014;14(9). doi: 10.1186/1472-6823-14-9.
60. Stefan N, Haring HU, Hu FB, Schulze MB. Metabolically healthy obesity: epidemiology, mechanisms, and clinical implications. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2013;1(2):152-62. doi: 10.1016/S2213-8587(13)70062-7.
61. Phillips CM. Metabolically healthy obesity across the life course: epidemiology, determinants, and implications. *Ann N Y Acad Sci.* 2017;1391(1):85–100. doi: 10.1111/nyas.13230.

62. Arnlov J, Sundstrom J, Ingelsson E, Lind L. Impact of BMI and the metabolic syndrome on the risk of diabetes in middle-aged men. *Diabetes Care* 2011;34(1):61–65. doi: 10.2337/dc10-0955.
63. Schröder H, Ramos R, Baena-Díez JM, et al. Determinants of the transition from a cardiometabolic normal to abnormal overweight/obese phenotype in a Spanish population. *Eur J Nutr.* 2014;53(6):1345-53. doi: 10.1007/s00394-013-0635-2.
64. Bell LK, Edwards S, Grieger JA. The relationship between dietary patterns and metabolic health in a representative sample of adult Australians. *Nutrients* 2015;7(8):6491–6505. doi: 10.3390/nu7085295.
65. de Rooij BH, van der Berg JD, van der Kallen CJ, et al. Physical activity and sedentary behavior in metabolically healthy versus unhealthy obese and nonobese individuals—the Maastricht study. *PLoS One* 2016;11(5):e0154358. doi: 10.1371/journal.pone.0154358.
66. Donini LM, Merola G, Poggiogalle E, et al. Disability, Physical Inactivity, and Impaired Health-Related Quality of Life Are Not Different in Metabolically Healthy vs. Unhealthy Obese Subjects. *Nutrients* 2016;8(12). doi: 10.3390/nu8120759.
67. Abenavoli L, Peta V. Role of adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Rev Recent Clin Trials* 2014;9(3):134-140.
68. Kim HT, Kim HJ, Ahn HY, Hong YH. An analysis of age-related loss of skeletal muscle mass and its significance on osteoarthritis in a Korean population. *Korean J Intern Med.* 2016;31(3):585-593. doi: 10.3904/kjim.2015.156.
69. Lee TH, Jeon WS, Han KJ, et al. Comparison of Serum Adipocytokine Levels according to Metabolic Health and Obesity Status. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2015;30(2):185-194.
70. Shaharyar S, Roberson LL, Jamal O, et al. Obesity and Metabolic Phenotypes (Metabolically Healthy and Unhealthy Variants) Are Significantly Associated with Prevalence of Elevated C-Reactive Protein and Hepatic Steatosis in a Large Healthy Brazilian Population. *J Obes.* 2015;2015. doi:10.1155/2015/178526.
71. Cordeiro A, Pereira A, Saboya CJ, Ramalho A. Relationship between Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Vitamin D Nutritional Status in Extreme Obesity. *Can J Gastroenterol Hepatol.* 2017;2017. doi: 10.1155/2017/9456897.
72. Cordeiro A, Pereira SE, Saboya SE, Ramalho A. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Relationship with Metabolic Syndrome in Class III Obesity Individuals. *Biomed Res Int* 2015;2015:839253. doi: 10.1155/2015/839253.

73. Kang YM, Jung CH, Cho YK. Visceral adiposity index predicts the conversion of metabolically healthy obesity to an unhealthy phenotype. *PLoS One*. 2017;12(6):e0179635. doi: 10.1371/journal.pone.0179635.
74. Walsh JS, Bowles S, Evans AL. Vitamin D in obesity. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.*, 2017;24(6):389-394. doi: 10.1097/MED.0000000000000371.
75. Avenell A, Mak JC, O'Connell D. Vitamin D and vitamin D analogues for preventing fractures in post-menopausal women and older men. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014;4:1-170. doi: 10.1002/14651858.CD000227.pub4.
76. Kim TN, Park MS, Lim KI, et al. Relationships between sarcopenic obesity and insulin resistance, inflammation, and vitamin D status: the Korean Sarcopenic Obesity Study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013;78(40):525-32. doi: 10.1111/j.1365-2265.2012.
77. Severson TJ, Besur S, Bonkovsky HL. Genetic factors that affect nonalcoholic fatty liver disease: A systematic clinical review. *World J Gastroenterol.* 2016;22(29):6742–6756. doi: 10.3748/wjg.v22.i29.6742.
78. Murray TE, Williams D, Lee MJ. Osteoporosis, obesity, and sarcopenia on abdominal CT: a review of epidemiology, diagnostic criteria, and management strategies for the reporting radiologist. *Abdom Radiol (NY)*. 2017;42(9):2376-2386. doi: 10.1007/s00261-017-1124-5.
79. Christakos S, Dhawan P, Porta A, Mady LJ, Seth T. Vitamin D and intestinal calcium absorption. *Mol Cell Endocrinol.* 2011;347(1-20):25–29. doi: 10.1016/j.mce.2011.05.038.
80. Walsh JS, Evans AL, Bowles S, et al. Free 25-hydroxyvitamin D is low in obesity, but there are no adverse associations with bone health. *Am J Clin Nutr.* 2016;103(6):1465–1471. doi: 10.3945/ajcn.115.120139
81. Samuel L, Borrell LN. The effect of body mass index on optimal vitamin D status in U.S. adults: The National Health and Nutrition Examination Survey 2001-2006. *Ann Epidemiol.* 2013;23(7):409–414. doi: 10.1016/j.annepidem.2013.05.011.
82. Vimalesarwan KS, Berry DJ, Lu C, et al. Causal Relationship between Obesity and Vitamin D Status: Bi-Directional Mendelian Randomization Analysis of Multiple Cohorts. *PLoS Med.* 2013;10(2):1-13. doi: 10.1371/journal.pmed.1001383.
83. Seo JA, Cho H, Eun CR, et al. Association between visceral obesity and sarcopenia and vitamin D deficiency in older Koreans: the Ansan Geriatric Study. *J Am Geriatr Soc.* 2012;60(4):700-706. doi: 10.1111/j.1532-5415.2012.03887.x.

84. Wimalawansa SJ. Vitamin D deficiency is a surrogate marker for visceral fat content, metabolic syndrome, type 2 diabetes, and future metabolic complications. *J Diabetes Metab Disord Control.* 2016;3(1):00059.
85. Kull M, Kallikorm R, Lember M. Body mass index determines sunbathing habits: implications on vitamin D levels. *Intern Med J.* 2009;39(4):256–258. doi: 10.1111/j.1445-5994.2009.01900.x.
86. Winters SJ, Chennubhatla R, Wang C, Miller JJ. Influence of obesity on vitamin D-binding protein and 25-hydroxy vitamin D levels in African American and white women. *Metabolism* 2009;58(4):438–442. doi: 10.1016/j.metabol.2008.10.017.
87. Shea MK, Houston DK, Tooze JA, et al. Correlates and prevalence of insufficient 25-hydroxyvitamin D status in black and white older adults: the health, aging and body composition study. *J Am Geriatr Soc.* 2011;59(7):1165–1174. doi: 10.1111/j.1532-5415.2011.03476.x.
88. Fischer V, Haffner-Luntzer M, Prystaz K, et al. Calcium and vitamin-D deficiency marginally impairs fracture healing but aggravates posttraumatic bone loss in osteoporotic mice. *Sci Re*:2017;7:7223. doi: 10.1038/s41598-017-07511-2.
89. Ormsbee MJ, Prado CM, Ilich JZ, et al. Osteosarcopenic obesity: the role of bone, muscle, and fat on health. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2014;5(3):183–192. doi: 10.1007/s13539-014-0146-x.
90. Kelly OJ, Gilman JC, Kim Y, Ilich JZ. Micronutrient intake in the etiology, prevention and treatment of osteosarcopenic obesity. *Curr Aging Sci* 2016;9(4):260-268.
91. Lo Menzo E, Cappellani A, Zanghì A, Di Vita M, Berretta M, Szomstein S. Nutritional Implications of Obesity: Before and After Bariatric Surgery. *Bariatr Surg Pract Patient Care.* 2014;9(1):9–17. doi: 10.1089/bari.2014.9969.
92. Demirağ MD, Özkan S, Haznedaroğlu Ş, et al Associations between obesity and the radiographic phenotype in knee osteoarthritis. *Turk J Med Sci.* 2017;47(2):424-429. doi: 10.3906/sag-1512-26.
93. Poonpet T, Honsawek S. Adipokines: Biomarkers for osteoarthritis? *World J Ortho*:2014;5(3):319–327. doi: 10.5312/wjo.v5.i3.319.
94. Dutra MT, Avelar BP, Souza VC, et al. Relationship between sarcopenic obesity-related phenotypes and inflammatory markers in postmenopausal women. *Clin Physiol Funct Imaging.* 2017;37(2):205-210. doi: 10.1111/cpf.12287.
95. Gonçalves CG, Glade MJ, Meguid MM. Metabolically healthy obese individuals: Key protective factors. *Nutrition* 2016;32(1):14–20. doi: 10.1016/j.nut.2015.07.010.

96. Snijder MB, Van Dam RM, Visser M, et al. Adiposity in Relation to Vitamin D Status and Parathyroid Hormone Levels: A Population-Based Study in Older Men and Women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(1):4119–4123. doi: 10.1210/jc.2005-0216.
97. Vilaça T. Obesidade, Doenças Osteometabólicas, Gota e Osteoartrose. In: Mancini CM, Geloneze B, Salles JE, Lima JG, Carra M, editors: *Tratado de Obesidade*, 2nd ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2015:319 – 326.
98. Cusano NE, Rubin MR, Irani D, Sliney J Jr, Bilezikian J:Use of parathyroid hormone in hypoparathyroidism. *J Endocrino Invest.* 2013;36(11):1121-7

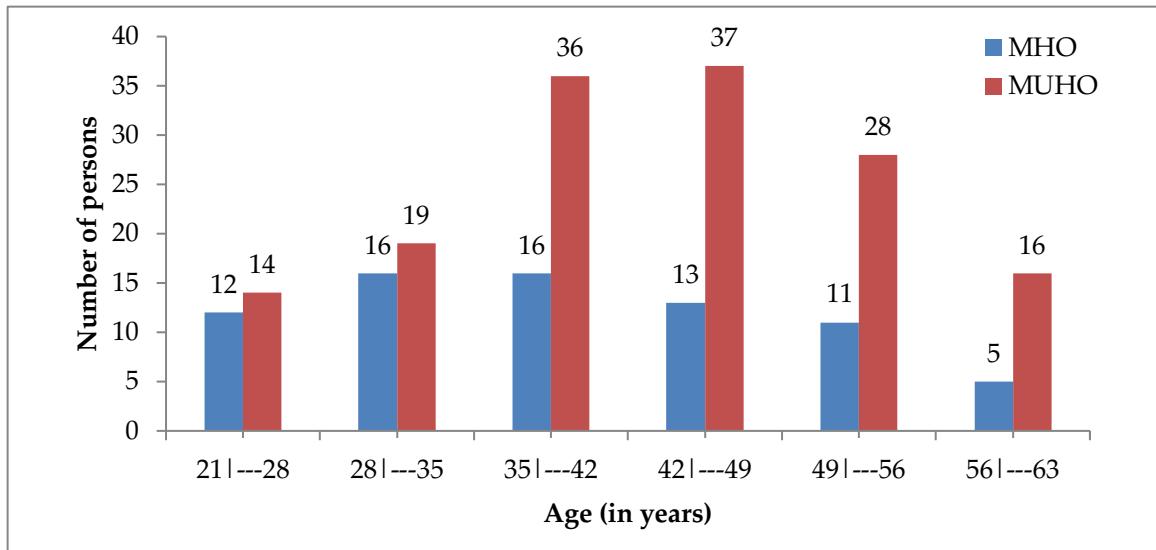


Figure 1. Frequency (%) of subjects by age group, according to obesity phenotypes, MHO and MUHO.

Abbreviations: MHO, metabolically healthy obese; MUHO, metabolically unhealthy obese.

Table 1. Clinical, Biochemical and Anthropometric Characteristics of the MHO and MUHO phenotypes

General characteristics	MHO (n=73) Mean ± SD	MUHO (n=150) Mean ± SD	p-value	
Clinical and Metabolic variables				
Systolic H (mmHg)	123.36 ± 23.45	140.00 ± 30.47	0.000 ^a	
Diastolic H (mmHg)	76.63 ± 18.09	90.29 ± 24.45	0.000 ^a	
SH (%)	Yes No	35.60 (n=26) 64.40 (n=47)	87.30 (n=131) 12.70 (n=19)	0.001 ^b
NAFLD (%)	Yes No	83.60 (n=61) 16.40 (n=12)	94.00 (n=141) 6.00 (n=9)	0.025 ^b
IR (%)	Yes No	60.27 (n=44) 39.73 (n=29)	84.00 (n=126) 16.00 (n=24)	0.000 ^b
Anthropometric variables				
Weight (Kg)	118.46 ± 16.30	118.04 ± 19.86	0.876	
Height (meters)	1.66 ± 0.08	1.66 ± 0.10	0.723	
BMI (Kg/m ²)	42.99 ± 4.48	42.51 ± 4.86	0.465	
WC (cm)	118.18 ± 11.72	120.54 ± 13.89	0.186	
VAI	4.28 ± 3.56	7.93 ± 8.70	0.001 ^a	
Biochemical variables				
Glucose (mg/dL)	91.33 ± 15.99	106.81 ± 30.42	0.000 ^a	
Insulin (mg/dL)	16.36 ± 8.97	19.73 ± 11.67	0.018 ^a	
Total Cholesterol (mg/dL)	197.67 ± 36.07	199.06 ± 57.16	0.826	
LDL-c (mg/dL)	121.10 ± 31.61	120.31 ± 35.53	0.867	
HDL-c (mg/dL)	52.25 ± 11.64	42.49 ± 8.96	0.000 ^a	
Triglycerides (mg/dL)	123.04 ± 140.94	190.25 ± 239.38	0.009 ^a	
Inflammatory markers				
HOMA-IR	3.74 ± 2.32	5.40 ± 4.22	0.002 ^a	
hs-CRP (mg/dL)	0.88 ± 0.71	0.97 ± 0.93	0.427	
Leptin	45.69 ± 32.24	42.50 ± 30.96	0.483	
Bone metabolism markers				
Calcium (mg/dL)	3.91 ± 1.40	3.906 ± 1.87	0.987	
Phosphorus (mg/dL)	3.58 ± 0.58	3.65 ± 0.63	0.799	
25(OH)D (ng/mL)	22.33 ± 7.79	22.69 ± 8.31	0.747	
PTH (pg/mL)	42.09 ± 18.13	42.79 ± 16.08	0.779	
AP (U/L)	70.56 ± 27.57	80.11 ± 27.56	0.016 ^a	

Notes:^a t-Student test ($p<0.05$); ^bPearson's Chi-Square (χ^2) Test ($p< 0.05$); **Abbreviations:** SD: standard deviation; SH, Systemic Hypertension; NAFLD, Non-Alcoholic Fatty Liver Disease; IR, Insulin Resistance; BMI, Body Mass Index; AC, Abdominal Circumference; VAI, Visceral Adiposity Index; HOMA-IR, Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance; 25(OH)D, Vitamin D; PTH, Parathyroid Hormone; AP, Alkaline Phosphatase;

Table 2. Correlation Between Bone Metabolism Variables and Anthropometric Parameters and Inflammatory Markers (HOMA-IR, Hs-CRP And Leptin) According to the MHO and MUHO Phenotypes

Bone Markers	Anthropometric Variables								Inflammatory Markers											
	BMI				VAI				HOMA IR				hs-CRP				Leptin			
	MHO		MUHO		MHO		MUHO		MHO		MUHO		MHO		MUHO		MHO		MUHO	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Calcium	-0.07	0.57	0.01	0.95	0.15	0.18	-0.27 ^a	0.04	0.09	0.44	-0.08	0.34	-0.30 ^a	0.01	0.06	0.47	-0.19	0.12	-0.01	0.92
Phosphorus	0.10	0.38	0.31 ^b	0.00	-0.20	0.10	0.40 ^a	0.04	-0.05	0.65	-0.02	0.78	0.16	0.17	0.04	0.62	-0.11	0.36	-0.14	0.09
25(OH)D	-0.05	0.68	-0.31 ^a	0.04	-0.05	0.69	-0.10	0.22	-0.15	0.20	-0.11	0.18	0.12	0.33	-0.06	0.51	0.08	0.49	0.00	0.97
PTH	0.00	0.99	0.05	0.52	-0.01	0.97	-0.04	0.61	-0.28 ^a	0.02	0.09	0.30	-0.02	0.87	0.09	0.28	-0.01	0.92	0.12	0.14
AP	-0.09	0.43	0.01	0.89	0.01	0.91	-0.07	0.41	-0.19	0.12	-0.02	0.85	0.13	0.28	0.02	0.85	0.06	0.60	0.05	0.55

Notes: ^a Pearson's Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed); ^b Pearson's Correlation is significant at 0.01 level (2-tailed).

Abbreviations: 25(OH)D, Vitamin D; PTH, Parathyroid Hormone; AP, Alkaline Phosphatase; BMI, Body Mass Index; MHO, Metabolically Healthy Obese; MUHO, Metabolically Unhealthy Obese; VAI, Visceral Adiposity Index.

7.2 Artigo 2

Loureiro, LM. et al. Does the Metabolically Healthy Obese Phenotype protect adults with class III obesity from biochemical alterations related to bone metabolism?

Artigo submetido ao periódico *Nutrients*

(Anexo 7)

(O Fenótipo Obeso Metabolicamente Saudável protege adultos com obesidade classe III de desenvolverem alterações bioquímicas relacionadas ao metabolismo ósseo?)

7.2.1 Abstract:

Background: Obesity negatively affects the relationship between markers and micronutrients of bone metabolism. **Objective:** The hypothesis that the metabolically healthy obese phenotype might be protected from those alterations was the aim of this study. **Methods:** A cross-sectional study was carried out in adults with class III obesity classified in Metabolically Healthy Obese (MHO) and Metabolically Unhealthy Obese (MUHO), according to the NCEP ATP III criteria. Anthropometric, biochemical and clinical variables were analyzed for sample characterization. To evaluate bone metabolism, markers (alkaline phosphatase and parathyroid hormone - PTH) and related nutrients (vitamin D, vitamin B12, calcium, phosphorus, magnesium, potassium and zinc) were analyzed. A total of 223 adults with class III obesity aged 41.20 ± 10.15 years were included. **Results:** The MHO phenotype was identified in 32.73% of the sample. After logistic regression, it was observed that inadequacies of calcium (OR: 4.11; 95% CI: 2.33 – 6.66), phosphorus (OR: 3.03; 95% CI: 1.98 - 5.79), vitamin D (OR: 5.01; 95% CI: 2.92 - 6.71) and PTH (OR: 5.45; 95% CI: 4.49 - 6.74) were significantly higher in the MUHO group compared to the MHO Group. **Conclusion:** This study showed that the MHO phenotype does not protect adults from alterations in markers and micronutrients of bone metabolism. However, the MUHO phenotype presents a higher risk for alterations related to bone metabolism which can favor the emergence of metabolic bone diseases.

Keywords: metabolically healthy phenotype; obesity; adult; bone metabolism; micronutrient

7.2.2 Introduction

The increasing prevalence of obesity in adults worldwide has been mainly occurring in class III obesity group, showing a rate significantly higher than rates observed in other obesity categories [1]. Obesity, because it is a metabolic disorder characterized by low-grade inflammation, is accompanied by major systemic modifications [2]. Recently, ample evidences have suggested the existence of a link between the pathophysiological mechanisms of obesity and those of other syndromes mainly related to the compromise of bone [3,4] and liver metabolism [5].

The hypothesis that obesity is related to the highest prevalence of metabolic bone diseases [3,4] has been confirmed. Most of these diseases are characterized by alterations in some biochemical markers (alkaline phosphatase, parathyroid hormone, vitamin D, calcium, phosphorus, etc.), regardless they are nutrients or not [6,7], influenced by the inflammatory profile of obesity involving hypersecretion of serum leptin [8], high concentrations of C-reactive protein [9], insulin resistance [10], among other inflammatory markers.

Although obesity is a risk factor for a series of metabolic complications, the phenotype known as Metabolically Healthy (MH) has suggested that individuals when classified as metabolically healthy obese (MHO) seem to be more protected from complications related to the severity of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD), insulin resistance (IR), alterations in lipid profile and inflammation markers, unlike those classified as Metabolically Unhealthy Obese (MUHO) [11,12]. Despite the differences between the studies [13,14] and the lack of standardization for the classification of the MH phenotype, different criteria for its identification have been adopted, and the most used in clinical practice and in epidemiologic researchers has been the one proposed by the Third Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (NCEP ATP III) [15], the same used to diagnose metabolic syndrome (MS). Although not included as one of the criteria for identifying MHO individuals, NAFLD, considered the MS liver manifestation [16], has been investigated in these individuals due to its association with obesity. Recent evidence has shown that MHO individuals have lower liver fat accumulation when compared to MUHO individuals [11], which is related to increased risk factors for alterations in markers and micronutrients involved in the bone metabolism [17] of obese adults.

The literature shows that adults with class III obesity are more prone to have alterations in their bone metabolism, observed from the modification of parameters of some biochemical

markers and from minor serum concentrations of micronutrients, which results in greater bone remodeling [6] in these individuals. Thus, it is important to evaluate the associations between metabolic alterations in obesity and serum concentrations of markers and micronutrients important to bone metabolism homeostasis, given their participation in essential metabolic and endocrine processes related to maintenance of bone health [7]. Yet to date, there is scarcity of reports in the literature that include data relating such aspects of bone metabolism to the metabolic abnormalities found in the MHO and MUHO phenotypes.

Given this, considering the increase in the prevalence of class III obesity in adults and the clinical importance of bone metabolic alterations related to the relationship with the MH phenotype, the objective of this study was to evaluate the association between the profile of markers and micronutrients of bone metabolism and body and biochemical variables of adults with class III obesity, classified according to the MHO and MUHO phenotypes established by the NCEP ATP III criteria.

7.2.3 Materials and Methods

7.2.3.1 Participants

Adults of both genders were included, aged ≥ 20 and <60 years and body mass index (BMI) ≥ 40 kg/m² (diagnosed with class III obesity). Exclusion criteria were: prior malabsorptive and restrictive surgeries, intestinal malabsorptive syndromes, neoplasia, use of drugs for weight loss, use of lipid lowering drugs, hypoglycemic drugs, alcohol intake exceeding 20g/day for women and 40g/day for men, use of multivitamin and mineral supplements, to be pregnant or a nursing mother, and presence of kidney failure and liver diseases, except NAFLD. This study was approved by the Research Ethics Committee of *Hospital Universitário Clementino Fraga Filho* (HUCFF) of the *Universidade Federal do Rio de Janeiro* (UFRJ) [Federal University of Rio de Janeiro] under the Scientific Advice nº 011/10 in accordance with Resolution nº 196 of the National Health Council. Inclusion of patients in the project was carried out through their formal authorization with the signing of the Informed Consent Form.

7.2.3.2 Study Design

This is a descriptive, cross-sectional study with a convenience sample including adults with class III obesity [18], attended at the Multidisciplinary Center for Bariatric and Metabolic Surgery in Rio de Janeiro – RJ, Brazil. Data collection occurred from November 2014 to July

2016. For classification of the metabolically healthy obese (MHO) phenotype, the criterion used was proposed by the Third Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (NCEP ATP III) [15]. The subjects who showed alterations in ≥ 3 of the following 5 criteria were considered metabolically unhealthy obese (MUHO): (1) waist circumference (WC) $>102\text{cm}$ for men and $>88\text{cm}$ for women; (2) fasting glucose $\geq 100 \text{ mg/dL}$; (3) fasting triglycerides $\geq 150 \text{ mg/dL}$; (4) High Density Lipoprotein (HDL) $<40\text{mg/dL}$ for men and $<50\text{mg/dL}$ for women; and (5) Blood Pressure $\geq 130/\geq 85 \text{ mmHg}$.

7.2.3.3 Measurements

Anthropometric, clinical and biochemical parameters were evaluated to characterize the sample and analyze the association among the markers of bone metabolism (regardless they are nutrients or not) with metabolic and bodily variables, according to MHO and MUHO classification. The anthropometric evaluation included the measurement of weight (using a Welmy electronic platform scale with maximum weighing capacity of 300 kg) and height (using a Sany stadiometer) for BMI calculation according to the World Health Organization (WHO) [19]; waist circumference (WC) was measured based on Lohman et al. [20] with cut off points according to the NCEP ATP III [15] and the visceral adiposity index (VAI) was calculated according to Amato et al. [21]. All measurements were performed in duplicate by a single trained observer and variations up to 0.5 cm were accepted and mean was calculated. Physical activity was evaluated through the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) in its short version [22] and volunteers were classified into sedentary, inadequately inactive, active or very active.

The clinical variables considered by the study were those determined from the frequencies of NAFLD and systemic hypertension (SH). Data on NAFLD and SH were obtained through the medical records of the patients. The diagnosis of NAFLD was determined by a complete abdominal ultrasound (CAU), conducted by a single physician with expertise on imaging diagnosis, following the methodology proposed by Pratt & Kaplan [23] using a unit C display, Philips® 2-5 MHz Convex transducer (Barueri, São Paulo, Brazil). SH was diagnosed by a professional expert, following the methodology proposed by the VII Brazilian Guidelines of Systemic Hypertension (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA – SBC, 2016) [24].

A total of 5 ml blood samples was obtained via venipuncture after 12 hours of fasting for biochemical evaluations to determine glucose and basal insulin, lipid profile, inflammatory

profile and markers and micronutrients related to bone metabolism. The overall analyses were performed in laboratory with certifications, in partnership with the Center for Research in Micronutrients of the Institute of Nutrition of the UFRJ and the Multidisciplinary Center for Metabolic and Bariatric Surgery. Blood glucose was obtained by the enzymatic colorimetric method. Basal insulin was quantified by reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) and the cutoff point adopted was 24.9 IU/mL. Insulin resistance was estimated by the formula of the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR), with ≥ 2.5 cutoff point [25]. The serum concentrations of total cholesterol and triglycerides were analyzed by the enzymatic colorimetric method, and the Low-Density Lipoprotein Cholesterol (LDL-c) and High-Density Lipoprotein Cholesterol (HDL-c) fractions were obtained by the selective inhibition method. The cutoff point for total cholesterol and fractions, triglycerides and fasting glucose were those established by the NCEP-ATP III criteria [15]. C-reactive protein (CRP) was quantified by the nephelometric method and the cutoff point to determine inflammation was >0.3 mg/dL [26].

Parathyroid hormone (PTH) was analyzed by the immunoenzymatic method by chemiluminescence [27] and serum alkaline phosphatase (AP) by the kinetic colorimetric enzymatic method [28], both with cutting points for inadequacy >53.0 pg/mL (secondary hyperparathyroidism) and <130.0 U/L, respectively. Serum vitamins were quantified by high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection method (HPLC-UV) (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil). Vitamin B12 cutoff point was <271 pg/mL [29]. The nutritional status of vitamin D was analyzed by the quantification of the serum concentrations of 25(OH)D, and cutoff points were ≤ 20 ng/mL (deficiency), ≥ 20 ng/mL and <29 ng/mL (insufficiency) and ≥ 30 ng/mL and <100 ng/mL (adequacy) [30]. For complementing vitamin D evaluation, a study on the sun exposure of the participants was carried out by the application of a protocol validated by Hanwell et al. [31]. Phosphorus, magnesium, potassium and zinc were the serum minerals quantified by the calorimetric method, with the cutoff points respectively for inadequacy <2.5 mg/dL [32], <1.7 mg/dL [33], <2.7 mEq/dL [34] and <70 mcg/dL [35]. The nutritional status of calcium was determined by quantification of serum concentrations of ionic calcium by direct dosage by selective electrode and the cutoff point for inadequacy was <4 mg/dL [34].

7.2.3.4. Statistical Analysis

Statistical analyzes were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) package for Windows version 21.0, IBM Corporation (Chicago IL, USA). To verify the

normality of the sample, the Kolmogorov-Smirnov test was performed. Continuous variables were expressed as mean and standard deviation. Clinical, biochemical, anthropometric parameters and markers of bone metabolism according to the MHO and MUHO phenotypes were compared using Student's t-test. The Pearson's chi-square test was applied to assess the categorical variables according to MHO and MUHO groups. Pearson's chi-square test was used to test the homogeneity of proportions among the categorical variables, and Pearson's Linear Correlation was used for the continuous variables. Multiple logistic regression analysis was performed to determine odds ratio (OR) of markers of bone metabolism altered by the metabolically healthy obese and metabolically unhealthy obese phenotypes. The significance level adopted was 5% ($p<0.05$).

7.2.4 Results

7.2.4.1 General characterization of the studied population

A total of 232 adults with obesity were recruited for study and were in the preoperative period of bariatric surgery. Of these, a total of 9 adults were excluded from the study because they did not meet any of the eligibility criteria, two of them being 60 years of age, 3 being diagnosed with class II obesity and the remainder because they had important information which could not be answered at the time of the consultation with the nutritionist for data collection. Thus, the sample was comprised 223 adults with class III obesity, mostly sedentary, 79.82%, with 76.23% females and 23.77% males, mean age of 41.20 ± 10.15 years, and no statistical difference between genders was observed. NAFLD was present in 97.58% of the studied sample.

With respect to the proportion of subjects in the study, 97.31% showed inadequacy of AP, 83.86% vitamin D deficiency, 79.82% inadequacy of PTH, 53.81% vitamin B12 deficiency, and 26.46% calcium deficiency (Figure 1). Sun exposure time (min) among the individuals with obesity was 13.2 ± 5.2 minutes/day, and no statistical difference was observed between them after their categorization into MHO and MUHO phenotypes.

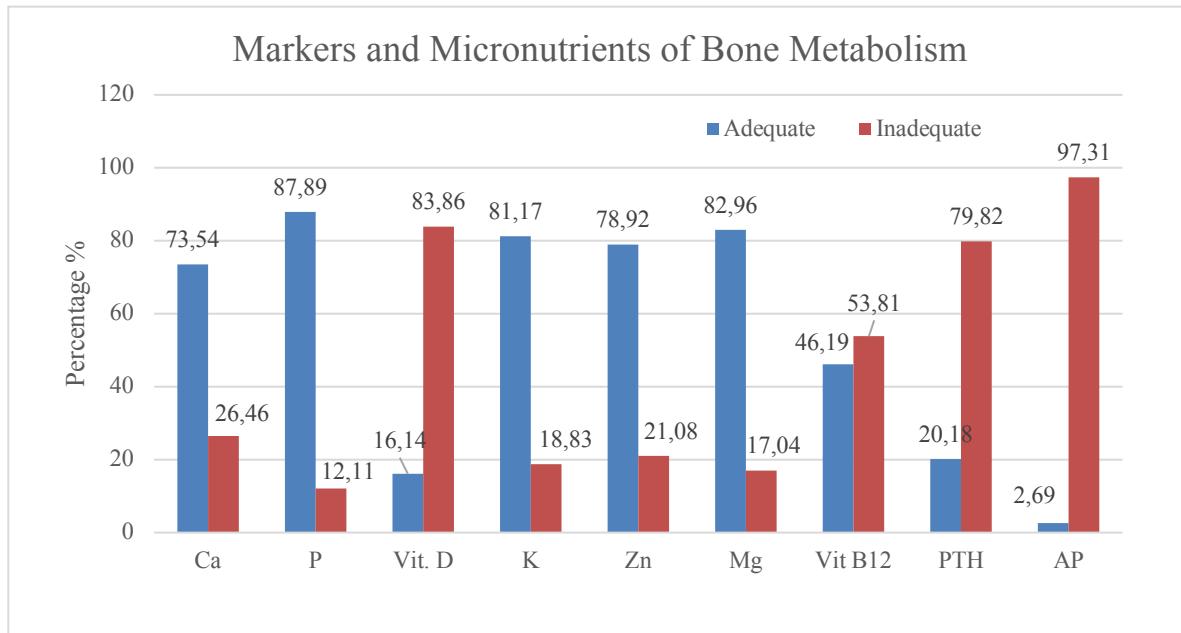


Figure 1. Frequency (%) of adequacy and inadequacy of markers and micronutrients of bone metabolism of the sample comprising 223 adults with obesity. Abbreviations: Ca: calcium; P: phosphorus; Vit. D: vitamin D; K: potassium; Zn: zinc; Mg: magnesium; Vit. B12: vitamin B12; PTH: Parathyroid hormone; AP: Alkaline Phosphatase.

7.2.4.2. Characterization of the population according to the MHO and MUHO phenotypes

Based on the NCEP-ATPIII criterion, the classification of subjects showed that 32.73% (73 out of 223) were categorized as MHO and 67.26% (150 out of 223) as MUHO. Mean age between the MHO and MUHO groups was 38.86 ± 10.65 and 42.34 ± 9.73 years ($p=0.020$) respectively, and a statistical difference was found between phenotypes.

Regarding the clinical, biochemical and anthropometric parameters of the MHO and MUHO groups (Table 1), statistically significant differences were found between the means of the 4.28 ± 3.56 and 7.93 ± 8.70 ($p=0.001$), of insulin (mg/dL) 16.36 ± 8.97 and 19.73 ± 11.67 ($p=0.018$) and HOMA-IR 3.74 ± 2.32 and 5.40 ± 4.22 ($p=0.002$) of the WHO and MUHO groups, respectively.

As for the other metabolic variables (clinical and biochemical) present in the NCEP-ATP III classification criteria, the prevalence of SH in the MHO group was significantly lower ($p<0.001$) when compared to the MUHO group where it reached 87%. Similarly, significantly lower values of fasting glucose (mg/dL) 91.03 ± 15.99 vs. 106.81 ± 30.42 ($p<0.001$) and TG (mg/dL) 123.04 ± 140.94 vs. 190.25 ± 239.38 ($p=0.009$) were found, in

addition to significantly higher concentrations of HDL-c (mg/dL) 52.25 ± 11.64 vs. 42.49 ± 8.96 ($p<0,001$) in the MHO group, when compared to the MUHO group.

We observed that the prevalence of NAFLD was significantly higher ($p<0,001$) in the MUHO group, when compared to the MHO (Table 1). In the analyzed profile of markers and micronutrients of bone metabolism selected for the study, AP showed a significant difference between the groups ($p=0.016$), lower in the MHO group (Table 2).

Table 1. Clinical, biochemical and anthropometric characteristics of the MHO and MUHO phenotype

General characteristics	MHO (n=73) Mean ± SD	MUHO (n=150) Mean ± SD	p-value	
Clinical variables				
Systolic H (mmHg)	123.36 ± 23.45	140.00 ± 30.47	0.001*	
Diastolic H (mmHg)	76.63 ± 18.09	90.29 ± 24.45	0.001*	
SH (%)	Yes No	35.60 (n=26) 64.40 (n=47)	87.30 (n=131) 12.70 (n=19)	0.001**
NAFLD (%)	Yes No	83.60 (n=61) 16.40 (n=12)	94.00 (n=141) 6.00 (n=9)	0.025**
Anthropometric variables				
Weight (Kg)	118.46 ± 16.30	118.04 ± 19.86	0.876	
Height (meters)	1.66 ± 0.08	1.66 ± 0.10	0.723	
BMI (Kg/m ²)	42.99 ± 4.48	42.51 ± 4.86	0.465	
AC (cm)	118.18 ± 11.72	120.54 ± 13.89	0.186	
VAI	4.28 ± 3.56	7.93 ± 8.70	0.001*	
Biochemical variables				
Glucose (mg/dL)	91.33 ± 15.99	106.81 ± 30.42	0.001*	
Insulin (mg/dL)	16.36 ± 8.97	19.73 ± 11.67	0.018*	
HOMA-IR	3.74 ± 2.32	5.40 ± 4.22	0.002*	
Total Cholesterol (mg/dL)	197.67 ± 36.07	199.06 ± 57.16	0.826	
LDL-c (mg/dL)	121.10 ± 31.61	120.31 ± 35.53	0.867	
HDL-c (mg/dL)	52.25 ± 11.64	42.49 ± 8.96	0.000*	
Triglycerides (mg/dL)	123.04 ± 140.94	190.25 ± 239.38	0.009*	
CRP (mg/dL)	0.88 ± 0.71	0.97 ± 0.93	0.427	

*t-Student test ($p<0.05$); **Pearson's Chi-Square (χ^2) Test ($p<0.05$); Abbreviations: SD: standard deviation; H: Hypertension; SH: Systemic Hypertension; NAFLD: Non-Alcoholic Fatty Liver Disease; BMI: Body Mass Index; AC: Abdominal Circumference; VAI: Visceral Adiposity Index; HOMA-IR: Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance; LDLc: Low Density Lipoprotein Cholesterol; HDL-c: High Density Lipoprotein Cholesterol; TG: Triglycerides; CRP: C-Reactive Protein.

Table 2. Profile of biomarkers and micronutrients of bone metabolism according to the MHO and MUHO phenotypes

Variables	MHO (n=73)	MUHO (n=150)	p-value
	Mean ± SD	Mean ± SD	
Calcium (mg/dL)	3.91 ± 1.40	3.906 ± 1.87	0.987
Phosphorus (mg/dL)	3.58 ± 0.58	3.65 ± 0.63	0.799
25(OH)D (ng/mL)	22.33 ± 7.79	22.69 ± 8.31	0.747
Potassium (mg/dL)	5.26 ± 6.90	4.69 ± 4.84	0.527
Zinc (mg/dL)	99.97 ± 32.34	99.94 ± 27.28	0.994
Magnesium (mg/dL)	2.04 ± 0.15	2.00 ± 0.20	0.168
Vitamin B12 (pg/mL)	370.55 ± 200.59	344.15 ± 183.45	0.345
PTH (pg/mL)	42.09 ± 18.13	42.79 ± 16.08	0.779
AP (U/L)	70.56 ± 27.57	80.11 ± 27.56	0.016*

t-Student test ($p<0.05$). Abbreviations: SD: Standard Deviation; 25(OH)D: Vitamin D; PTH: Parathyroid hormone; AP: Alkaline Phosphatase.

7.2.4.3. Association and odds ratio (OR) of the markers of bone metabolism, according to the MHO and MUHO phenotypes

We observed a statistically significant difference ($p=0.031$) in relation to the inadequacy of PTH between the groups that was lower in the MHO group, 12% (n=9), when compared to the MUHO group, 24% (n=38). No association between the phenotypes was found with the other evaluated markers (Table 3).

Table 3. Association between markers and micronutrients of bone metabolism according to the MHO and MUHO phenotypes

Variables		MHO (n=73)	MUHO (n= 150)	p-value
Calcium (%)	Adequate	79.5 (n=58)	70.70 (n=106)	0.108
	Inadequate	20.5 (n=15)	29.3 (n=44)	
Phosphorus (%)	Adequate	89.0 (n=65)	87.3 (n=131)	0.449
	Inadequate	11.0 (n=8)	12.7 (n=19)	
	Deficient	38.4 (n=28)	39.3 (n=59)	
25(OH)D (%)	Insufficient	47.9 (n=35)	43.3 (n=65)	0.720
	Sufficient	13.7 (n=10)	17.4 (n=26)	
	Inadequate	38.4 (n=28)	39.3 (n=59)	
Potassium (%)	Adequate	84.9 (n=62)	79.3 (n=119)	0.207
	Inadequate	15.1 (n=11)	20.7 (n=31)	
Zinc (%)	Adequate	75.3 (n=55)	80.7 (n=121)	0.228
	Inadequate	24.7 (n=18)	19.3 (n=29)	
Magnesium (%)	Adequate	89.0 (n=65)	80.0 (n=120)	0.064
	Inadequate	11.0 (n=8)	20.0 (n=30)	
Vitamin B12 (%)	Adequate	42.5 (n=31)	48.0 (n=72)	0.263
	Inadequate	57.5 (n=42)	52.0 (n=78)	
PTH (%)	Yes	12.3 (n=9)	24.0 (n=36)	0.029*
	No	87.7 (n=64)	76.0 (n=114)	
AP (%)	Altered	2.7 (n=2)	2.70 (n=4)	0.640
	Unaltered	97.3 (n=71)	97.3 (n=146)	

*Pearson's Chi-Square (χ^2) Test ($p<0.05$). 25(OH)D:Vitamin D; PTH: Parathyroid Hormone (Yes or No for Hyper-Parathyroidism); AP: Alkaline Phosphatase

To investigate the risk factors for alteration in bone metabolism according to phenotypes, a logistical regression analysis was performed, adjusted for confounding variables (age, gender, physical activity and NAFLD). The MUHO phenotype was more associated with risk factors for alteration in markers and micronutrients of bone metabolism. This association remained even after adjusting clinical and biochemical variables and pathological diagnosis, the OR of the MUHO group for inadequacy of calcium (OR: 4.11; 95% CI: 2.33 - 6.66), phosphorus (OR: 3.03; 95% CI: 1.98 - 5.79) vitamin D (OR: 5.01; 95% CI: 2.92 - 6.71) and PTH (OR: 5.45, 95% CI: 4.49 - 6.74) were significantly higher compared to the MHO group (Table 4).

Table 4. Risk factors for alteration in bone metabolism according to the MHO and MUHO phenotypes

Variables	MHO (n=73)	MUHO (n=150)
	AOR	AOR
Calcium	3.13 [2.23 - 6.01]	4.11* [2.33 - 6.66]
Phosphorus	2.03 [0.88 - 4.69]	3.03* [1.98 - 5.79]
25(OH)D	2.89 [1.92 - 3.98]	5.01* [2.92 - 6.71]
Potassium	1.17 [0.48 - 2.83]	1.71 [0.69 - 3.07]
Zinc	1.97 [0.91 - 2.91]	1.85 [0.87 - 3.91]
Magnesium	1.09 [0.93 - 1.99]	3.50 [2.03 - 4.77]
Vitamin B12	0.89 [1.12 - 3.42]	2.51 [1.56 - 5.41]
PTH	5.11 [4.12 - 6.48]	5.45* [4.49 - 6.74]
AP	2.31 [0.88 - 4.68]	2.00 [0.68 - 4.68]

AOR: Adjusted Odds Ratio (95% Confidence Interval) adjusted for age; gender; physical activity; hepatic steatosis. All variables had a significant association with $p<0.05$.

7.2.5 Discussion

This study presents two main findings. First, individuals with obesity, regardless of their classification into MHO or MUHO phenotypes, showed associations with alterations in the investigated markers and micronutrients of bone metabolism. Secondly, the combination of obesity with the metabolically unhealthy status has raised the risk for alterations in these markers and micronutrients which are important for bone metabolism. The strong point in our

study is to have been the first to report the relationship between the MH phenotype and a set of biochemical variables important to bone health in individuals with class III obesity, since it the previous publications in the literature have evaluated classes I or II obesity and correlated the MH phenotype with diabetes mellitus [35], SH [36], NAFLD [11,37], cardiovascular diseases [38,39,40], and with lower risk of mortality [41]. However, we assume as one of our limitations the absence of some variables (bone mineral density, vitamin K and osteocalcin, for example) related to the bone-metabolic and bone-muscle profile of the investigated sample. Even so, we believe that the set of biochemical markers (nutrients or not) selected here for study was able to demonstrate how relevant they are and how important is the role they play in the mechanisms related to the maintenance of bone health and prevention of various diseases, especially those of bone-metabolic and muscular nature, as it has been pointed out by several epidemiological studies cited here.

7.2.5.1. General characterization of the population, according to the MHO and MUHO phenotypes

The prevalence of the MHO phenotype found in our study was 32.73%. Evidence has shown that 20-30% of obese individuals are classified as MHO [42]. Other authors have described frequencies of 14.9% [43], 19.5% [36] and 36.6% [44]. Nonetheless, in these studies, different classes of obesity were evaluated using distinct methods for the classification of the MH phenotype, which could also justify the differences found.

Although both phenotypes showed significant inadequacy in four of the five variables comprising the NCEP-ATP III classification criterion (Table 1) except for AC, which we believe has not been deferred since the study comprises individuals with class III obesity [45] (Table 1). SH was the most strongly variable associated with the MH phenotype with high prevalence (87%) among the MUHO group. Our results corroborate previous findings [36,42,46]. Current evidence [37,46] also suggests that there are additional clinical characteristics of MHO that include the importance of lipid, hepatic and inflammatory profiles in relation to the MH phenotype.

We found a high frequency (90.58%) of NAFLD, mainly in the MUHO group (94%), which suggests the existence of an important relationship with the MH phenotype, particularly if considering that liver fat content as a marker that has been highlighted in the context of the definition of this phenotype. However, it was not possible to further investigate these results since the diagnosis of NAFLD was carried out by abdominal US with no possibility of evaluation of its severity.

Individuals with obesity present different patterns of body fat distribution related to distinct metabolic phenotypes [47]. In our study we found significantly smaller values of VAI in the MHO group, when compared to the MUHO. This finding suggests a difference between the MHO and MUHO phenotypes in what concerns the site of the largest body fat deposit.

In addition, the other differences in the clinical and metabolic profile observed in our study, such as the one verified in relation to the HOMA-IR parameter (Table 1), can be justified through several mechanisms not yet clarified for interaction between genetic, environmental, and behavioral^{39,44,47}.

7.2.5.2 Characterization of biochemical markers of bone metabolism, according to the MHO and MUHO phenotypes

When we compared the profile of markers of bone metabolism, we observed that AP was related to the MH phenotype. Higher plasma concentrations of the marker were observed in the most compromised metabolic phenotype, MUHO (Table 2). AP is a marker of bone formation. When it is present at elevated levels on the surface of the cytoplasmic membranes of osteoblasts and pre-osteoblasts, AP contributes to the beginning of mineralization and the progressive growth of hydroxyapatite crystals [48]. In individuals with class III obesity, this alteration is usual [49]. This marker tends to be in greater concentration when there is vitamin D deficiency. Besides, it is still influenced by the homeostasis of PTH, calcium and vitamin D [50,51]. Alterations in this triad of markers and micronutrients have been associated with unfavorable metabolic outcomes in relation to bone [52,53] and hepatic health [45,54]. Therefore, even though the other markers did not differ in the MHO and MUHO phenotypes, we believe it is important to further evaluate the significance of the observed alterations, as they are markers of increased bone remodeling.

7.2.5.3. Association and odds ratio of markers and micronutrients of bone metabolism, according to the MHO and MUHO phenotypes

Independently of the MHO and MUHO phenotypes, we observed high frequencies of inadequacy, mainly of AP and PTH markers, in addition to vitamin D, vitamin B12 and calcium (Figure 1). Obesity *per se* can alter the production pattern of biochemical markers of bone metabolism, regardless they are nutrients or not, as they depict bone formation or reabsorption [55,56]. Such inadequacies often occur in individuals with class III obesity [52,57,58]. They are related to pathogenesis of various diseases, including bone-metabolic diseases, bone-muscle diseases [53,59] and NAFLD [54].

Considering the high prevalence of NAFLD in our subjects, mainly in the MUHO group (94%), we assume it may be related to alterations in some of these evaluated markers, especially vitamin D deficiency [45,60], since the first hydroxylation of this vitamin occurs in the liver and when this organ is functionally compromised it can interfere in the metabolism of vitamin D, and consequently, in its bioavailability. Regarding micronutrient deficiencies, our findings are also in line with previous studies [61,62] that have pointed out that vitamins (vitamin D and vitamin B12) and minerals (calcium, phosphorus, potassium, zinc and magnesium) are often inadequate in adults with obesity. We also observed varying degrees of deficiency in all these micronutrients, although no significant difference was found according to the MHO and MUHO phenotypes (Table 3). However, after logistic regression and adjustments in confounding factors, the MUHO phenotype presented high and significant values of OR for calcium (OR: 4.11*; 95% CI: 2.33* – 6.66), phosphorus (OR: 3.03; 95% CI: 1.98 - 5.79) and vitamin D (OR: 5.01*; 95% CI: 2.92 - 6.71) that have been associated with the greatest risk for alteration in bone metabolism (Table 4).

Several studies indicate that deficiencies of calcium, vitamin D and phosphorus in the long term, especially when associated with obesity as we observed in our study, increase the risk of fractures and can also be associated with the greater prevalence of osteoporosis, osteoarthritis, sarcopenia [52,53,63], in addition to osteosarcopenic obesity [59,64]. After adjusting for age, gender, physical activity and presence of NAFLD, we observed association between calcium, vitamin D and phosphorus in the MUHO phenotype, thus showing that such variables appear to have been influenced by the most compromised metabolic profile. These findings are of great relevance since vitamin D is necessary to maintain normal levels of calcium and phosphorus which in turn are necessary for proper bone mineralization, among many other functions [65]. Its deficiency was related to loss of bone mass in individuals with obesity [66]. Vitamin D deficiency causes increased bone turnover, with increase in markers such as alkaline phosphatase, as we observed in our study, and it is associated with increase in fracture risk [52].

Inadequacy of PTH was the only variable associated with the MH phenotype (Table 3). We found significantly higher inadequacy of this hormone in the MUHO group, with a prevalence of 24% of secondary hyperparathyroidism. Besides, this group showed significantly greater risk for alteration in PTH (OR: 5.45; 95% CI: 4.49 - 6.74) when compared to the MHO group (OR: 5.11; 95% CI: 4.12 - 6.48), thus reinforcing the relationship with the MH phenotype (Table 4). Secondary hyperparathyroidism is very frequent mainly in individuals with class III obesity and it courses with other nutritional deficiencies [58,67], as we found in our study.

Vitamin D and calcium deficiencies and hormonal alterations such as secondary hyperparathyroidism when untreated result in bone diseases [49,68]. Based on our findings, we postulate that obesity *per se* already promotes detrimental alterations in markers of bone metabolism independently of the MH phenotype. Our findings also emphasize the importance of considering this phenotype, especially when it is associated with class III obesity, in order to subsidize nutritional interventions in clinical practice, considering the differences observed between the metabolic profiles of the MHO and MUHO phenotypes that were studied.

7.2.6 Conclusions

The Metabolically Healthy Obesity Phenotype does not protect adults with class III obesity from developing biochemical alterations related to bone metabolism. Nonetheless, this class of obesity, when associated with the Metabolically Unhealthy Phenotype, presents a higher risk for alterations of PTH, Calcium, Vitamin D and Phosphorus, thus favoring the emergence of metabolic bone diseases. We suggest the conduction of new studies, preferably with follow-ups, to deeply investigate the significance of our findings, pointing out the possible trigger factors for the alterations encountered and their real impact on the bone health of adults with obesity. In this way, strategies in clinical practice can be adopted in order to minimize such undesirable effects on this population.

7.2.7 Patents

Acknowledgments: The authors acknowledge the support received from *Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro* (FAPERJ) [Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support of the State of Rio de Janeiro] (Scientist of Our State) and from *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) [National Council for Scientific and Technological Development].

Author Contributions: A.R. conceived and designed the experiments; L.M.L., S.P. and C.S. performed the experiments; R.M. analyzed the data; L.M.L., S.L. and A.R wrote the paper.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

7.2.8 References

1. World Health Organization (WHO). Fact sheet: obesity and overweight, n. 311, **2015**. Available online: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>>. (Accessed Jun 06, 2016)

2. World Health Organization (WHO). Fact sheet: obesity and overweight, n. 311, **2011**. Available online: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. (Accessed May 28, 2016).
3. Demirag, M. D.; Ozkan, S.; Haznedaroglu, S., et al. Associations between obesity and the radiographic phenotype in knee osteoarthritis. *Turkish Journal of Medical Sciences*, Apr. **2017**, v. 47, n. 2, p. 424-429.
4. Murray, T. É.; Williams, D.; Lee, M.J. Osteoporosis, obesity, and sarcopenia on abdominal CT: a review of epidemiology, diagnostic criteria, and management strategies for the reporting radiologist. *Abdominal Radiology* (New York), Aug. **2017**.
5. Fazel, Y.; Koenig, A.B., Sayiner, M., et al. Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease. *Metabolism*, Aug. **2016**, v. 65, n. 8, p. 1017–25.
6. Fischer, V.; Haffnet-Luntzer, M.; Prystaz, K.; et al. Calcium and vitamin-D deficiency marginally impairs fracture healing but aggravates posttraumatic bone loss in osteoporotic mice. *Scientific Reports (Nature)*, Aug. **2017**, vol. 7, p. 7223.
7. Ormsbee, M. J.; Prado, C. M.; Illich, J. Z., et al. Osteosarcopenic obesity: the role of bone, muscle, and fat on health. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, Sept. **2014**, v. 5, n. 3, p.183–192.
8. Kohora, K.; Ochi, M.; Tabara, Y., et al. Leptin in sarcopenic visceral obesity: possible link between adipocytes and myocytes. *PLoS One*, Sept. **2011**, v. 6, n. 9, p. e24633.
9. Yang, C. W., Li, C. I.; Li, T. C., et al. Association of Sarcopenic Obesity with Higher Serum High-Sensitivity C-Reactive Protein Levels in Chinese Older Males - A Community-Based Study (Taichung Community Health Study-Elderly, TCHS-E). *PLoS One*, July **2015**, v. 10, n. 7, p. e0132908.
10. Levine, M. E.; Crimmins, E. M. The impact of insulin resistance and inflammation on the association between sarcopenic obesity and physical functioning. *Obesity (Silver Spring)*. Oct. **2012**, v. 20, n. 10, p. 2101-6.
11. Gutiérrez-Groba, Y.; Juárez-Hernández, E., Sánchez-Jiménez, B. A., et al. Less liver fibrosis in metabolically healthy compared with metabolically unhealthy obese patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes & Metabolism*, **2017**.
12. Abenavoli, L.; Peta, V. Role of adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Reviews on Recent Clinical Trials*, **2014**, v. 9, n. 3, p. 134-140.
13. Pujia, A.; Gazzaruso, C.; Ferro, Y., et al. Individuals with Metabolically Healthy Overweight/Obesity Have Higher Fat Utilization than Metabolically Unhealthy Individuals. *Nutrients*, Jan. **2016**, v. 8, n. 1, p. 2.

14. Lee, T. H.; Jeon, W. S.; Han, K. J., et al. Comparison of Serum Adipocytokine Levels according to Metabolic Health and Obesity Status. *Endocrinology and Metabolism*, June **2015**, v. 30, n. 2, p.185-194.
15. Grundy, S. M.; Cleeman, J. I.; Bairey Merz, C. N., et al. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Circulation*, Aug. **2004**, v. 110, n. 2, p. 227–239.
16. Saeed, A.; Dullaart, R. P. F.; Schreuder, H. B.; Faber, K. N. Disturbed Vitamin A Metabolism in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD), *Nutrients*, **2018**, v. 10, n. 29.
17. Díez-Rodríguez, R.; Ballesteros, P. M. D.; Calleja, F. A., et al. Vitamin D levels and bone turnover markers are not related to non-alcoholic fatty liver disease in severely obese patients. *Nutrición Hospitalaria*, Dec. **2014**, v. 30, n. 6, p. 1256-1262.
18. World Health Organization (WHO) Obesity: preventing and managing the global epidemic. Geneva: WHO, **2004**.
19. World Health Organization (WHO). The world health report 2001 - Mental Health: New Understanding, New Hope, **2001**. Available online: <<http://www.who.int/whr/2001/en/>>. (Accessed June 29, 2016).
20. Lohman, T.; Caballero, B.; Davis, S. Pathways: A school-based program for the primary prevention of obesity in American Indian children. *J Nutr Sept.* **1998**.
21. Amato, M. C.; Giordano, C.; Galia, M., et al. Visceral adiposity index: a reliable indicator of visceral fat function associated with cardiometabolic risk. *Diabetes Care*, Apr. **2010**, v. 33, n. 4, p. 920–922.
22. Craig CL, Marshall AL, Sjostrom M, et al. International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. *MedSci Sports Exerc.* **2003**.
23. Pratt, D. S.; Kaplan, M. M. Avaliação da função hepática. In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson LR, editors. *Harrison medicina interna*.**2002,15th ed.** Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, p. 1813-6.
24. SBC (Sociedade Brasileira de Cardiologia). VII Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. **2016**. Available online: <http://publicacoes.cardiol.br/2014/diretrizes/2016/05_HIPERTENSAO_ARTERIAL.pdf> (Accessed May 28, 2016).
25. Durward, C. M.; Hartman, T.J.; Nickols-Richardson, S.M. All-cause mortality risk of metabolically healthy obese individuals in NHANES III. *J Obes.* **2012**.

26. Pearson, T. A.; Mensah, G. A.; Alexander, R. W., et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: Application to clinical and public health practice: A Statement for Healthcare Professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation*, Jan. **2003**, v. 107, p. 499-511.
27. Kao, P. C. Parathyroid hormone assay. *Mayo Clin Proc*. Sept. **1982**.
28. Bramer, J. A.; Abudu, A. A.; Tillman, R. M., et al. Pre and post chemotherapy alkaline phosphatase levels as prognostic indicators in adults with localized osteosarcoma. *Eur J Cancer*. Dec. **2005**.
29. Carmel, R.; Green, R.; Rosenblatt, DS., et al. Update on cobalamin, folate, and homocysteine. *Hematology. American Society of Hematology EducationProgram*, **2003**, p. 62-81.
30. Holick, M. F.; Chen, T. C. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Apr. **2008**, v. 87, n. 4.
31. Hanwell, H. E. C.; Vieth, R.; Cole, D. E., et al. Sun exposure questionnaire predicts circulating 25-hydroxyvitamin D concentrations in Caucasian hospital workers in southern Italy. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, July **2010**, v. 121, n. 1-2, p. 334–337.
32. Daly, J. A.; Erttingshausen, G. Direct method for determining inorganic phosphate in serum with the “CentriflChem”. *Clinical Chemistry*, Mar. **1972**, v. 18, n. 3, p. 263-5.
33. Lowenstein, F. W.; Stanton, M. F. Serum magnesium levels in the United States, 1971 – 1974. *Journal of the American College of Nutrition*, **1986**, v. 5, n. 4, p. 399 – 414.
34. World Health Organization (WHO). The World Health Report, Fighting disease, Fostering Development. **1996**. Available online: <www.who.int/whr/1996/en/>. (Accessed June 6, 2016).
35. Chang, Y.; Jung, H.S.; Zhang, Y., et al. Metabolically healthy obesity and the development of nonalcoholic fatty liver disease. *The American Journal of Gastroenterology*, Aug. **2016**, v. 111, n. 8.
36. Latifi, S. M., Karandish, M., Shahbazian, H., et al. Prevalence of Metabolically Healthy Obesity (MHO) and its relation with incidence of metabolic syndrome, hypertension and type 2 Diabetes amongst individuals aged over 20 years in Ahvaz: A 5 Year cohort Study (2009–2014). *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, **2017**.

37. Huh, J. H.; Kim, K. J., Kim, S. U., et al. Obesity is more closely related with hepatic steatosis and fibrosis measured by transient elastography than metabolic health status. *Metabolism*, Jan. **2017**, v. 66, p. 23-31.
38. Yoon, J. W., Jung, C. H., Kim, M. K., et al. Influence of the definition of "metabolically healthy obesity" on the progression of coronary artery calcification. *Plos One*, June **2017**.
39. Gonçalvez, C. G.; Glade, M. J.; Meguid, M. M., et al. Metabolically healthy obese individuals: Key protective factors. *Nutrition*, Jan. **2016**, v. 32, n. 1, p. 14–20.
40. Gasevic, D.; Carlsson, A. C.; Lesser, I. A., et al. The association between “hypertriglyceridemic waist” and sub-clinical atherosclerosis in a multiethnic population: a cross-sectional study. *Lipids in Health and Disease*, **2014**, v. 13, p. 38.
41. Camhi, S. M.; Katzmarzyk, P. T. Differences in Body Composition Between Metabolically Healthy Obese and Metabolically Abnormal Obese Adults. *International Journal of Obesity*, Aug. **2014**, v. 38, n. 8, p. 1142–1145.
42. Goday, A.; Calvo, E.; Vázquez, L. A., et al. Prevalence and clinical characteristics of metabolically healthy obese individuals and other obese/non-obese metabolic phenotypes in a working population: results from the Icaria study. *BMC Public Health*, **2016**, v. 16, p. 248.
43. Hwang, Y. C.; Hayashi, T.; Fujimoto, W. Y., et al. Visceral abdominal fat accumulation predicts the conversion of metabolically healthy obese subjects to an unhealthy phenotype. *International Journal of Obesity*, Sept. **2015**, v. 39, n. 9, p. 1365–1370.
44. Phillips, C. M. Metabolically healthy obesity: definitions, determinants and clinical implications. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, Sept. **2013**, vol. 14, n. 3, p. 219–27.
45. Cordeiro, A.; Pereira, A.; Saboya, C. J., et al. Relationship between Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Vitamin D Nutritional Status in Extreme Obesity. *Canadian Journal of Gastroenterol & Hepatology*, June **2017**, vol. 2017.
46. Diniz, M. F. H.; Beleigoli, A. M. R.; Ribeiro, A. L. P., et al. Factors associated with metabolically healthy status in obesity, overweight, and normal weight at baseline of ELSA-Brasil. *Medicine*, May. **2016**, v. 95, p. 27.
47. Stefan, N.; Haring, H. U.; Hu, F. B., et al. Metabolically healthy obesity: epidemiology, mechanisms, and clinical implications. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, Oct. **2013**, vol. 1, n. 2, p. 152-62.

48. Kini, U.; Nandeesh, B.N. Physiology of bone formation, remodeling, and metabolism. *Springer Verlag Berlin Heidelberg*, **2012**.
49. Bordalo, L. A.; Mourão, D. M.; Bressan, J. Deficiências nutricionais após a cirurgia bariátrica. Por que ocorrem? *Acta Medica Portuguesa*, Dec. **2011**, vol. 24, n. S4, p. 1021-1028.
50. Christakos, S.; Dhawan, P.; Porta, A., et al. Vitamin D and intestinal calcium absorption. *Molecular and Cellular Endocrinology*, Dec. **2011**, v. 347, n. 1-2, p. 25–29.
51. Saraiva, G. L.; Larazetti-Castro, M. Marcadores Bioquímicos da Remodelação Óssea na Prática Clínica. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, Feb. **2002**, v. 46, n. 1, p. 72-8.
52. Walsh, J. S.; Bowles, S.; Evans, A. L. Vitamin D in obesity. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, **2017**, v. 24, p. 000 – 000.
53. Shimizu, Y.; Kim, H.; Yoshida, H., et al. Serum 25-hydroxyvitamin D level risk of falls in Japanese community-dwelling elderly women: a 1-year follow-up study. *Osteoporos Int.* **2015**.
54. Severson, T. J.; Bessur, S.; Bonkovsky, H. L., et al. Genetic factors that affect nonalcoholic fatty liver disease: A systematic clinical review. *The World Journal of Gastroenterology*, Aug. **2016**, v. 22, n. 29, p. 6742–6756.
55. Magain, A. C.; Richard, T.; De Becker, B., et al. Complications non-chirurgica les de la chirurgie bariatrique: à propos de quatre cas retrouvés dans la littérature. *Revue Médical e de Bruxelles*, Jan.-Feb., **2016**, v. 37, n. 1, p. 26-34.
56. Prince, R. L.; Glendenning, P. What is the therapeutic target level of 25-hydroxyvitamin D in osteoporosis and how accurately can we measure it? *Intern Med J.* Oct. **2012**.
57. Himbert, C.; Ose, J.; Delphan, M., et al. A systematic review of the interrelation between diet and surgery-induced weight loss and vitamin D status. *Nutrition Research*, Feb. **2017**, v. 38, p. 13–26.
58. Wolf, E.; Utech, M.; Stehle, P., et al. Preoperative micronutrient status in morbidly obese patients before undergoing bariatric surgery: results of a cross-sectional study. *Surgery for Obesity and Related Diseases*, Sept./Oct. **2015**, v. 11, n. 5, p. 1157–1163.
59. Kim, T. N., Park, M. S.; Lim, K. I., et al. Relationships between sarcopenic obesity and insulin resistance, inflammation, and vitamin D status: the Korean Sarcopenic Obesity Study. *Clinical endocrinology (Oxford)*, Apr. **2013**, v. 78, n. 4, p. 525-32.

60. Bellia, A., Marinoni, G.; D'Adamo, M., et al. Parathyroid Hormone and Insulin Resistance in Distinct Phenotypes of Severe Obesity: A Cross-Sectional Analysis in Middle-Aged Men and Premenopausal Women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Dec. **2012**, v. 97, n. 12, p. 4724–4732.
61. Kelly, O. J.; Gilman, J. C.; Kim, Y., et al. Micronutrient intake in the etiology, prevention and treatment of osteosarcopenic obesity. *Current Aging Science*, May. **2016**, v. 9, n. 4, p. 260-268.
62. Wimalawansa, S. J. Vitamin D deficiency is a surrogate marker for visceral Fat content, metabolic syndrome, Type 2 Diabetes, and Future Metabolic Complications. *Journal of Diabetes, Metabolic Disorders & Control*, Feb. **2016**, v. 3, n. 1, p. 00059.
63. Aung, K. Review: In postmenopausal women and older men, vitamin D plus calcium reduces some fractures. *Annals of Internal Medicine*, Sept. **2014**, v. 161, n. 6, p. JC5.
64. Choi, K. M. Sarcopenia and sarcopenic obesity. *The Korean Journal of Internal Medicine*, Nov. **2016**, v. 31, n. 6, p. 1054-1060.
65. Craney, A. Effectiveness and safety of vitamin D in relation to bone health. *Evidence Report/Technology Assessment (Full Rep)*, Aug. **2007**, v. 158, p. 1-235.
66. Hirani, V.; Cimming, R. G.; Naganathan, V., et al. Longitudinal Associations Between Vitamin D Metabolites and Sarcopenia in Older Australian men: The Concord Health and Aging in Men Project. *The Journal of Gerontology, Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, May. **2017**, v. 00, n. 00, p. 1-8.
67. Verheyen, N. Relationship between bone turnover and left ventricular function in primary hyperparathyroidism: The EPATH trial. *PLoS One*, Apr. **2017**, v. 12, n. 4, p. e0173799.
68. Bano, G.; Trevisan, C.; Carraro, S., et al. Inflammation and sarcopenia: A systematic review and meta-analysis. *Maturitas*, Feb. **2017**, v. 96, p. 10-15.

© 2018 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

7.3 Artigo 3.

Loureiro, LM. et al. Relationship between the biomarkers of bone metabolism and hepatic enzymes according to the stage of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and the Metabolically Healthy Obesity Phenotype

Artigo aceito pelo periódico Hepatic Medicine: Evidence and Research
(Anexo 8)

7.3.1 Abstract:

Objective: To analyze the relationship between the biochemical markers of bone and hepatic metabolism in different stages of NAFLD according to the metabolically healthy obesity phenotype (MHO). **Methodology:** This is a cross-sectional study with Class III obese individuals metabolically classified according to the obesity phenotypes proposed by the NCEP ATP III criteria. Biochemical and anthropometric variables were analyzed according to the staging of NAFLD, obtained by biopsy. Statistical tests were used considering a 5% significance level **Results:** A total of 50 subjects with NAFLD, 62% (n=31) with steatosis and 38% (n=19) with steatohepatitis without fibrosis; 36% were classified as MHO and 64% as MUHO, respectively. Mean values of alkaline phosphatase were 85.44 ± 27.27 vs. 61.92 ± 17.57 ($p=0.006$); gamma-glutamyl transpeptidase, 25.77 ± 15.36 vs. 30.63 ± 19.49 ($p=0.025$); and albumin, 3.99 ± 0.34 vs. 4.24 ± 0.23 ($p=0.037$), were lower and statistically significant in the MHO group with steatosis. No significant statistical differences were found between the MHO and MUHO phenotypes when compared to other parameters and degrees of staging of NAFLD. **Conclusion:** MHO individuals with steatosis present lower severe changes related to markers of liver damage and function, as well to those related to bone metabolism when compared to MUHO individuals.

Keywords: obese; phenotype; bone markers; liver function indicator; NAFLD.

7.3.2 Introduction

Obesity is a worldwide epidemic¹ and the class III obesity has become the most prominent metabolic disorder in recent years.² Many metabolic disorders are favored by the

inflammatory profile of obesity, but also by nutritional deficits³, especially related to micronutrients (such as vitamin D, calcium and others)^{4,5}, enzymatic and hormonal alterations^{6,7, 8, 9, 10, 11, 12} many metabolic disorders are favored, include body and systemic changes, as abdominal adiposity, dyslipidemia, hyperglycemia, hypertension, insulin resistance, as well as increased inflammatory status¹³. Among those individuals with severe obesity¹⁴⁻¹⁵, such disorders have led to the increased prevalence of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and bone metabolic diseases. Several recent studies, however, have shown that obesity could independently contribute to the development of NAFLD. Beyond the clinical relevance of obesity, the concept of being metabolically healthy (MHO) or unhealthy obese (MUHO) according to the NCEP-ATP III criteria, rooted from the characteristics of metabolic syndrome, has recently gained highlight after adopting the notion that an individual can exhibit an obese phenotype that appears to be more protected from the metabolic changes since such individual presents the metabolically healthy obesity phenotype (MHO). showing excess body fat, such individuals have a less compromised metabolic profile than those classified into the metabolically unhealthy obesity phenotype (MUHO).¹⁶

Many studies have investigated the clinical relevance of MHO and MUHO phenotypes using various biomarkers and diseases such as type 2 diabetes¹⁷, atherosclerosis, cardiovascular diseases¹⁸, chronic kidney diseases and others^{9,19-20}.

NAFLD one of the most frequent chronic liver diseases, present in about 90% of class III obesity individuals^{20, 21}. In fact, obesity is a well-known risk factor in the histological spectrum variations of NAFLD. However, it is unclear whether the impact of obesity on the staging of this liver disease can occur independently of metabolic changes, such as hyperglycemia, systemic arterial hypertension and dyslipidemia²².

In view of the need for further studies that evaluate the different profiles in the obesity phenotypes (MHO and MUHO) and their influence on NAFLD, especially in its different degrees of staging, the objective of the present study was to analyze the relationship between biochemical and anthropometric variables in different degrees of staging of NAFLD in adults with class III obesity classified according to the MHO and MUHO phenotypes, with the aim of identifying possible differences that may support more assertive intervention strategies for these individuals in a clinical practice

7.3.3 Material and methods

7.3.3.1 Study design and population

This is a descriptive, cross-sectional study with a convenience sample. Subsequently, a systematic sampling technique was applied to obtain a sub-sample with liver biopsy data, including adults with class III obesity²³, with a diagnosis of NAFLD with grading and staging by liver biopsy, attended at the Multidisciplinary Center for Bariatric and Metabolic Surgery (MCBMS) in Rio de Janeiro – RJ, Brazil. Data collection occurred from November 2014 to July 2016.

Class III obesity individuals [body mass index (BMI) $\geq 40 \text{ kg/m}^2$], of both genders were included, mean age ≥ 20 and < 60 years, with indication for bariatric surgery. Exclusion criteria were as follows: pregnancy or lactation, history and/or presence of chronic kidney diseases (defined by estimated glomerular filtration rate (GFR) $< 60 \text{ mL/min/1.73m}^2$)²⁴, liver diseases [except non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)], acute or chronic infections, elevated serum calcium levels, irritable bowel syndrome, previous restrictive and disabsorptive surgeries, neoplasias, diagnosis of endocrinopathies (hyperparathyroidism, hypothyroidism, hypercortisolemia), alcohol intake exceeding 20g/day for women and 40g/day for men, use of multivitamin and mineral supplements. This study was approved by the Research Ethics Committee of *Hospital Universitário Clementino Fraga Filho* (HUCFF) of the *Universidade Federal do Rio de Janeiro* (UFRJ) (Federal University of Rio de Janeiro) under Scientific Advice in accordance with Resolution nº 196 of the National Health Council (Research Protocol number 011/06-CEP). Inclusion of patients in the project was carried out through their formal authorization with the signing of the Informed Consent Form.

7.3.3.2 Definition of the obesity phenotypes: MHO and MUHO

Participants were divided in two obesity phenotypes, MHO and MUHO, according to the Third Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (NCEP-ATP III) criteria.²⁵ The subjects who showed alterations in ≥ 3 of the following five criteria were considered metabolically unhealthy obese (MUHO): (1) waist circumference (WC) $> 102\text{cm}$ for men and $> 88\text{cm}$ for women; (2) fasting glucose $\geq 100 \text{ mg/dL}$; (3) fasting triglycerides $\geq 150 \text{ mg/dL}$; (4) high density lipoprotein (HDL) $< 40\text{mg/dL}$ for men and $< 50\text{mg/dL}$ for women; and (5) blood pressure $\geq 130/\geq 85 \text{ mmHg}$. The metabolically healthy obese (MHO) phenotype was defined as

obesity without metabolic syndrome (i.e. BMI ≥ 40 kg/m² and presence of two components of metabolic syndrome).

7.3.3.3 Assessment of body variables

Height (using a Sany stadiometer) and weight (using a Welmy electronic platform scale with maximum weighing capacity of 300 kg) were measured with the participants standing without shoes and heavy outer garments. BMI (Kg/m²) was conducted based on the anthropometric measurements of weight (Kg) and height (m), according to the World Health Organization (WHO).²³ Waist circumference (WC) was measured based on Lohman et al.²² with cutoff points according to the NCEP-ATP III²⁵. The measurement of the diameter (cm) of the waist circumference (WC) was performed with the patient standing straight, abdomen relaxed, arms beside the body and feet together without heavy outer garments and with emptied pockets, breathing out gently. The visceral adiposity index (VAI), which is an empirical mathematical model, gender-specific, based on simple anthropometric data (BMI and WC) and biochemical parameters (TG, LDL-c and HDL-c), indicative of fat distribution and function, was calculated according to Amato.²⁶ All measurements were performed in duplicate by a single trained observer and variations up to 0.5 cm were accepted and mean was calculated.

7.3.3.4 Clinical assessments

The clinical variables considered by the study were those determined from the frequencies of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and systemic hypertension (SH). Data on NAFLD and SH were obtained through the medical records of the patients. The diagnosis of NAFLD was determined by a complete abdominal ultrasound (CAU), conducted by a single physician with expertise on imaging diagnosis, following the methodology proposed by Pratt & Kaplan²⁷ using a unit C display, Philips® 2-5 MHz Convex transducer (Barueri, São Paulo, Brazil). SH was diagnosed by a professional expert, following the methodology proposed by the VII Brazilian Guidelines of Systemic Hypertension (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA – SBC, 2016).²⁸

7.3.3.5 Evaluation of circulating biochemical parameters

For biochemical evaluation, a total of 5 ml blood sample was obtained via venipuncture after a 12-hour fast. Laboratory tests were conducted to characterize lipid profile [total

cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c) and triglycerides), liver damage and function (albumin, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (AP), gamma-glutamyl transpeptidase (GGT)], markers of bone metabolism [parathyroid hormone (PTH) 25(OH)D and calcium], glucose and insulin. The overall analyses were performed in laboratory with certifications, in partnership with the Center for Research on Micronutrients of the Institute of Nutrition of the UFRJ and the MCBMS.

The serum concentrations of total cholesterol, triglycerides, blood glucose and GGT were analyzed by the enzymatic colorimetric method (Labtest Diagnóstica S.A., Minas Gerais, Brazil), and the Low-Density Lipoprotein Cholesterol (LDL-c) and High-Density Lipoprotein Cholesterol (HDL-c) fractions were obtained by the selective inhibition method. LDL-c fraction was calculated in accordance with the Friedewald's formula.²⁹. Albumin was analyzed by the colorimetric method. AST and ALT were analyzed by the kinetic ultraviolet method (Labtest Diagnóstica S.A., Minas Gerais, Brazil) and serum alkaline phosphatase (AP) by the kinetic colorimetric enzymatic method³⁰, and the cutoff point was <130.0 U/L. Basal insulin was quantified by reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) and the cutoff point adopted was 24.9 IU/mL. The cutoff points for total cholesterol and its fractions, triglycerides and fasting glucose were those established by the NCEP-ATP III criteria²⁵. For liver enzymes (albumin, AST, ALT, GGT) the cutoff points were ≥ 3.5 g/dL and < 5.0 g/dL; < 40 U/L; < 41 U/L and ≥ 5 and 60 U/L respectively³⁰.

Insulin resistance (IR) was identified by the formula of the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) as follows: fasting insulin (μ IU/ml) x fasting blood glucose (mg/dL)/405³¹, with ≥2.5 cutoff point.³²

PTH was analyzed by the immunoenzymatic method by chemiluminescence³³ with cutoff points for inadequacy >53.0 pg/mL (secondary hyperparathyroidism).

The serum concentration of 25(OH)D was quantified by high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection method (HPLC-UV) (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil). The nutritional status of vitamin D was analyzed by quantification of the serum concentrations of 25(OH)D, and cutoff points were ≤20 ng/mL (deficiency), ≥20 ng/mL and <29 ng/mL (insufficiency) and ≥30 ng/mL and <100 ng/mL (adequacy).⁴⁸ The nutritional status of calcium was determined by quantification of serum concentrations of ionic calcium by direct dosage using selective electrodes and the cutoff point adopted for inadequacy was <4mg/dL.³⁵

7.3.3.6 Diagnosis of NAFLD – Liver Biopsy

Histological evaluation was conducted through a withdrawal of 4mm thickness of the left lobe of the liver via puncture using a 16 G x 15 cm Menghini needle (Euromed, Minas Gerais, Brazil). Biopsies were conducted by the medical surgeon along with the bariatric surgery. The overall histological evaluations were performed by the same pathologist, who had no knowledge of the biochemical and clinical data of the patients, through staining of parts by hematoxylin-eosin, Masson's trichrome and Perls' Prussian blue stain (Interlab, São Paulo, Brazil). Hematoxylin-eosin allows a general view of the acinar architecture, inflammatory infiltrates and changes in hepatocytes. Masson verifies the presence of fibrosis, whether portal, perisinusoidal or around centrilobular veins. Perls verifies the presence of iron deposits⁶⁷.

Grading of NAFLD and staging of hepatic fibrosis were set in accordance with the proposal of Brunt et al.⁶⁷. Grading was performed considering the presence of macrovesicular steatosis (simple steatosis) and necroinflammatory activity (presence of NASH):

Macrovesicular steatosis

Grade 0: no steatosis;

Grade 1 (mild): < 33% of fat accumulation in hepatocytes;

Grade 2 (moderate): between 33% and 66% of hepatocytes affected;

Grade 3 (severe): >66% of hepatocytes affected.

Necroinflammatory activity (NASH)

Grade 0: no steatosis;

Grade 1 (mild);

Grade 2 (moderate);

Grade 3 (severe).

Staging of fibrosis was performed in individuals with NASH:

Stage 0: no steatosis;

Stage 1: Presence of pericellular or perisinusoidal fibrosis in Zone 3, focal or extensive;

Stage 2: Presence of pericellular or perisinusoidal fibrosis in Zone 3 associated with the presence of focal or extensive periportal fibrosis;

Stage 3: Presence of pericellular or perisinusoidal fibrosis in Zone 3 and focal or extensive fibrotic bridges;

Stage 4: Cirrhosis.

7.3.3.7 Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)⁵² for Windows version 21.0, IBM Corporation (Armonk NY, USA). To verify the normality of the sample, the Kolmogorov-Smirnov test was performed. Continuous variables were expressed as mean and standard deviation. Categorical variables were compared using Pearson's Chi-square test. Continuous variables according to the MHO and MUHO phenotypes were compared using Student's t-test.

Two-way ANOVA analyzes were performed to compare the markers of bone metabolism (Vitamin D, calcium and PTH), and liver function and damage indicators, according to the MHO and MUHO phenotypes and the degrees of staging of NAFLD. Later, the tukey test was performed to verify the difference between the groups studied. To test the homogeneity of proportions among categorical variables Pearson's Chi-square test, Fisher's exact test was applied, and Pearson's Linear Correlation was used for the continuous variables. All statistical analyzes were performed using Statistical Package for Social Sciences (SPSS, Chicago IL) for Windows version 21.0. The level of significance was set at 5% ($p < 0.05$).

7.3.4 Results

7.3.4.1 General characterization of the studied population

A total of 232 adults with obesity and diagnosis of NAFLD were recruited for study and were in the preoperative period of bariatric surgery. Of these, nine adults were excluded from the study because they did not meet any of the eligibility criteria, two of them for being 60 years of age, three being diagnosed with class II obesity, and the remainder because they had important information which could not be answered at the time of the consultation with the nutritionist for data collection. NAFLD was present in 97.58% of the 223 eligible adults for the study. After a systematic sampling technique, where, for each five patients evaluated during the study period, one was selected to staging of NAFLD by liver biopsy, a sub-sample of 50 individuals selected.

The sample comprised 50 adults with class III obesity and NAFLD, 62% (n=31) with steatosis and 38% (n=19) with steatohepatitis without fibrosis, predominantly sedentary, 78% (n=39) and females 86% (n=43), mean age of 43 ± 10.5 years. No statistical difference between genders was observed ($p=0.061$). Systemic Hypertension (SH) and Insulin Resistance (IR) were present respectively in 60% (n=30) and 62% (n=31) of the studied sample.

7.3.4.2 Characterization of the population according to the MHO and MUHO phenotypes

According to the NCEP-ATPIII criteria, the classification of subjects showed 36% of the subjects were categorized as MHO and 64% as MUHO. Mean age between the MHO and MUHO groups was 42.7 ± 11.2 and 45.6 ± 10.8 years respectively, and no statistical difference was found between the phenotypes ($p=0.377$), although participants in the MUHO group were older.

Regarding the anthropometric and biochemical variables of the MHO and MUHO groups (Table 1), statistically significant differences were found between the means of the enzymes of liver function such as albumin (g/dL) $4,1 \pm 0,4$ vs. $4,3 \pm 0,5$ ($p=0.044$) and ALT (mg/dL) $22,9 \pm 9,9$ vs. $29,9 \pm 18,1$ ($p=0.008$); the means of the bone metabolism markers, AP (U/L) $64,3 \pm 18,1$ vs. $82,7 \pm 23,8$ ($p=0.007$); and the means of HDL-c (mg/dL) $47,6 \pm 15,3$ vs. $40,6 \pm 8,9$ ($p=0.047$) of the MHO and MUHO groups, respectively (Table 1). The concentrations evaluated were significantly lower in the MHO group.

Similarly, the prevalence of SH, 17% (n=3), was also significantly lower ($p=0.041$), in the MHO group, when compared to the MUHO group, where it reached 84% (n=27). In relation to the prevalence of IR, in the MUHO group it was higher 72% (n=23) than in the MHO group, 50% (n=9), although no significant difference was found between the groups ($p=0.078$). In relation to other markers of bone metabolism and anthropometric variables between the groups, no statistical differences were found as well (Table 1).

7.3.4.3 Biochemical indicators of liver function and damage according to the degrees of staging of NAFLD and the obesity phenotypes

As for the biochemical indicators of liver function and damage, considering the degrees of staging of NAFLD according to the MHO and MUHO phenotypes (Table 2), we observed that between the MHO and MUHO groups with steatosis statistically significant differences were found in the mean values of GGT (U/L), 25.77 ± 15.36 vs. 30.63 ± 19.49 ($p=0.025$); and

albumin (g/dL) concentrations, 3.99 ± 0.34 vs. 4.24 ± 0.23 ($p=0.037$). Nonetheless, no statistical difference was found in relation to steatohepatitis without fibrosis between the MHO and MUHO phenotypes or intra-groups.

7.3.4.4. Bone metabolism biochemical markers according to the degrees of staging of NAFLD and the obesity phenotypes

According to the biochemical markers of bone metabolism and considering the degrees of staging of NAFLD of the MHO and MUHO phenotypes (Table 3), we found statistically significant differences in the mean values of AP (U/L), 85.44 ± 27.27 vs. 61.92 ± 17.57 ($p=0.006$) and calcium (mg/dL), 4.59 ± 0.24 vs. 4.69 ± 0.23 (0.042) between the MHO and MUHO groups with steatosis, respectively, and no intra-group differences. Vitamin D and PTH markers were not associated with the MHO phenotype at any of the degrees of staging of the studied NAFLD, including intra-groups and between the groups.

7.3.5 Discussion

The strong point of this study is the fact that it was one of the few to report, in individuals with class III obesity and NAFLD, the relationship between the MHO phenotype and a set of biochemical variables with importance for liver function and bone metabolism. The study presents four main findings. The first is the presence of the MHO phenotype associated with low changes in indicators of liver damage and function and markers of bone metabolism in individuals with steatosis. The second is the combination of obesity with the metabolically unhealthy status with obesity associated with greater impairment of the variables studied, independent of the staging of NAFLD. The third is the combination of obesity and NAFLD per se, regardless of the MHO and MUHO phenotypes that are already capable of causing alterations in markers of bone and liver metabolism. The fourth, calcium and PA, some of the markers of bone metabolism selected for this study, were associated with the MHO phenotype in the initial stage of the studied NAFLD. Nonetheless, we assume, as possible limitations of study, the sample size for evaluating the relationship between the liver and bone biochemical parameters, the MHO phenotype and the staging of NAFLD, in addition to the absence of other markers of bone metabolism.

7.3.5.1 General characterization of the studied population

Obesity is related to the spectrum of hepatic abnormalities known as NAFLD^{37,38}. It is estimated that 25% of the adult world population presents NAFLD, and this incidence seems to occur more expressively in individuals with Class III obesity, where about 90% of them present NAFLD^{20,21,40,39}. In our sample, among the 50 adults with class III obesity and NAFLD, submitted to liver biopsy, 62% had steatosis and 38% had steatohepatitis without fibrosis.

Individuals with NAFLD are up to 4.4 times more likely to develop hepatocellular carcinoma, which is a general population and larger in appearance when associated with obesity⁴¹. Currently, the main mechanisms that justify this strong association are related to chronic low-grade inflammation, oxidative stress and insulin resistance^{42,43}.

Other aspect that deserves attention is physical inactivity, which is related to the increased risk for NAFLD^{45,46} and Obesity⁴⁶. In our study, about 78% of the subjects were sedentary. Evidence suggests that there is a strong association between the practice of regular physical activity and the risk of developing Obesity⁴⁶ and NAFLD. Moreover, such practice can also be used as a strategy for the treatment of these diseases as it is effective in reducing the risk of progression of NAFLD, reducing intrahepatic fat content, increasing beta oxidation of fatty acids, inducing hepato-protective autophagy, attenuating apoptosis of hepatocytes and increasing insulin sensitivity. In addition to being associated with suppression of the reactive oxygen species (ROS) overproduction and consequent reduction of EO, via the regulation of antioxidant enzymes and anti-inflammatory mediators⁴⁷.

Obesity and NAFLD are multifactorial diseases that still have several mechanisms not fully elucidated, including those related to the progression of NAFDL, a context in which the MHO phenotype emerges as a possible protection factor.

7.3.5.2 Characterization of the population according to the MHO and MUHO phenotypes

Our findings showed that the liver enzymes ALT ($p=0.007$) and albumin ($p=0.044$); and markers of bone metabolism, AP ($p=0.008$) were at increased concentrations in individuals with the MUHO phenotype, which suggests the existence of a possible protection factor among individuals with the MHO phenotype, regarding the levels of impaired liver function. These parameters have probably been altered as a consequence of expressive metabolic disorders

already present in these individuals. This result corroborates the study conducted by Xu L et al. (2017)⁴⁹, who found ALT alterations more clearly mediated by increased BMI and CC effects.

The liver function and damage indicators assessed in our study are influenced by several aspects, including the inflammatory profile of obesity itself. This inflammatory picture leads to higher RI, greater accumulation of free fatty acids in the liver (altering ALT, AST, GGT and PA), adipose and muscular tissue⁵⁰, and is associated with the most altered levels of metabolic alterations, such as fasting glycemia, insulin, HOMA-IR index^{9,51,52} and others⁵³. As observed in our study, all these metabolic parameters were evaluated and were more compromised with greater severity in the MUHO group. Our findings agree with the literature, since the MHO phenotype may be presented as a protective factor for some metabolic complications⁵⁴ when compared to individuals with the MUHO phenotype, as seen in our study.

The MUHO phenotype presents a high risk of developing cardiovascular diseases⁵⁵, and the result presented in our study corroborates this trend, since higher concentrations of HDL-c were observed in subjects with MHO ($p=0.047$). This biochemical marker has a protective effect, which acts on the maintenance of the endothelium of the blood vessels, cleaning them and the damages caused on these internal walls. These are the first steps in the process of atherosclerosis, which causes heart attacks and strokes⁵⁶.

The major critical point of the MHO concept is related to the potent conversion of the healthy to the unhealthy phenotype in later years, and this possible conversion results in increased cardiovascular risk⁵⁷. In a controversial scenario, individuals with MHO seem to have the idea of having a healthy reality, since they present a lower risk of developing cardiometabolic alterations. Given this, the detailed phenotype of these individuals over time will be made feasible with a real understanding of the pathophysiology of metabolic disorders. In this scenario, it is highly necessary to identify the high risks present in this subgroup in order to optimize the prevention and treatment strategies for the metabolic alterations presented.

7.3.5.3 Biochemical indicators of liver function and damage according to the degrees of staging of NAFLD according the obesity phenotypes

Regarding markers of liver function and damage, it was observed that only the serum concentrations of GGT ($p= 0.025$) and albumin ($p=0.037$) had lower values and statistically significant values, in the MHO phenotype, when compared to MUHO, in stages of steatosis, the milder form of liver disease, early and silent stage of NAFLD, without evident signs and

symptoms. As it has already been established in the literature, these lesions and liver function markers are not sensitive to define the true functioning of the liver, despite the simplicity of the parameters involved and the calculation, besides the low cost⁵⁸, especially if evaluated separately, which was not the case in our study, which sought to minimize this possible limitation, combining these indicators of clinical diagnosis, with a diagnosis of abdominal US imaging and staging of the disease through liver biopsy considered gold standard for this purpose, since it is capable of evaluating degrees of steatosis and fibrosis, identifying necroinflammatory changes.

The pathogenesis of NAFLD, particularly its mechanisms, still requires more scientific clarification, but mechanisms of hepatocellular damage and inflammation are derived from the toxic effects of excess lipids^{59,60}. However, the total accumulation of triglycerides in hepatocytes is not the major determinant of lipotoxicity in hepatic disease; lipotoxic agents affect cellular behavior through multiple mechanisms, including receptor activation leading to apoptosis, endoplasmic reticulum stress, mitochondrial function modification, and oxidative stress⁶¹, common events in the context of obesity per se^{62,63}. And, in the MHO group individuals generally have less ectopic fat stores and better insulin sensitivity than those who are MUHO and may be able to have hepatic markers less altered by the more favorable metabolic condition, transitional period⁶⁴. In addition, the impairment of liver function related to lipotoxicity under conditions of metabolic changes, such as in the case of established obesity, has been considered part of the development and severity of NAFLD⁴³, as it can be observed in our study, regardless of the phenotypes, at the different stages (steatosis and steatohepatitis without fibrosis) of NAFLD that were investigated.

7.3.5.4 Biochemical markers of bone metabolism according to the degrees of staging of NAFLD and the obesity phenotypes

Some evidence indicates that in adults with class III obesity there is a strong association between some markers of bone metabolism and the progression of NAFLD^{8,10,11}. In our study, lower serum concentrations of calcium ($p = 0.042$) and AP ($p = 0.006$) were associated with the MHO phenotype in steatosis stage.

Nutritional deficiencies are often present in the obesity framework⁶⁴. Changes occur in serum concentrations of vitamin D in individuals with obesity caused by the recurring deficiency of this nutrient, which results in decreased calcium and phosphorus plasma levels that, in turn, stimulate PTH secretion. Secondary hyperthyroidism, which is also a result from

changes in plasma concentrations of PTH, is very common in individuals with severe obesity, as is the case of our sample, and it courses with other nutritional deficiencies^{13, 68,69}. It is therefore reasonable to think that the differences that were not found in the other markers, such as vitamin D and PTH, markers that had been selected for our investigation, occurred because they are already severely compromised in individuals with more severe obesity, regardless of phenotype, as it seems to be the case of the individuals in our study. In addition, vitamin D deficiency, even if not directly evaluated in our study, is worth highlighting due to its relationship not only with obesity but also with the progression of NAFLD^{17,66,67}.

7.3.6 Conclusion

The MHO phenotype does not protect adults with class III obesity and NAFLD from developing anthropometric and biochemical changes that can negatively impact on the bone and liver health, and in the progression of NAFLD in these individuals. Our study highlights that MHO individuals present important metabolic alterations, when the bone and hepatic metabolism indicators are considered. However, the MHO individuals with steatosis present lower severity changes related to markers of liver damage and function (GGT and albumin), as well those related to bone metabolism, when compared to MUHO individuals. Continuous monitoring of these individuals is suggested, given the transient nature of the MHO phenotype.

Abbreviations

Metabolic Syndrome (MS); Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD); Alkaline phosphatase (AP); Metabolically healthy obesity phenotype (MHO); Metabolically unhealthy obesity phenotype (MUHO); Waist circumference (WC).

Acknowledgments

Financial Support: The authors acknowledge the support received from *Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro* (FAPERJ - Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support of the State of Rio de Janeiro; Scientist of Our State), *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq- National Council for Scientific and Technological Development) and CAPES – Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education within the Ministry of Education of Brazil.

Author Contributions: A.R. conceived and designed the experiments; L.M.L., A.R., L. B., A.C., and C.S. performed the experiments; R.M. analyzed the data; L.M.L., A.C., M. L., R. M. and A.R wrote the paper.

Disclosure

The author reports no conflicts of interest in this work.

7.3.7 References

1. Ng M, Fleming T, Robinson M, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet.* 2014; 384:766-781. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60460-8.
2. NCD. Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19·2 million participants. *Lancet.* 2016; 387(10026):1377-96. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30054-X.
3. Jafari-Narsabian. Osteosarcopenic obesity in women: impact, prevalence, and management challenges. *Int J Womens Health.* 2017; 9:33–42. doi: 10.2147/IJWH.S106107.
4. Yang CW, Li CI, Li TC, et al. Association of Sarcopenic Obesity with Higher Serum High-Sensitivity C-Reactive Protein Levels in Chinese Older Males - A Community-Based Study (Taichung Community Health Study-Elderly, TCHS-E). *PLoS One* 2015; 10(7):e0132908. doi: 10.1371/journal.pone.0132908.
5. Cabral JAV, Souza GP, Nascimento JA, Simonetti LF, Marchese C, Sales-Peres SH. Impact of vitamin D and calcium deficiency in the bones of patients undergoing bariatric surgery: a systematic review. *Arq Bras Cir Dig.* 2016; 29(1 Suppl. 1):120-123. doi: 10.1590/0102-6720201600S10029.
6. Bekaert M, Verhelst X, Geerts A, Lapauw B, Calders. Association of recently described adipokines with liver histology in biopsy proven non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review. *Obes Rev.* 2016; 17(1):68-80. doi: 10.1111/obr.12333
7. National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on

- Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002; 106:3143-3421.
8. Tovo C, Fernandes SA, Buss C, de Mattos AA. Sarcopenia and non-alcoholic fatty liver disease: Is there a relationship? A systematic review. *World J Hepatol*. 2017; 28(9):326-332. doi: 10.4254/wjh.v9.i6.326.
 9. Chen YY, Fang WH, Wang CC, et al. Body fat has stronger associations with bone mass density than body mass index in metabolically healthy obesity. *PLoS ONE*. 2018; 13(11):e0206812. doi: 10.1371/journal.pone.0206812.
 10. Targher G, Lonardo A, Rossini M. Nonalcoholic fatty liver disease and decreased bone mineral density: is there a link?. *J Endocrinol Invest*. 2015; 38(8):817–82. doi: 10.1007/s40618-015-0315-6.
 11. Li M, Xu Y, Xu M, et al. Association between nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and osteoporotic fracture in middle-aged and elderly Chinese. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2012; 97(6): 2033–2038.
 12. Hinnouho GM, Czernichow S, Dugravot A, Batty GD, Kivimaki M, Singh-Manoux. A. Metabolically healthy obesity and risk of mortality: does the definition of metabolic health matter?. *Diabetes Care*. 2013; 36:2294-2300. doi: 10.2337/dc12-1654
 13. Wolf E, Utech M, Stehle P, Büsing M, Stoffel-Wagner B, Ellinger S. Preoperative micronutrient status in morbidly obese patients before undergoing bariatric surgery: results of a cross-sectional study. *Surg Obes Relat Dis*. 2015; 11(5):1157–1163. doi: 10.1016/j.sobrd.2015.03.018.
 14. Manoy P, Anomasiri W, Yuktanandana P, et al. Elevated serum leptin levels are associated with low vitamin D, sarcopenic obesity, poor muscle strength, and physical performance in knee osteoarthritis. *Biomarkers*. 2017; 19:1-8. doi: 10.1080/1354750X.2017.1315615.
 15. Yang CW, Li CI, Li TC, et al. Association of Sarcopenic Obesity with Higher Serum High-Sensitivity C-Reactive Protein Levels in Chinese Older Males - A Community-Based Study (Taichung Community Health Study-Elderly, TCHS-E). *PLoS One*. 2015; 10(7):e0132908. doi: 10.1371/journal.pone.0132908.
 16. Bell JA, Kivimaki M, Hamer M. Metabolically healthy obesity and risk of incident type 2 diabetes: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Obes Rev*. 2014;15(6):504–15. doi: 10.1111/obr.12157.
 17. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, 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, *Am. J. Gastroenterol.* 2012; 107, 811-826.
18. Choi SE, Kwon S, Seok S, et al. Obesity-linked phosphorylation of SIRT1 by CK2 inhibits its nuclear localization and promotes fatty liver. *Molecular and Cellular Biology*. 2017; v. 37, n. 15, p. e00006-17.
 19. Pujia A, Gazzaruso C, Ferro Y, et al. Individuals with Metabolically Healthy Overweight/Obesity Have Higher Fat Utilization than Metabolically Unhealthy Individuals. *Nutrients*. 2016; 8(1). doi: 10.3390/nu8010002.
 20. Fazel Y, Koenig AB, Sayiner M, Goodman ZD, Younossi ZM. Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease. *Metabolism*. 2016; 65(8):1017–25. doi:10.1016/j.metabol.2016.01.012.
 21. Okur G, Karacaer Z. The prevalence of non-alcoholic fatty liver disease in healthy young persons. *Northern Clinics of Istanbul*. 2016; 3(2):111–7.
 22. Huh JH, Kim KJ, Kim SU, et al. Obesity is more closely related with hepatic steatosis and fibrosis measured by transient elastography than metabolic health status. *Metabolism*. 2017; 66:23-31. doi: 10.1016/j.metabol.2016.10.003.
 23. Brea Á, Pinto X, Ascaso JF, et al. Enfermedad del hígado graso no alcohólico, asociación con la enfermedad cardiovascular y tratamiento (I). Enfermedad del hígado graso no alcohólico y su asociación con la enfermedad cardiovascular. *Investigación en Arteriosclerosis*. 2017; 29(3): 141-148.
 24. Ballestri S, Zona S, Targher G, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with an almost twofold increased risk of incident type 2 diabetes and metabolic syndrome. Evidence from a systematic review and meta-analysis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2016; 31(5): 936-44.
 25. Liou I, Kowdley KV. Natural history of nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol.* 2006; 40(Suppl. 1):S11–6.
 26. World Health Organization (WHO) Obesity: preventing and managing the global epidemic. Geneva: WHO, 2004.
 27. Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN, et al. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Circulation*. 2004;110(2):227-39.
 28. Lohman T, Caballero B, Davis S. Pathways: A school-based program for the primary prevention of obesity in American Indian children. *J Nutr Sept.* 1998.
 29. Amato MC, Giordano C, Galia M, et al. Visceral Adiposity Index: a reliable indicator

- of visceral fat function associated with cardiometabolic risk. *Diabetes Care*. 2010; 33(4):920-2. doi: 10.2337/dc09-1825.
30. Bahia CA, Guimarães RM, Asmus CIRF. Alterações nos marcadores hepáticos decorrentes da exposição ambiental a organoclorados no Brasil. *Cad. Saúde Colet.* 2014; 22 (2): 133-41.
 31. Pratt DS, Kaplan MM. Avaliação da função hepática [Liver function assessment]. In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson LR, editors. *Harrison medicina interna* [Harrison internal medicine], 15th ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2002; :1813-6.
 32. Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC). VII Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. 2016. Available from: http://publicacoes.cardiol.br/2014/diretrizes/2016/05_HIPERTENSAO_ARTERIAL.pdf. Accessed February 2, 2016.
 33. Bramer JA, Abudu AA, Tillman RM, Carrter SR, Sumathi VP, Grimer RJ. Pre and post chemotherapy alkaline phosphatase levels as prognostic indicators in adults with localized osteosarcoma. *Eur J Cancer*. 2005; 41(18):2846-52.
 34. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985; 28(7):412-9.
 35. Holick MF, Chen TC. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr*. 2008; 87(4):1080S-6S.
 36. Hanwell HEC, Vieth R, Cole DE, et al. Sun exposure questionnaire predicts circulating 25-hydroxyvitamin D concentrations in Caucasian hospital workers in southern Italy. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010; 121(1-2):334–337. doi: 10.1016/j.jsbmb.2010.03.023.
 37. Choi KM. Sarcopenia and sarcopenic obesity. *Korean J Intern Med*. 2016; 31(6):1054-1060. doi: 10.3904/kjim.2016.193
 38. Pujia A, Gazzaruso C, Ferro Y, et al. Individuals with Metabolically Healthy Overweight/Obesity Have Higher Fat Utilization than Metabolically Unhealthy Individuals. *Nutrients*. Jan. 2016; 8(1): 2.
 39. Younossi ZM, Marchesini G, Pinto-Cortez H, et al. Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis: Implications for Liver Transplantation. *Transplantation*. 2019; 103(1).
 40. Pappachan JM, Antonio FA, Edvalath M, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a diabetologist perspective. *Endocrine*. 2014; 45(3): 344–53.

41. Heinrich S, Lang H. Hepatic resection for primary and secondary liver malignancies. *Innov Surg Sci.* 2017; 2(1): 1–8
42. Castro AM, Concha ML, Pantoja-Meléndez. Low-grade inflammation and its relation to obesity and chronic degenerative diseases. *Rev Med Hosp Gen*, 2017;80(2):101---105
43. Sarwar R, Pierce N, Koppe S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: current perspectives. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy.* 2018;11 533–542
44. Hallsworth K, Thoma C, Moore S, et al. Non-alcoholic fatty liver disease is associated with higher levels of *objectively* measured sedentary behaviour and lower levels of physical activity than matched healthy controls. *Frontline Gastroenterol.* 2015;6(1):44-51
45. Tsunoda K, Kai Y, Kitano N, Uchida K, Kuchiki T, Nagamatsu T. Impact of physical activity on nonalcoholic steatohepatitis in people with nonalcoholic simple fatty liver: A prospective cohort study. *Prev Med.* 2016; 88:237-40
46. Rivas E, Huynh H, Galassetti PR. Obesity Affects Submaximal Oxygen Uptake-Heart Rate Relationship and Exercise Economy Differently in Pre- and Post-pubescent Boys and Girls. *Int J Exerc Sci.* 2019; 12(3):748-763.
47. Farzanegi P, Dana A, Ebrahimpoor Z, Asadi M, Azarbayjani MA. Mechanisms of beneficial effects of exercise training on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): Roles of oxidative stress and inflammation. *European Journal of Sport Science.* 2019
48. Bekaert M, Verhelst X, Geerts A., et al. Association of recently described adipokines with liver histology in biopsy proven non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review. *Obesity Reviews.* 2016; 17(1): 68-80.
49. Xu L, Jiang CQ, Schooling CM, Zhang WS, Cheng KK, Lam TH. Liver enzymes as mediators of association between obesity and diabetes: the Guangzhou Biobank Cohort Study. *Ann Epidemiol.* 2017; 27(3):204-207.
50. Patel PS, Buras ED, Balasubramanyam A. The role of the immune system in obesity and insulin resistance. *Journal of Obesity.* 2013; v. 2013, ID. 616193, p. 1-9.
51. Ong T, Sahota O, Tan W, et al. A United Kingdom perspective on the relationship between body mass index (BMI) and bone health: a cross sectional analysis of data from the Nottingham Fracture Liaison Service. *Bone*, 2014; 59:207–210.
52. Farrel GC, Van Rooyen D, Gan L, et al. NASH is an Inflammatory Disorder: Pathogenic, Prognostic and Therapeutic Implications. *Gut Liver.* 2012; 6(2):149-71.

53. Kramer CK, Zinman B, Retnakaran R, et al. Are Metabolically Healthy Overweight and Obesity Benign Conditions? A Systematic Review and Meta-analysis. *Annals of Internal Medicine*. 2013; 159(11):758-769.
54. Matthias B. Schulze. Metabolic health in normal-weight and obese individuals. *Diabetologia*. 2019; 62:558–566.
55. März W, Kleber ME, Scharnagl H, et al. HDL cholesterol: reappraisal of its clinical relevance. *Clin Res Cardiol*. 2017; 106(9):663-675. doi: 10.1007/s00392-017-1106-1.
56. Stefan N, Haring HU, Hu FB, Schulze MB. Metabolically healthy obesity: epidemiology, mechanisms, and clinical implications. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2013; 1(2):152–162.
57. Eslam M, Sanyal AJ, George J. Are Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Alcoholic Fatty Liver Disease More Than Just Semantics? *Gastroenterology*. 2019; pii: S0016-5085(19)40982-7.
58. Abenavoli L, Peta V. Role of adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Reviews on Recent Clinical Trials*. 2014; 9(3): 134-140.
59. Dongiovanni, Rameta R, Meroni M, et al. The role of insulin resistance in nonalcoholic steatohepatitis and liver disease development--a potential therapeutic target? *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*. 2015;10(2): 229-42.
60. Svegliati-Baroni G, Pierantonelli I, Torquato P, et al. Lipidomic biomarkers and mechanisms of lipotoxicity in non-alcoholic fatty. *Free Radic Biol Med*. 2019; pii: S0891-5849(19)30326-0. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.029.
61. Berthoud HR, Klein S. Advances in obesity: Causes, Consequences, and Therapy. *Gastroenterology*. 2017; 152(7):1635-1637. doi: 10.1053/j.gastro.2017.03.045.
62. Polyzos SA, Kountouras J, Mantzoros CS, et al. Adipokines in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism*. 2016; 65(8):1062-1079.
63. Goossens GH. The Metabolic Phenotype in Obesity: Fat Mass, Body Fat Distribution, and Adipose Tissue Function. *Obes Facts*. 2017;10(3):207-215. doi: 10.1159/000471488.
64. Ramalho A. Fome Oculta: Diagnóstico, Tratamento e Prevenção. 1^a ed., São Paulo: Editora Atheneu, 2009.
65. Praveenaraj P, Gomes RM, Kumar S, et al. Prevalence and Predictors of Non Alcoholic Fatty Liver Disease in Morbidly Obese South Indian Patients Undergoing Bariatric Surgery. *Obesity Surgery*, 2015; 25(11): 2078-87.

66. Gonzalez-Molero I, Rojo-Martinez J, Morcillo S, *et al.* Hypovitaminosis D and incidence of obesity: a prospective study. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2013; 67(6): 680-2.
67. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, *et al.* Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *The American Journal of Gastroenterology*, sep.1999; 94(9):2467-74.
68. Verheyen, N. Relationship between bone turnover and left ventricular function in primary hyperparathyroidism: The EPATH trial. *PLoS One*. 2017; 12(4): e0173799.
69. Cranney A. Effectiveness and safety of vitamin D in relation to bone health. *Evidence Report/Technology Assessment (Full Rep)*, 2007; 158: 1-235.

Table 1. Mean of Anthropometric and Biochemical Variables according to the MHO and MUHO phenotypes

Variables	Phenotypes		<i>p</i> value
	MHO (n = 18)	MUHO (n = 32)	
BMI (kg/m ²)	42,0 ± 4,4	41,0 ± 3,6	0,380
VAI	8,4 ± 9,6	9,3 ± 14,1	0,807
Weight (Kg)	112,9 ± 14,1	117,2 ± 19,7	0,433
WC (cm)	119,2 ± 9,7	120,8 ± 13,4	0,662
Vitamin 25(OH)D (ng/mL)	24,6 ± 10,4	23,5 ± 8,2	0,681
Calcium (mg/dL)	4,6 ± 0,2	4,6 ± 0,2	0,557
PTH (pg/mL)	42,2 ± 10,9	41,3 ± 13,5	0,796
Albumin (g/dL)	4,1 ± 0,4	4,3 ± 0,5	0,044
AST (U/L)	21,6 ± 9,0	27,0 ± 21,5	0,313
ALT (U/L)	22,9 ± 9,9	29,9 ± 18,1	0,008
AP(U/L)	64,3 ± 18,1	82,7 ± 23,8	0,007
GGT(U/L)	28,7 ± 23,4	36,0 ± 20,8	0,255
Triglycerides (mg/dL)	163,9 ± 271,1	230,4 ± 288,9	0,429
Cholesterol (mg/dL)	202,1 ± 45,7	212,4 ± 65,1	0,558
LDL-c (mg/dL)	118,9 ± 38,4	124,2 ± 49,3	0,697
HDL-c (mg/dL)	47,6 ± 15,3	40,6 ± 8,9	0,047
Insulin (mcU/mL)	15,2 ± 10,1	15,9 ± 7,9	0,798
Glucose (mg/dL)	97,2 ± 22,4	100,9 ± 21,6	0,564
HOMA-IR	4,0 ± 2,2	3,8 ± 3,0	0,764

**t*-Student test (*p*<0,05); Abbreviations: SD: standard deviation; BMI: Body Mass Index; VAI: Visceral Adiposity Index; WC: Waist Circumference; PTH: Parathyroid hormone; AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; AP: Alkaline Phosphatase; GGT: gamma-glutamyl transpeptidase; TG: Triglycerides; LDLc: Low Density Lipoprotein Cholesterol; HDL-c: High Density Lipoprotein Cholesterol; HOMA-IR: Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance;

Table 2. Mean serum concentrations of biochemical indicators of liver function and damage according to the degrees of staging of NAFLD and obesity phenotypes.

Variables	Phenotypes	Staging of NAFLD by liver biopsy		<i>p</i> value
		Steatosis (n = 31)	Steatohepatitis without fibrosis (n = 19)	
		Mean ± SD	Mean ± SD	
AST (U/L)	MHO	19,84 ± 7,85	27,25 ± 12,55	0,489
	MUHO	24,94 ± 15,96	30,92 ± 28,28	0,381
	<i>p</i> value	0,454	0,731	
ALT (U/L)	MHO	21,15 ± 8,33	29,75 ± 14,17	0,568
	MUHO	29,11 ± 17,05	32,46 ± 20,14	0,352
	<i>p</i> value	0,178	0,768	
GGT (U/L)	MHO	25,77 ± 15,36	39,00 ± 44,37	0,279
	MUHO	30,63 ± 19,49	40,31 ± 19,15	0,215
	<i>p</i> value	0,025	0,450	
ALB (g/dL)	MHO	3,99 ± 0,34	4,30 ± 0,41	0,102
	MUHO	4,24 ± 0,23	4,25 ± 0,39	0,688
	<i>p</i> value	0,037	0,771	

Two-way ANOVA: mean and Standard Deviation (SD). Alb: albumin; ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; GGT: gamma-glutamyl transpeptidase; MUHO: Metabolically Unhealthy Obese; MHO: Metabolically Healthy Obese.

Table 3. Mean serum concentrations of bone metabolism biochemical markers according to the degrees of staging of NAFLD and obesity phenotypes

Variables	Phenotypes	Staging of NAFLD by liver biopsy			<i>p</i> value
		Steatosis (n = 31)	Steatohepatitis without fibrosis (n = 19)		
		Mean ± SD	Mean ± SD		
Vitamin 25(OH)D (ng/mL)	MHO	24,18 ± 9,39	29,55 ± 12,38	0,290	
	MUHO	22,82 ± 6,40	25,35 ± 9,89	0,431	
	<i>p</i> value	0,672	0,408		
Ca (mg/dL)	MHO	4,59 ± 0,24	4,60 ± 0,22	0,982	
	MUHO	4,69 ± 0,23	4,58 ± 0,23	0,197	
	<i>p</i> value	0,042	0,132		
PTH (pg/mL)	MHO	41,31 ± 12,03	44,45 ± 9,12	0,378	
	MUHO	39,51 ± 11,35	43,37 ± 16,75	0,231	
	<i>p</i> value	0,706	0,887		
AP (U/L)	MHO	61,92 ± 17,57	69,75 ± 22,74	0,547	
	MUHO	85,44 ± 27,27	79,69 ± 19,33	0,487	
	<i>p</i> value	0,006	0,445		

Two-way ANOVA: Mean and Standart Deviation (SD). Vitamin 25(OH)D: vitamin D; Ca: calcium; PTH: Parathyroid hormone; AP: alkaline phosphatase; MUHO: Metabolically Unhealthy Obese; MHO: Metabolically Healthy Obese

8. CONCLUSÃO

O fenótipo “Obeso Metabolicamente Saudável” não protege os indivíduos adultos com obesidade classe III de apresentarem alterações clínicas, bioquímicas e antropométricas.

A obesidade per si independentemente dos fenótipos OMS e OMNS associados a ela causa alterações em marcadores bioquímicos relacionados ao metabolismo ósseo, marcadores de inflamação e função hepática.

Foi encontrada associação entre variáveis clínicas (HAS), metabólicas (HOMA-IR), antropométricas (VAI) e os marcadores de metabolismo ósseo (FA e PTH) com o fenótipo OMS com valores alterados em menor gravidade se comparado com o OMNS.

Foi observado que quanto maior a idade maior a associação desta variável com a presença do fenótipo OMNS, sugerindo que o aumento da idade pode ser um elemento importante na transição do fenótipo OMS para OMNS.

O fenótipo OMNS encontra-se associado ao aumento das concentrações séricas de PTH e maior prevalência de Hiperparatireoidismo Secundário. E ainda, maior risco para alterações dos marcadores de metabolismo ósseo se comparado ao fenótipo OMS.

O fenótipo OMS não protege os adultos com obesidade classe III e com DHGNA de desenvolver alterações antropométricas e bioquímicas que possam impactar negativamente na saúde óssea e hepática, assim como na progressão da DHGNA desses indivíduos.

Nosso estudo destaca que os OMS também apresentaram importantes alterações metabólicas, quando considerado os indicadores de saúde óssea e hepática que foram investigados.

Os indivíduos OMS com esteatose apresentam menores alterações de gravidade relativas aos marcadores de função e de dano hepático, assim como aqueles relacionados ao metabolismo ósseo, quando comparados aos OMNS. Recomenda-se a monitorização contínua desses indivíduos, dada a natureza transitória do fenótipo OMS.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo não corroboraram com a hipótese de que os fenótipos, OMS e OMNS influenciariam diferentemente os parâmetros clínicos, antropométricos e bioquímicos, de modo a evitar as alterações dessas variáveis quando a obesidade estava associada ao fenótipo OMS.

Os dados apresentados neste estudo mostraram que os fenótipos OMS e OMNS sofreram alterações nos marcadores de metabolismo ósseo e de função hepática, em diferentes níveis de gravidade.

No que concerne a composição corporal dos fenótipos avaliados, houve associação de menores valores do VAI com o fenótipo OMS, o que sugere que a distribuição de gordura corporal nesses indivíduos seja diferente, influenciando assim, nos resultados encontrados.

Considerando a escassez de estudos que abordem sobre variáveis do metabolismo ósseo e sua relação com DHGNA, segundo os fenótipos da obesidade. O presente estudo demonstra que embora o fenótipo OMS não proteja a população estudada de desenvolver alterações antropométricas e bioquímicas de impacto negativo para saúde óssea e hepática, bem como na progressão DHGNA. Esses apresentaram alterações de menor gravidade dos marcadores de lesão e função hepática, bem como do metabolismo ósseo, quando comparados aos indivíduos OMNS.

Recomendamos que os profissionais de saúde em sua prática clínica possam utilizar a classificação dos fenótipos da obesidade, sobretudo pelo critério NCEP ATP III, que é amplamente reconhecido por ser uma ferramenta eficiente para diagnóstico da síndrome metabólica. E, por reunir variáveis que são de fácil obtenção e interpretação sobre os aspectos clínico, bioquímico e antropométrico do paciente. Discriminar o perfil de cada fenótipo poderá ser útil para subsidiar estratégias mais assertivas no atendimento, a fim de minimizar a chance de transitoriedade do fenótipo OMS para OMNS, evitando ainda, maior agravamento das alterações no metabolismo ósseo, hepático e na progressão da DHGNA, ainda que em indivíduos com o fenótipo com OMS, como visto em nosso estudo.

10. REFERÊNCIAS

- ABENAVOLI, L.; PETA, V. Role of adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease, **Reviews on Recent Clinical Trials**, v. 9, n. 3, p. 134-140, 2014.
- ACHILIKE, I., HAZUDA, H. P.; FOWLER, S. P., et al., Predicting the development of the metabolically healthy obese phenotype, **International Journal of Obesity (London)**, vol. 39, n. 2, p. 228-34, feb. 2015.
- AGBAHT, K.; MERCAN, Y.; KUTLU, S., et al. Obesity with and without metabolic syndrome: do vitamin D and thyroid autoimmunity have a role? **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 106, n. 1, p. 27-34, aug. 2014.
- AGUILAR-SALINAS, C. A.; GARCIA, E. G.; ROBLES, L., et al. High adiponectin concentrations are associated with the metabolically healthy obese phenotype. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, vol. 93, n. 10, p. 4075-9, oct. 2008.
- ALVAREZ, V.; CUEVAS, A.; OLIVOS, C., et al. Micronutrient deficiencies one year after sleeve gastrectomy, **Nutrición Hospitalaria**, v. 29, n. 1, p. 73-79, 2014.
- AMATO, MC.; GIORDANO, C.; GALIA, M., et al. Visceral adiposity index: a reliable indicator of visceral fat function associated with cardiometabolic risk, **Diabetes Care**, v. 33, n. 4, p. 920–922, apr. 2010.
- AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE, *ACSM's Guidelines for exercise testing and prescription*, 9th edition. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 2014.
- AMYOT, J.; SEMANCHE, M.; FERDAOUSSI, M., et al. Lipopolysaccharides impair insulin gene expression in isolated islets of langerhans via toll-like receptor-4 and NF- κ B signalling. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. 36200, abr. 2012.
- ANDERSON, P. H. Vitamin D Activity and Metabolism in Bone, **Current Osteoporosis Reports**, v. 15, n. 5, p. 443-449, aug. 2017.
- ANGULO, P. Nonalcoholic fatty liver disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 16, p. 1221-1231, abr. 2002.
- ANSTEE, Q. M.; TARGHER, G.; DAY, C. P. Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis, **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 10, n. 6, p. 330-344, jun. 2013.
- APPLETON, S. L.; SEABORN, C. J.; VISVANATHAN, R., et al. Diabetes and cardiovascular disease outcomes in the metabolically healthy obese phenotype: a cohort study. **Diabetes Care**, vol. 36, n. 8, p. 2388–2394, aug. 2013.
- ARDAWI, M. S.; SIBIANY, A. M.; BAKHSH, T. M., et al. High prevalence of vitamin D deficiency among healthy Saudi Arabian men: relationship to bone mineral density, parathyroid hormone, bone turnover markers, and lifestyle factors. **Osteoporosis International**, v. 23, n. 2, p. 675–686, feb. 2012.

- ARNLOV, J., SUNDSTROM, J., INGELSSON, E., *et al.* Impact of BMI and the metabolic syndrome on the risk of diabetes in middle-aged men. **Diabetes Care**, v. 34, n. 1, p. 61–65, jan. 2011.
- ASRIH, M.; JORNAYVAZ, F. R. Inflammation as a potential link between nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. **Journal of Endocrinology**, v. 218, n. 3, R25-36, aug. 2013.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA (ABESO). *Diretrizes Brasileiras de Obesidade 2016/ ABESO - Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica*. 4. ed. São Paulo-SP, p. 31, 2016.
- AUNG, K. Review: In postmenopausal women and older men, vitamin D plus calcium reduces some fractures. **Annals of Internal Medicine**, v. 161, n. 6, p. JC5, sep. 2014.
- AVENELL, A.; MAK, J. C.; O'CONNELL, D. Vitamin D and vitamin D analogues for preventing fractures in post-menopausal women and older men. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 4, p. 1-170, abr. 2014.
- BAGGER, JI., HOLST, J. J.; HARTMANN, B., *et al.*, Effect of Oxyntomodulin, Glucagon, GLP-1, and Combined Glucagon +GLP-1 Infusion on Food Intake, Appetite, and Resting Energy Expenditure, **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 100, n. 12, p. 4541-52, Dec, 2015.
- BAHIA, C. A.; GUIMARÃES, RM.; ASMUS, CIRF., Alterações nos marcadores hepáticos decorrentes da exposição ambiental a organoclorados no Brasil, **Caderno de Saúde Coletiva**, v. 22, n. 2, p. 133-41, 2014.
- BALLESTEROS, POMAR, M., *et al.* Prevalence and predictors of Non-Alcoholic Fatty liver Disease (NAFLD) in morbidly obese patients undergoing bariatric surgery. **International Journal of Obesity**, vol. 31, p. S133, 2007.
- BALLESTRI, S.; ZONA, S.; TARGHER, G., *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease is associated with an almost twofold increased risk of incident type 2 diabetes and metabolic syndrome. Evidence from a systematic review and meta-analysis. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 31, n. 5, p. 936-44, mayo. 2016
- BANO, G.; TREVISAN, C.; CARRARO, S., *et al.* Inflammation and sarcopenia: A systematic review and meta-analysis. **Maturitas**, v. 96, p. 10-15, feb. 2017.
- BARBA, G.; RUSSO, P. Dairy foods, dietary calcium and obesity: a short review of the evidence. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 16, n. 6, p. 445-451, sep. 2006.
- BARBOUR, K. E.; ZMUDA, J. M.; BOUDREAU, R., *et al.* The effects of adiponectin and leptin on changes in bone mineral density. **Osteoporosis International**, v. 23, n. 6, p. 1699–1710, jun. 2012.
- BARROS, F.; SETÚBAL, S.; FERRAZ, L., *et al.* Correlation of non-alcoholic fatty liver disease and features of metabolic syndrome in morbidly obese patients in the preoperative

assessment for bariatric surgery. **ABCD - ARQUIVOS BRASILEIROS DE CIRURGIA DIGESTIVA**, v. 29, n. 4, p. 260-263, nov./dec. 2016.

BASHIARDES, S.; SHAPIRO, H.; ROZIN S., *et al.* Non-alcoholic fatty liver and the gut microbiota. **Molecular Metabolism**, v. 5, n. 9, p. 782-94, jun. 2016.

BAUMGARTNER, R. OESCH, L.; SARIKAYA, K., *et al.*, Obesity Paradox and Stroke, **Praxis (Bem 1994)**, v. 105, n. 14, p. 835-41, Jul, 2016.

BEKAERT, M.; VERHELST, X.; GEERTS, A., *et al.* Association of recently described adipokines with liver histology in biopsy proven non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review. **Obesity Reviews**, v. 17, n. 1, p. 68-80, jan. 2016.

BELGARDT, B. F.;OKAMURA, T.; BRUNING, J. C. Hormone and glucose signalling in POMC and AgRP neurons, **Journal of Physiology**, vol. 587, n. Pt 22, p. 5305-14., Nov, 2009.

BELL, J. A.; KIVIMAKI, M.; HAMER, M. Metabolically healthy obesity and risk of incident type 2 diabetes: a meta-analysis of prospective cohort studies. **Obesity Reviews**, vol. 15, n. 6, p.504–15, 2014.

BELL, L.K.; EDWARDS, S.; GRIEGER, J. A. The relationship between dietary patterns and metabolic health in a representative sample of adult Australians. **Nutrient**, vol. 7, n. 8, p. 6491–6505, aug. 2015.

BELLIA, A.; MARINONI, G.; D'ADAMO, M., *et al.* Parathyroid Hormone and Insulin Resistance in Distinct Phenotypes of Severe Obesity: A Cross- Sectional Analysis in Middle-Aged Men and Premenopausal Women. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 97, n. 12, p. 4724–4732, dec. 2012.

BERK, P. D.; Verna, E. C. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Lipids and Insulin Resistance. **Clinical Liver Disease**, v. 20, n. 2, p. 245-262, may. 2016.

BERNARDI, D.; ZANINOTTO, M.; PLEBANI, M. Requirements for improving quality in the measurement of bone markers. **Clinica Chimica Acta**, v. 346, n. 2004, p. 79–86, feb. 2004.

BERTHOUD, HR., *et al.*, Advances in Obesity: Causes, Consequences, and Therapy, **Gastroenterology**, v. 152, n. 7, p. 1635-1637, May, 2017.

BIAGIONI, Maria Fernanda Giovanetti. Efeitos da perda de peso sobre o metabolismo ósseo de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica de Bypass Gástrico em Y de Roux: efeitos da cirurgia bariátrica sobre o metabolismo ósseo. 2015. 84 f. Tese (doutorado) - **Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"**, Faculdade de Medicina de Botucatu. Botucatu-SP, 2015.

BJORBAEK, C, KAHN, BB., Leptin signaling in the central nervous system and the periphery **Recent Prog Horm Res**, 59:305-31, 2004.

BLOOMGARDEN, Z. Non-alcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes: Importance of glycemic control. **Journal of Diabetes**, v. 9, n. 8, p. 722-723, aug. 2017.

- BLÜHER, S.; SCHWARZ, P. Metabolically healthy obesity from childhood to adulthood - Does weight status alone matter? **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 63, n. 9, p. 1084-1092, sep. 2014.
- BORDALO, L. A.; MOURÃO, D. M.; BRESSAN, J. Deficiências nutricionais após a cirurgia bariátrica. Por que ocorrem?. **Acta Medica Portuguesa**, vol. 24, n. S4, p. 1021-1028, dec. 2011.
- BORDALO, L. A.; TEIXEIRA, T. F. S.; BRESSAN, J., et al. Cirurgia bariátrica: como e por que suplementar. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, n. 1, p. 113–120, jan./fev. 2011.
- BRAMER, JA., et al., Pre and post chemotherapy alkaline phosphatase levels as prognostic indicators in adults with localized osteosarcoma. **European Journal of Cancer**, v. 41, n. 18, p. 2846-52, Dec. 2005.
- Brasil. Ministério da Saúde. Vigitel Brasil 2014. Saúde Suplementar: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico/Ministério da Saúde, Agência Nacional de Saúde Suplementar. – Brasília: **Ministério da Saúde**, 2015.165 p.: il.
- BREA, Á.; PINTÓ, X.; ASCASO, J. F., et al. Enfermedad del hígado graso no alcohólico, asociación con la enfermedad cardiovascular y tratamiento (I). Enfermedad del hígado graso no alcohólico y su asociación con la enfermedad cardiovascular. **Investigación en Arteriosclerosis**, v. 29, n. 3, p. 141-148, mayo/jun. 2017.
- BREDELLA, M. A.; TORRIANI, M.; GHOMI, R. H., et al. Vertebral bone marrow fat is positively associated with visceral fat and inversely associated with IGF-1 in obese women. **Obesity (Silver Spring)**, v. 19, n. 1, p. 49-53, jan. 2011.
- BROWNING, J. D.; SZCZEPANIAK, L. S.; DOBBINS, R., et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. **Hepatology**, v. 40, n. 6, p. 1387-1395, dec. 2004.
- BRUBAKER, PL; ANINI, Y. Direct and indirect mechanisms regulating secretion of glucagon-like peptide-1 and glucagon-like peptide-2. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, V. 81, n. 11, p. 1005-12, 2003.
- BRUNO A. S.; RODRIGUES, M. H.; ALVARES, M. C., et al. Non-alcoholic fatty liver disease and its associated risk factors in Brazilian postmenopausal women. **Climacteric**, v. 17, n. 4, p. 461–71, aug. 2014.
- BRUNT, E. M.; JANNEY, C. G.; DI BISCEGLIE, A. M., et al. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 94, n. 9, p. 2467-74, sep.1999.
- CABRAL, J. A. V.; SOUZA, G. P.; NASCIMENTO, J. A., et al. Impact of vitamin D and calcium deficiency in the bones of patients undergoing bariatric surgery: a systematic review. **ABCD- ARQUIVOS BRASILEIROS DE CIRURGIA DIGESTIVA**, v. 29, n. 1/Suppl. 1, p. 120-123, 2016.

- CAMHI, S. M.; KATZMARZYK, P. T. Differences in Body Composition Between Metabolically Healthy Obese and Metabolically Abnormal Obese Adults. **International Journal of Obesity**, v. 38, n. 8, p. 1142–1145, aug, 2014.
- CAO, J. J. Effects of obesity on bone metabolism. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 15, n. 6, p. 30, jun. 2011.
- CARLSSON, A. C.; RISÉRUS, U.; ÄRNLÖV, J. Hypertriglyceridemic waist phenotype is associated with decreased insulin sensitivity and incident diabetes in elderly men. **Obesity (Silver Spring)**, v. 22, n. 2, p. 526–9, feb. 2014.
- CARMEL, R. Biomarkers of cobalamin (vitamin B-12) status in the epidemiologic setting: a critical overview of context, applications, and performance characteristics of cobalamin, methylmalonic acid, and holotranscobalamin II. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 94, n. 1, p. 348S-358S, jul. 2011.
- CARMEL, R., et al., Update on cobalamin, folate, and homocysteine, **Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, p. 62-81, 2003.
- CARMEL, R.; GREEN, R.; ROSENBLATT, D. S., et al. Update on cobalamin, folate, and homocysteine. **Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, p. 62-81, 2003.
- CARVALHEIRA, J. B.; TORSONI, M. A.; UENO, M. et al., Cross-talk between the insulin and leptin signaling systems in rat hypothalamus, **Obesity Research**, v. 13, n. 1, p. 48-57, Jan, 2005.
- CASTANER, O.; GODAY, A.; PARK, Y. M. et al., The Gut Microbiome Profile in Obesity: A Systematic Review, **International Journal of Endocrinology**, v.2018, p. 9, 2018.
- CASTRO, A. M.; CONCHA, M. L.; PANTOJA-MENLÉNZ. Low-grade inflammation and its relation to obesity and chronic degenerative diseases. **Revista Médica del Hospital General de México**, v. 80, n. 2, p.101---105, 2017.
- CERCATO, C.; SILVA, S.; SATO, A., et al. Risco Cardiovascular em uma população de obesos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 44, n. 1, p. 45-48, fev. 2000.
- 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. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 107, n. 6, p. 811-826, 2012.
- CHALASANI, N.; CRABB, D. W.; CUMMINGS, O. W., et al. Does leptin play a role in the pathogenesis of human nonalcoholic steatohepatitis? **The American Journal of Gastroenterology**, v. 98, n. 12, p. 2771-6, dec. 2003.
- 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, 2012. Erratum in: **Gastroenterology**. V. 143, n. 2, p. 1598, oct. 2012

CHANDLER, P. D.; WANG, L.; ZHANG, X., *et al.* Effect of vitamin D supplementation alone or with calcium on adiposity measures: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Nutrition Reviews**, v. 73, n. 9, p. 577–593, sep. 2015.

CHANG, Y.; JUNG, H. S.; YUN, K. E., *et al.* Metabolically Healthy Obesity is Associated with an Increased Risk of Diabetes Independently of Nonalcoholic Fatty Liver Disease **Obesity (Silver Spring)**, v. 24, n. 9, p. 1996-2003, sep. 2016.

CHANG, Y.; JUNG, H. S.; ZHANG, Y., *et al.* Metabolically healthy obesity and the development of nonalcoholic fatty liver disease. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 111, n. 8, p. 1133-1140, aug. 2016.

CHANG, Y.; KIM, B. K.; YUN, K. E., *et al.* Metabolically-healthy obesity and coronary artery calcification. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 63, n. 24, p. 2679 – 86, jun. 2014.

CHAVES, G. V.; PEREIRA, S. E.; SABOYA, C. J., *et al.* Association between Liver Vitamin A Reserves and Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in the Class III Obese following Bariatric Surgery. **Obesity Surgery**, v. 24, n. 2, p. 219-224, feb. 2014.

CHEN, Y.Y.; FANG, W. H.; WANG, C. C., *et al.* Body fat has stronger associations with bone mass density than body mass index in metabolically healthy obesity. **PLoS ONE**, vol. 13, n. 11, p. e0206812, 2018

CHEN, X. X.; YANG, T. Roles of leptin in bone metabolism and bone diseases. **The Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 33, n. 5, p. 474–485, sep. 2015.

CHESNEY, R. W. The five paradoxes of vitamin D and the importance of sunscreen protection. **Clinical Pediatrics (Philadelphia)**, v. 51, n. 9, p. 819-27, sep. 2012.

CHEUNG, Y. B. "A Body Shape Index" in middle-age and older Indonesian population: scaling exponents and association with incident hypertension. **PLoS One**, vol. 9, n. 1, p. e85421, jan. 2014.

CHITTURI, S.; FARRELL, G.; FROST, L., *et al.* Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: a manifestation of lipotoxicity? **Hepatology**, v. 36, n. 2, p. 403-9, aug. 2002. Erratum in: **Hepatology** v. 36, n. 5, p.1307, nov. 2002.

CHO, I.; YAMANISHI, S.; COX, L. *et al.*, Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity, **Nature**, v. 488, p. 621–626, 2012.

CHOI, K. M. Sarcopenia and sarcopenic obesity. **The Korean Journal of Internal Medicine**, v. 31, n. 6, p. 1054-1060, nov. 2016.

CHOI, S. E.; KWON, S.; SEOK, S., *et al.* Obesity-linked phosphorylation of SIRT1 by CK2 inhibits its nuclear localization and promotes fatty liver. **Molecular and Cellular Biology**, v. 37, n. 15, p. e00006-17, jul. 2017.

CHOLANKERIL, G.; PATEL, R.; KHURANA, S., *et al.* Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic steatohepatitis: Current knowledge and implications for management. **World Journal of Hepatology**, v. 9, n. 11, p. 533-543, apr. 2017.

CHRISTAKOS, S.; DHAWAN, P.; PORTA, A., *et al.* Vitamin D and intestinal calcium absorption. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 347, n. 1-2, p. 25–29, dec. 2011.

CIMINI, F.A., BARCHETTA, I.; CAROTTI, S. *et al.*, Relationship between adipose tissue dysfunction, vitamin D deficiency and the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease, **World Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 19, p. 3407-3417, May, 2017.

CLARCK, S. Vitamins and Trace elements. In: Gottschlich MM. The ASPEN nutrition support core curriculum: a case-based approach – the adult patient. **American Society for Parenteral and Enteral Nutrition**, 2 ed. 2007, p. 129-62.

CLARET, M.; SMITH, M. A.; BATTERHAM, R. L., *et al.*, AMPK is essential for energy homeostasis regulation and glucose sensing by POMC and AgRP neurons, **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 8, p. 2325-36, Aug, 2007.

CLEMENS, T. L. Vitamin B12 Deficiency and Bone Health. **The New England Journal of Medicine**, vol. 371, n. 10, p. 963-964, sept. 2014.

COLLETTA, C.; SMIME, C.; FABRIS, C., *et al.* Value of two noninvasive methods to detect progression of fibrosis among HCV carriers with normal aminotransferases. **Hepatology**, v. 42, n. 4, p. 838-45, out. 2005.

COMPHER, C. W.; BADELLINO, K. O.; BOULLATA, J. I. Vitamin D and the bariatric surgical patient: a review. **Obesity Surgery**, v. 18, n. 2, p. 220-224, feb. 2008.

COMPSTON J. Obesity and Bone. **Current Osteoporosis Reports**, v. 11, n. 1, p. 30–35, mar. 2013.

COMPSTON, J. Obesity and fractures in postmenopausal women. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 27, n. 4, p. 414-9, jul. 2015.

CONFAVREUX, C. B.; LEVINE, R. F.; KARSENTY, G. A paradigm of interative physiology, the crosstalk between bone and energy metabolism. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 310, n.1-2, p. 21-9, oct. 2009.

CORDEIRO, A.; PEREIRA, A.; SABOYA, C. J., *et al.* Relationship between Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Vitamin D Nutritional Status in Extreme Obesity. **Canadian Journal of Gastroenterol & Hepatology**, vol. 2017, ID. 9456897, jun. 2017.

CORDEIRO, A.; PEREIRA, S. E.; SABOYA, S. E., *et al.* Nonalcoholic Fatty Liver Disease Relationship with Metabolic Syndrome in Class III Obesity Individuals. **BioMed Research International**, vol. 2015, ID. 839253, may. 2015.

CORDEIRO, Adryana. Estado Nutricional Da Vitamina D e a sua relação com Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica e Síndrome Metabólica em indivíduos com obesidade classe

III. 2015. 118f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2015.

COSTA, M. B.; LANNA, C. M. M.; BRAGA, M. H., *et al.* Avaliação da hipercalcemia assintomática de pacientes ambulatoriais. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 44, n. 5, p. 329-35, out. 2008.

CRANNEY, A. Effectiveness and safety of vitamin D in relation to bone health. **Evidence Report/Technology Assessment (Full Rep)**, v. 158, p. 1-235, aug. 2007.

CUI, H.; LOPES, M; RAHMOUNI, K. The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity, **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, n. 6, p. 338-351, Jun, 2017.

CUMMINGS, DE; OVERDUIN, J. Gastrointestinal regulation of food intake. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 1, p. 13-23, 2007.

CUSANO, N. E.; RUBIN, M, R.; IRANI, D., *et al.* Use of parathyroid hormone in hypoparathyroidism. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 36, n. 11, p. 1121-7, dec. 2013.

DA LUZ, F. Q.; HAY, P.; TOUYS, S., *et al.*, Obesity with Comorbid Eating Disorders: Associated Health Risks and Treatment Approaches, **Nutrients**, v.10, n. 7, p. E829, June, 2018.

DALY, J. A.; ERTINGSHAUSEN, G. Direct method for determining inorganic phosphate in serum with the "CentrifiChem". **Clinical Chemistry**, v. 18, n. 3, p. 263-5, mar.1972.

DALY, JA; ERTINGSHAUSEN, G., Direct method for determining inorganic phosphate in serum with the "CentrifiChem". **Clinical Chemistry**, v. 18, n. 3, p. 263-5, Mar.1972.

DAO, MC., EVERARD, A.; CLEMENT, K., *et al.*, Losing weight for a better health: Role for the gut microbiota **Clinical Nutrition Experimental** , v. 6, p. 39-58, 2016.

DE ROOIJ, B. H.; VAN DER BERG, J. D.; VAN DER KALLEN, C. J., *et al.* Physical activity and sedentary behavior in metabolically healthy versus unhealthy obese and nonobese individuals—the Maastricht study. **PLoS One**, vol. 11, n. 5, p. e0154358, may. 2016.

DE SOUZA, CT.; ARAUJO, E. P.; BORDIN, S., *et al.*, Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus, **Endocrinology**, v. 146, n. 10, p. 4192-9, 2005.

DEMIRAG, M. D.; OZKAN, S.; HAZNEDAROGLU, S., *et al.*. Associations between obesity and the radiographic phenotype in knee osteoarthritis. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 47, n. 2, p. 424-429, abr. 2017.

DENARDIN, O. V. P. Avaliação laboratorial da função das glândulas tireóides. In: Carvalho, M. B. de. **Tratado de tireóide e paratireóide**. Rio de Janeiro: Rubio, 2007. p. 95-104.

DI MARZO, V.; LIGRESTI, A.; CRISTINO, L. The endocannabinoid system as a link between homoeostatic and hedonic pathways involved in energy balance regulation, **International Journal of Obesity (Lond)**, p. S18-24, Jun, 2009.

- DI NISIO, A.; DE TONI, L.; SABOVIC, I., *et al.* Impaired release of vitamin D in dysfunctional adipose tissue: new cues on vitamin D supplementation in obesity. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, vol. 102, n. 7, p. 2564-2574, jul. 2017.
- DIDRIKSEN, A.; BURILD, A.; JAKOBSEN, J., *et al.* Vitamin D3 increases in abdominal subcutaneous fat tissue after supplementation with vitamin D3. **European Journal of Endocrinology**, v. 172, n. 3, p. 235–241, mar. 2015.
- DÍEZ-RODRÍGUEZ, R.; BALLESTEROS, P. M. D.; CALLEJA, F. A., *et al.* Vitamin D levels and bone turnover markers are not related to non-alcoholic fatty liver disease in severely obese patients. **Nutrición Hospitalaria**, v. 30, n. 6, p. 1256-1262, dec. 2014.
- DING, W. Q.; YANK, Y. K.; ZHANG, X. M., *et al.* Hypertension outcomes in metabolically unhealthy normal-weight and metabolically healthy obese children and adolescents. **Journal of Human Hypertension**, v. 29, n. 9, p. 548-554, 2015.
- DINIZ, M. F. H.; BELEIGOLI, A. M. R.; RIBEIRO, A. L. P., *et al.* Factors associated with metabolically healthy status in obesity, overweight, and normal weight at baseline of ELSA-Brasil. **Medicine**, v. 95, p. 27, may. 2016.
- DIVELLA, R.; MAZZOCA, A.; DANIELE, A., *et al.*, Obesity, Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Adipocytokines Network in Promotion of Cancer, **International Journal of Biological Sciences**, v. 15, n. 3, p. 610-616, Jan, 2019.
- DIXIT, VD. Adipose-immune interactions during obesity and caloric restriction: reciprocal mechanisms regulating immunity and health span, **Journal of Leukocyte Biology**, v. 84, n. 4, p. 882-892, Jun, 2008.
- DOBBS, R.; SAWERS, C.; THOMPSON, F., *et al.* Overcoming Obesity: an initial economic analysis. **McKinsey Global Institute**, nov. 2014.
- DONATO JÚNIOR, J., *et al.*, Aspectos atuais da regulação do peso corporal, **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** vol. 40, n. 3, jul./set., 2004.
- DONG, H.; XU, Y.; ZHANG, X. *et al.* Visceral adiposity index is strongly associated with hyperuricemia independently of metabolic health and obesity phenotypes. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 8822, aug. 2017.
- DONGIOVANNI, P.; RAMETA, R.; MERONI, M., *et al.* The role of insulin resistance in nonalcoholic steatohepatitis and liver disease development--a potential therapeutic target? **Expert Review of Gastroenterology & Hepatology**, v. 10, n. 2, p. 229-42, dec. 2015.
- DOULBERIS, D.; KOTRONIS, G.; GIALAMPRINU, D., *et al.* Non-alcoholic fatty liver disease: An update with special focus on the role of gut microbiota. **Metabolism and Clinical Experimental**, v. 71, p. 182-197, jun. 2017.
- DRUCE, MR.; BLOOM, SR, Oxyntomodulin: a novel potential treatment for obesity, **Treatments in Endocrinology**, v.5, n. 5, p. 265-72, 2006.

- DU, T.; SUN, X.; HUO, R., *et al.* Visceral adiposity index, hypertriglyceridemic waist and risk of diabetes: The China Health and Nutrition Survey 2009. **International Journal of Obesity**, v. 38, n. 6, p. 840-7, jun. 2014.
- DUTRA, M. T.; AVELAR, B. P.; SOUZA, V. C., *et al.* Relationship between sarcopenic obesity-related phenotypes and inflammatory markers in postmenopausal women. **Clinical Physiology and Functional Imaging**, v. 37, n. 2, p. 205-210, mar. 2017.
- EDWARDS, M. H.; BUEHRING, B. Novel approaches to the diagnosis of sarcopenia. **Journal of Clinical Densitometry**, v. 18, n. 4, p. 472-477, oct./dec. 2015.
- ENGIN, AB. Adipocyte-Macrophage Cross-Talk in Obesity, **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 960, p. 327-343, 2017.
- ERASLAN, S.; KIZILGUL, M.; UZUNLULU, M., *et al.* Frequency of metabolic syndrome and 25-hydroxyvitamin D3 levels in patients with non-alcoholic fatty liver disease. **Minerva Medica**. v. 104, n. 4, p. 447-53, 2013.
- ESHTIAGHI, R.; KEIHANI, S.; HOSSEINPANAH, F., *et al.* Natural course of metabolically healthy abdominal obese adults after 10 years of follow-up: the Tehran Lipid and Glucose Study. **International Journal of Obesity**, vol. 39, p. 514–519, 2015.
- ESLAM, M.; SANYAL, A. J.; GEORGE, J. Are Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Alcoholic Fatty Liver Disease More Than Just Semantics? **Gastroenterology**; pii: S0016-5085, 2019.
- ESSER, N.; LEGRAND-POELS, S.; PIETTE, J., *et al.* Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 105, n. 2, p. 141-150, aug. 2014.
- EVERARD, A.; BELZER, C.; FEURST, L., *et al.*, Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity, **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 110, n. 22,p .9066-71, may. 2013.
- FABBRINI, E.; SULLIVAN, S.; KLEIN, S. Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Biochemical, Metabolic, and Clinical Implications, **Hepatology**, v. 51, n. 2, p. 679-689, feb. 2010.
- FABBRINI, E.; YOSHINO, J.; YOSHINO, M., *et al.* Metabolically normal obese people are protected from adverse effects following weight gain. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 2, p. 787–795, feb. 2015
- FAÉ, C.; LIBERALI, R.; COUTINHO, V. F. Deficiência de nutrientes a longo prazo no pós-operatório de cirurgia bariátrica – revisão sistemática. **SaBios - Revista de Saúde e Biologia**, v. 10, n. 2, p. 46–53, maio/ago.2015.
- FAN, J. G. An introduction of strategies for the management of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) recommended by Asia Pacific Working Party on NAFLD. **Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi**, v. 15, n. 7, p. 552-553, jul. 2007.

- FARREL, G. C.; VAN ROOYEN, D.; GAN, L., *et al.* NASH is an Inflammatory Disorder: Pathogenic, Prognostic and Therapeutic Implications. **Gut Liver**, v. 6, n. 2, p.149-71, apr. 2012.
- FARSINEJAD-MARJ, M.; SANEEI, P.; ESMAILZADEH, A., *et al.* Dietary magnesium intake, bone mineral density and risk of fracture: a systematic review and meta-analysis. **Osteoporosis International**, v. 27, n. 4, p. 1389-99, abr. 2016.
- FARZANEKI, P.; DANA, A.; EBRAHIMPOOR, Z., *et al.* Mechanisms of beneficial effects of exercise training on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): Roles of oxidative stress and inflammation. **European Journal of Sport Science**. 2019
- FAZEL, Y.; KOENIG, A. B.; SAYINER, M., *et al.* Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease. **Metabolism**, v. 65, n. 8, p. 1017–25, aug. 2016.
- FEIJÓ, S. G.; LIMA, G. M.; OLIVEIRA, M. A., *et al.* The spectrum of nonalcoholic fatty liver disease in morbidly obese patients. Prevalence and associate risk factors. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 28, n. 11, p. 788–793, nov. 2013.
- FETISSOV, S. O. Role of the gut microbiota in host appetite control: bacterial growth to animal feeding behaviour. **Nature Reviews. Endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 11–25, 2017.
- FISCHER, V.; HAFFNET-LUNTZER, M.; PRYSTAZ, K., *et al.* Calcium and vitamin-D deficiency marginally impairs fracture healing but aggravates posttraumatic bone loss in osteoporotic mice. **Scientific Reports (Nature)**, vol. 7, p. 7223, aug. 2017.
- FLEET, J. C. The role of vitamin D in the endocrinology controlling calcium homeostasis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 453, p. 36-45, sep. 2017.
- FLORENCIO-SILVA, R.; SASSO, G. R.; SASSO-CERRI, E., *et al.* Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–17, jul. 2015.
- FOSTER-SCHUBERT, KE, CUMMINGS, DE, Emerging therapeutic strategies for obesity, *Endocr Rev*, 27(7):779-93, 2006.
- FRANKS, P. W.; MCCARTHY, M. I. Exposing the exposures responsible for type 2 diabetes and obesity. **Science**, v. 354, p. 69–73, 2016.
- GAFNI, R. I.; GUTHRIE, L. C.; KELLY, M. H., *et al.* Transient Increased Calcium and Calcitriol Requirements After Discontinuation of Human Synthetic Parathyroid Hormone 1-34 (hPTH 1-34) Replacement Therapy in Hypoparathyroidism. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 30, n. 11, p. 2112–8, nov. 2015.
- GAMBINO, R.; BUGIANESI, E.; ROSSO, C., *et al.* Different Serum Free Fatty Acid Profiles in NAFLD Subjects and Healthy Controls after Oral Fat Load. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 479, mar. 2016.
- GARCIA LOPEZ, M.; BØNAA, K. H.; EBBING M., *et al.* B Vitamins and Hip Fracture: Secondary Analyses and Extended Follow-Up of Two Large Randomized Controlled Trials. **Journal of Bone and Mineral Research**, jun. 2017.

- GASEVIC, D.; CARLSSON, A. C.; LESSER, I. A., *et al.* The association between “hypertriglyceridemic waist” and sub-clinical atherosclerosis in a multiethnic population: a cross-sectional study. **Lipids in Health and Disease**, v. 13, p. 38, 2014.
- GATTA-CHERIFI, B.; COTA, D., New insights on the role of the endocannabinoid system in the regulation of energy balance, **Int J Obes (Lond)**, 40(2):210-9, Feb, 2016.
- GLOAGUEN, I.; COSTA, P.; DEMARTIS, A., *et al.*, Ciliary neurotrophic factor corrects obesity and diabetes associated with leptin deficiency and resistance, **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 94, n. 12, p. 6456-61, 1997.
- GODAY, A.; CALVO, E.; VÁQUEZ, L. A., *et al.* Prevalence and clinical characteristics of metabolically healthy obese individuals and other obese/non-obese metabolic phenotypes in a working population: results from the Icaria study. **BMC Public Health**, v. 16, p. 248, 2016.
- GONÇALVES, C. G.; GLADE, M. J.; MEGUID, M. M., *et al.* Metabolically healthy obese individuals: Key protective factors. **Nutrition**, v. 32, n. 1, p. 14–20, jan. 2016.
- GONG, T.; TORRES, D. T.; BERRY, M. J., *et al.*, Hypothalamic redox balance and leptin signaling - Emerging role of selenoproteins, **Free Radical Biology & Medicine**, v. 127, p. 172-181, Nov, 2018.
- GONNELLI, S.; CAFFARELLI, C.; TANZILLI, L., *et al.* The associations of body composition and fat distribution with bone mineral density in elderly Italian men and women. **Journal of Clinical Densitometry**, v. 16, n. 2, p. 168–177, apr./jun. 2013.
- GONZALEZ-MOLERO, I.; ROJO-MARTINEZ, J.; MORCILLO, S., *et al.* Hypovitaminosis D and incidence of obesity: a prospective study. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 67, n. 6, p. 680-2, jun. 2013.
- GOOSSENS, G. H. The Metabolic Phenotype in Obesity: Fat Mass, Body Fat Distribution, and Adipose Tissue Function. **Obesity Facts**, v. 10, n.3, p. 207-215, 2017.
- GOWER, B. A.; CASAZZA, K. Divergent effects of obesity on bone health. **Journal of Clinical Densitometry**, v. 16, n. 4, p. 450–454, out./dec. 2013.
- GROBER, U.; SPITZ, J.; REICHRATH, J., *et al.* Vitamin D: Update 2013. From rickets prophylaxis to general preventive healthcare. **Dermato-Endocrinology**, vol. 5, n. 3, p. e2, sept.-dec. 2013.
- GRUNDY, S. M.; CLEEMAN, J. I.; BAIREY MERZ, C. N., *et al.* “Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines”. **Circulation**, v. 110, n. 2, p. 227–239, aug. 2004.
- GUILLAND, J. C.; AIMONE-GASTIN, I. Vitamin B12 (cobalamin). **La revue du praticien**, v. 63, n. 8, p. 1085-7,1089-90, out. 2013.
- GUNARATNAM, K.; VIDAL, C.; GIMBLE, J. M., *et al.* Mechanisms of palmitate induced lipotoxicity in human osteoblasts. **Endocrinology**, v. 155, n. 1 p. 108–16, jan. 2014.

- GUTIÉRREZ-GROBE, Y.; JUÁREZ-HERNÁNDEZ, E.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, B. A., *et al.* Less liver fibrosis in metabolically healthy compared with metabolically unhealthy obese patients with non-alcoholic fatty liver disease. **Diabetes & Metabolism**, 2017.
- HALL, AB., *et al.*, Human genetic variation and the gut microbiome in disease, **Nature Reviews Genetics**, v. 18, p. 690–699, 2017.
- HALLSWORTH, K.; THOMA, C.; MOORE, S., *et al.* Non-alcoholic fatty liver disease is associated with higher levels of objectively measured sedentary behaviour and lower levels of physical activity than matched healthy controls. **Frontline Gastroenterology**, v. 6, n. 1, p. 44–51, 2015.
- HAMER, M.; BELL, J. A.; SABIA S., *et al.* Stability of metabolically healthy obesity over 8 years: the English Longitudinal Study of Ageing. **European Journal of Endocrinology**, vol. 173, n. 5, p. 703–708, aug. 2015.
- HANNIBAL, L.; LYSNE, V.; BJØRKE-MONSEN, A. L. Biomarkers and Algorithms for the Diagnosis of Vitamin B12 Deficiency. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 3, p. 27, jun. 2016.
- HANWELL, H. E. C.; VIETH, R.; COLE, D. E., *et al.* Sun exposure questionnaire predicts circulating 25-hydroxyvitamin D concentrations in Caucasian hospital workers in southern Italy. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 121, n. 1-2, p. 334–337, jul. 2010.
- HASHIMOTO, Y.; HAMAGUCHI, M.; FUKUDA, T., *et al.* Fatty liver as a risk factor for progression from metabolically healthy to metabolically abnormal in non-overweight individuals. **Endocrine**, v. 57, n. 1, p. 89–97, jul. 2017.
- HASHIMOTO, Y.; TAKANA, M.; OKADA, H., *et al.* Metabolically healthy obesity and risk of incident CKD. **The Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 10, n. 4, p. 578–583, apr. 2015.
- HE, S.; CHEN, X. Could the new body shape index predict the new onset of diabetes mellitus in the Chinese population? **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e50573, 2013.
- HE, S.; ZHENG, Y.; SHU, Y.; HE, J., *et al.* Hypertriglyceridemic waist might be an alternative to metabolic syndrome for predicting future diabetes mellitus. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e73292, 2013.
- HEANEY, R. P.; RECKER, R. R.; GROTE, J., *et al.* Vitamin D(3) is more potent than vitamin D(2) in humans. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96, n. 3, p. E447–E452, mar. 2011.
- HEIANZA, Y.; ARASE, Y.; TSUJI, H., *et al.* Metabolically healthy obesity, presence or absence of fatty liver, and risk of type 2 diabetes in Japanese individuals: Toranomon Hospital Health Management Center Study 20 (TOPICS 20). **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 99, n. 8, p. 2952–2960, aug. 2014.

- HEINRICH, S.; LANG, H. Hepatic resection for primary and secondary liver malignancies. **Surgical Innovation**, v. 2, n. 1, p. 1–8, 2017.
- HEISLER, LK.; JOBST, E. E.; SUTTON, G. M., *et al.*, Serotonin reciprocally regulates melanocortin neurons to modulate food intake, **Neuron**, v. 51, n. 2, p. 239-49, 2006.
- HEMARAJATA, P.; VERSALOVIC, J. Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation, **Therapeutics Advances in Gastroenterology**, v. 6, n. 1, p. 39-51, 2013.
- HERRERA, B. M.; LINDGREN, C. M. The Genetics of Obesity. **Current Diabetes Reports**, v. 10, n. 6, p. 498–505, dec. 2010.
- HERSOUG, LG., MOLLER, P.; LOFT, S. Gut microbiota-derived lipopolysaccharide uptake and trafficking to adipose tissue: implications for inflammation and obesity, **Obesity Reviews**, v. 17, p. 297–312, 2016.
- HILTON, L. K.; LOUCKS, A. B. Low energy availability, not exercise stress, suppresses the diurnal rhythm of leptin in healthy young women. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v. 278, p.E43-E49, 2000.
- HIMBERT, C.; OSE, J.; DELPHAN, M. *et al.* A systematic review of the interrelation between diet and surgery-induced weight loss and vitamin D status. **Nutrition Research**, v. 38, p. 13–26, feb. 2017.
- HINNEY, A.; VOGEL, C. L.; HEBEBRAND, J. From monogenic to polygenic obesity: recent advances, **European Child and Adolescent Psychiatry**, v. 19, n. 3, p. 297–310, Mar, 2010.
- HINNEY, A.; GIURANNA, J. Polygenic Obesity. In: Freemark M. (eds) Pediatric Obesity, **Contemporary Endocrinology**, Humana Press, Cham, 2018.
- HINNOUHO, G. M.; CZERNICHOW, S.; DUGRAVOT, A., *et al.* Metabolically healthy obesity and risk of mortality: does the definition of metabolic health matter?. **Diabetes Care**, v. 36, p. 2294-2300, 2013.
- HIRANI, V.; CUMMING, R. G.; NAGANATHAN, V., *et al.* Longitudinal Associations Between Vitamin D Metabolites and Sarcopenia in Older Australian men: The Concord Health and Aging in Men Project. **The Journal of Gerontology, Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 00, n. 00, p. 1-8, may. 2017.
- HITA-CONTRERAS, F.; MARTÍNEZ-AMAT, A.; CRUZ-DÍAZ, D., *et al.* Osteosarcopenic obesity and fall prevention strategies. **Maturitas**, v. 80, n. 2, p. 126–132, feb. 2015.
- HLAING, T. T.; COMPSTON, J. E. Biochemical markers of bone turnover – uses and limitations. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 51, (Pt 2), p.189-202, mar. 2014.
- HOJOYO, S.; FUKADA, T. Zinc transporters and signaling in physiology and pathogenesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 611, p. 43-50, dec. 2016.

HOLICK, M. F.; CHEN, T. C. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, n. 4, p. 1080S-1086S, apr. 2008.

HOLICK, MF., Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, n. 4, p. 1080S-1086S, Apr. 2008.

HOSNEY, M.; SABET, S; EL-SHINAWI, M., *et al.*, Leptin is overexpressed in the tumor microenvironment of obese patients with estrogen receptor positive breast cancer, **Experimental and Therapeutic Medicine**, v.13, p. 2235-2246, 2017.

HOSSEIN-NEZHAD, A.; HOLICK, M. F. Vitamin D for health: a global perspective, **Mayo Clinic Proceedings**, v. 88, n. 7, p. 720-55, 2013.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860-7, dec. 2006.

HOWARD, J. K.; CAVE, B. J.; OKSANEM, L. J., *et al.*, Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Soc3. **Nature Medice**, v. 10, n. 7, p. 734-8, 2004.

HOWICK, K.; GRIFFIN, B. T.; CRYAN, J. F., *et al.*, From Belly to Brain: Targeting the Ghrelin Receptor in Appetite and Food Intake Regulation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 2, Jan, 2017.

HUBSCHER, S. G. Histological assessment of non-alcoholic fatty liver disease. **Histopathology**, v. 49, n. 5, p. 450-465, out. 2006.

HUH, J. H.; KIM, K. J.; KIM, S. U., *et al.* Obesity is more closely related with hepatic steatosis and fibrosis measured by transient elastography than metabolic health status. **Metabolism**, v. 66, p. 23-31, jan. 2017.

HURSTING, S. D.; HURSTING, M. J. Growth signals, inflammation, and vascular perturbations: mechanistic links between obesity, metabolic syndrome, and cancer. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 32, n. 8, p. 1766-70, aug. 2012.

HWANG, Y. C.; HAYASHI, T.; FUIMOTO, W. Y., *et al.* Visceral abdominal fat accumulation predicts the conversion of metabolically healthy obese subjects to an unhealthy phenotype. **International Journal of Obesity**, v. 39, n. 9, p. 1365–1370, sep. 2015.

IASO. INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF OBESITY, 2010. Disponível em: <<http://www.iaso.org/iotf/obesity/obesitytheglobalepidemic/>>. Acesso em: 12 de outubro de 2017.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2010. Disponível em:<<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em:10 de junho de 2019.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa de Orçamentos Familiares – POF 2008-2009. Antropometria e Estado Nutricional de Crianças, Adolescentes e Adultos no Brasil. 2010. Disponível em:<<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias>> Acesso em: 10 de junho de 2019.

ICSI. INSTITUTE FOR CLINICAL SYSTEMS IMPROVEMENT. Prevention and management of obesity (mature adolescents and adults). Bloomington, **Minn: Institute for Clinical Systems Improvement**, 2011.

ILICH, J. Z.; KELLY, O. J., *et al.* Osteosarcopenic Obesity Syndrome: What Is It and How Can It Be Identified and Diagnosed? **Current Gerontology and Geriatrics Research**, v. 2016, pag. 7325973, sep. 2016.

JAFARI-NASABIAN, P. Osteosarcopenic obesity in women: impact, prevalence, and management challenges. **International Journal of Women's Health**, v. 9, p. 33–42, jan. 2017.

JANSSEN, I. Evolution of sarcopenia research. **Applied Physiology Nutrition and Metabolism**, v. 35, n. 5, p. 707-712, aug. 2010.

JARUVONGVANICH, V.; AHUJA, W.; SANGUANKEO, A., *et al.* Vitamin D and histologic severity of nonalcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. **Digestive and Liver Disease**, v. 49, n. 6, p. 618-621, jun. 2017.

JENSEN, M. D.; RYAN, D. H.; APOVIAN, C. M., *et al.* 2013 AHA/ACC/TOS guideline for the management of overweight and obesity in adults: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, and The Obesity Society. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 63, n. 25 (Pt B), p. 2985-3023, jul. 2014. Erratum in: **Journal of the American College of Cardiology**, v. 63 n. 25 (Pt B), p. 3029-3030, jul 2014.

JOHANSSON, H.; KANIS, J. A.; ODEN, A.; *et al.* A meta-analysis of the association of fracture risk and body mass index in women. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 29, n. 1, p. 223-33, jan. 2014.

JUNG, C. H.; KIM, B. Y.; KIM, K. J., *et al.* Contribution of subcutaneous abdominal fat on ultrasonography to carotid atherosclerosis in patients with type 2 diabetes mellitus. **Cardiovascular Diabetology**, v. 13, n. 1, p. 67, mar. 2014.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia básica. Rio de Janeiro: **Guanabara**, 2008. p. 136-153.

KANG, Y. M.; JUNG, C. H.; CHO, Y. K. Visceral adiposity index predicts the conversion of metabolically healthy obesity to an unhealthy phenotype. **PLoS One**, v. 12, n. 6, p. e0179635, jun. 2017.

KANTARTZIS, K.; MACHANN, J.; SCHICK, F., *et al.* Effects of a lifestyle intervention in metabolically benign and malign obesity. **Diabetologia**, vol. 54, n. 4, p. 864–868, apr. 2011

KARELIS, A. D. Metabolically healthy but obese individuals. **Lancet**, v. 372, n. 9646, p. 1281–1283, out. 2008.

KATZ, K.; BRAR, P. C.; PAREKH, N., *et al.* Suspected nonalcoholic Fatty liver disease is not associated with vitamin d status in adolescents after adjustment for obesity. **Journal of Obesity**, v. 2010, p. 496829, 2010.

- KAUR, R.; AMBWANI, S. R.; SINGH, S. Endocannabinoid System: A Multi-Facet Therapeutic Target, **Current Clinical Pharmacology**, v. 11, n. 2, p. 110-7, 2016.
- KELLY, O. J.; GILMAN, J. C.; KIM, Y., *et al.* Micronutrient intake in the etiology, prevention and treatment of osteosarcopenic obesity. **Current Aging Science**, v. 9, n. 4, p. 260-268, may. 2016.
- KHERA, AV.; CHAFFIN, M. WADE, K. H., *et al.*, Polygenic Prediction of Weight and Obesity Trajectories from Birth to Adulthood. **Cell**, v. 177, n. 3, p. 587–596.e9, 2019.
- KIM, H.; LEE, S H.; KIM, B. J., *et al.*, Association between obesity and femoral neck strength according to age, sex, and fat distribution. **Osteoporosis International**, v. 28, n. 7, p. 2137-2146, Mar, 2017.
- KIM, H. T.; KIM, H. J.; AHN, H. Y., *et al.* An analysis of age-related loss of skeletal muscle mass and its significance on osteoarthritis in a Korean population. **The Korean Journal of Internal Medicine**, v. 31, n. 3, p. 585-593, may. 2016.
- KIM, T. N.; PARK, M. S.; LIM, K. I., *et al.* Relationships between sarcopenic obesity and insulin resistance, inflammation, and vitamin D status: the Korean Sarcopenic Obesity Study. **Clinical endocrinology (Oxford)**, v. 78, n. 4, p. 525-32, apr. 2013.
- KOHARA, K.; OCHI, M.; TABARA, Y., *et al.* Leptin in sarcopenic visceral obesity: possible link between adipocytes and myocytes. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e24633, sep. 2011.
- KOHN, L. D.; WALLACE, B.; SCHWARTZ, F., *et al.*, Is type 2 diabetes an auto immune inflammatory disorder of the innate immune system. **Endocrinology**, v. 146, n. 10, p. 4189-91, 2005.
- KOIKE, S.; RICHARDS, M.; WOND, A., *et al.*, Fat mass and obesity-associated (FTO) rs9939609 polymorphism modifies the relationship between body mass index and affective symptoms through the life course: a prospective birth cohort study. **Nature**, v. 8, p. 62, mar. 2018.
- 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.
- KRAKAUER, N. Y.; KRAKAUER, J. C. Dynamic association of mortality hazard with body shape. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e88793, feb. 2014.
- KRAMER, C. K.; ZINMAN, B.; RETNAKARAN, R., *et al.* Are Metabolically Healthy Overweight and Obesity Benign Conditions? A Systematic Review and Meta-analysis. **Annals of Internal Medicine**, v. 159, n. 11, p. 758-769, dec. 2013.
- KULL, M.; KALLIKORM, R.; LEMBER, M. Body mass index determines sunbathing habits: implications on vitamin D levels. **Journal of Internal Medicine**, v. 39, n. 4, p. 256–258, apr. 2009.

KWON, Y.; KIM, H. J.; LO MENZO, E., *et al.* Anemia, iron and vitamin B12 deficiencies after sleeve gastrectomy compared to Roux-en-Y gastric bypass: a meta-analysis. **Surgery for Obesity and Related Diseases**, v. 10, n. 4, p. 589-97, jul./aug. 2014.

KYUNG, T. W.; LEE, J. E.; PHAN, T. V., *et al.* Osteoclastogenesis by bone marrow-derived macrophages is enhanced in obese mice. **Journal of Nutrition**, v. 139, n. 3, p. 502-506, mar. 2009.

LANCGLEY, G. Fluid, Electrolytes, and Acid-Base Disorders. In: Gottschlich, M. M. **The A.S.P.E.N. nutrition support core curriculum: a case based approach – the adult patient**. American Society for Parenteral and Enteral Nutrition. 2007. p. 104-28.

LATIFI, S. M., KARANDISH, M., SHAHBAZIAN, H., *et al.* Prevalence of Metabolically Healthy Y Obesity (MHO) and its relation with incidence of metabolic syndrome, hypertension and type 2 Diabetes amongst individuals aged over 20 years in Ahvaz: A 5 Year cohort Study (2009–2014). **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, 2017.

LE CHATELIER, E.; NIELSEN, T.; QIN, J., *et al.*, Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. **Nature**, v. 500, p. 541–546, 2013.

LEE, M. K.; RHEE, E. J.; JIM, M. C., *et al.* Metabolic Health Is More Important than Obesity in the Development of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A 4-Year Retrospective Study. **Endocrinology and Metabolism**, v. 30, n. 4, p. 522-530, dec. 2015.

LEE, S. H.; YUN, J. M.; KIM, S. H., *et al.* Association between bone mineral density and nonalcoholic fatty liver disease in Korean adults. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 11, n. 39, p.1329-1336, aug. 2016.

LEE, S. Y.; GALLAGHER, D. Assessment methods in human body composition. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 11, n. 5, p. 566-72, sep. 2008.

LEE, T. H.; JEON, W. S.; HAN, K. J., *et al.* Comparison of Serum Adipocytokine Levels according to Metabolic Health and Obesity Status. **Endocrinology and Metabolism**, v. 30, n. 2, p.185-194, jun. 2015.

LEITE, B. F.; JAMAR, G.; CARANTI, D. A. **Ácidos graxos e Síndrome Metabólica. NUTRIRE: REVISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO**, v. 39, n. 1, p. 113-129, abr. 2014.

LEITE, N. C.; VILLELA-NOGUEIRA, C. A., CARDOSO, C. R. L., *et al.* Non-alcoholic liver disease and diabetes: From physiopathological interplay to diagnosis and treatment. **The World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 26, p. 8377-8392, jul.2014

LEVINE, M. E.; CRIMMINS, E. M. The impact of insulin resistance and inflammation on the association between sarcopenic obesity and physical functioning. **Obesity (Silver Spring)**. v. 20, n. 10, p. 2101-6, oct. 2012.

LEY, R. E.; TURNBAUGHT, P. J.; KLEIN, S., *et al.*, Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. **Nature**, v. 444, p. 1022–1023, 2006.

- LI, J.; SAROSI, I.; YAN, X. Q., *et al.* Rank is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 4, p. 1566-1571, feb. 2000.
- LI, L.; ZHANG, L.; PAN, S., *et al.* No significant association between vitamin D and nonalcoholic fatty liver disease in a Chinese population. **Digestive diseases and sciences**, v. 58, n. 8, p. 2376-82, aug. 2013.
- LI, M.; XU, Y.; XU, M., *et al.* Association between nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and osteoporotic fracture in middle-aged and elderly Chinese. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 97, n. 6, p. 2033–2038, jun. 2012.
- LI, R.; GUO, E.; YANG, J., *et al.* 1,25(OH)2D3 attenuates hepatic steatosis by inducing autophagy in mice. **Obesity**, v. 25, n. 3, p. 561-571, mar. 2017.
- LIJUAN, S.; LANJING, M. A.; YUBO, M. A., *et al.*, Insights into the role of gut microbiota in obesity: pathogenesis, mechanisms, and therapeutic perspectives, **Protein Cell**, v. 9, n. 5, p. 397–403, May, 2018.
- LINDGREN, A.; KILANDER, A.; BAGGE, E., *et al.* Holotranscobalamin: a sensitive marker of cobalamin malabsorption. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 29, n. 4, p. 321-9, apr.1999.
- LIOU, I.; KOWDLEY, K. V. Natural history of nonalcoholic steatohepatitis. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 40, n. Suppl. 1, p. S11–6, 2006.
- LIU, Y., CHENG, F.; LUO, Y. X., *et al.* The role of cytochrome P450 in nonalcoholic fatty liver induced by high-fat diet: a gene expression profile analysis. **Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi**, v. 25, n. 4, p. 285-290, apr. 2017.
- LIU, Y.; DING, W.; WANG, H. L., *et al.*, Gut microbiota and obesity-associated osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**, May, 2019.
- LOHMAN, T.; CABALLERO, B.; DAVIS, S. Pathways: A school-based program for the primary prevention of obesity in American Indian children. **Journal of Nutrition**, 1998.
- LO MENZO, E.; CAPPELLANI, A.; ZANGHI, A., *et al.* Nutritional Implications of Obesity: Before and After Bariatric Surgery. **Bariatric Surgical Practice and Patient Care**, v. 9, n. 1, p. 9–17, mar. 2014.
- LOOMBA, R.; SANYAL, A. J. The global NAFLD epidemic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 10, n. 11, p. 686-690, nov. 2013.
- LÓPEZ-JARAMILLO, P.; GOMEZ-ARBELAEZ, D.; LÓPEZ-LÓPEZ, J., *et al.*,The role of leptin/adiponectin ratio in metabolic syndrome and diabetes. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v. 18, n. 1, p. 37-45, 2014.
- LOWENSTEIN, F. W.; STANTON, M, F. Serum magnesium levels in the United States, 1971 – 1974. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 5, n. 4 p. 399 – 414, 1986.

- LV, Y.; LIANG, T.; WANG., G., *et al.*, Ghrelin, a gastrointestinal hormone, regulates energy balance and lipid metabolism. **Bioscience Reports.**, v. 38, n. 5, Sep, 2018.
- MACDONALD, H. M.; MAVROEIDI, A.; BARR, R. J., *et al.* Vitamin D status in postmenopausal women living at higher latitudes in the UK in relation to bone health, overweight, sunlight exposure and dietary vitamin D. **Bone**, v. 42, n. 5 , p. 996–1003, may. 2008.
- MACHADO, M. V.; CORTEZ-PINTO, H. Diet, microbiota, obesity, and NAFLD: a dangerous quartet. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 4, p. 481, apr. 2016.
- MAFA, F.; LOTERSZTAJN, S. Pathophysiology of NASH: perspectives for a targeted treatment. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 29, p. 5250-69, 2013.
- MAGAIN, A. C.; RICHARD, T.; DE BECKER, B., *et al.* Complications non-chirurgicales de la chirurgie bariatrique: à propos de quatre cas et revue de la littérature. **Revue Médicale de Bruxelles**, v. 37, n. 1, p. 26-34, jan-feb, 2016.
- MAJUMDER, S.; SORIANO, J.; LOUIE CRUZ, A., *et al.* Vitamin B12 deficiency in patients undergoing bariatric surgery: preventive strategies and key recommendations. **Surgery for Obesity and Related Diseases**, v. 6, n. 9, p.1013-9, 2013.
- MANOY, P., ANOMASIRI, W.; YUKTANANDANA, P., *et al.* Elevated serum leptin levels are associated with low vitamin D, sarcopenic obesity, poor muscle strength, and physical performance in knee osteoarthritis. **Biomarkers**, v. 19, p. 1-8, abr. 2017.
- MARTI, A.; MARTINEZ-GONZÁLEZ, M. A.; MARTINEZ, J. A. Interaction between genes and lifestyle factors on obesity. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 67, n. 1, p. 1–8, feb. 2008.
- MARZ, W.; KLEBER, M. E.; SCHARNAGL, H., *et al.* HDL cholesterol: reappraisal of its clinical relevance. **Clinical Research in Cardiology**, v. 106, n. 9, p. 663-675, 2017.
- MATTHEWS, D. R.; HOSKER, J. P.; RUDENSKI, A. S., *et al.* Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, vol . 28, n. 7, p. 412-9, 1985.
- MATTHIAS, B.; SCHULZE. Metabolic health in normal-weight and obese individuals. **Diabetologia**. v. 62, p. 558–566, 2019.
- MAZIER, W.; SAUCISSE, N.; GATTA-CHERIFI, B., *et al.*, The Endocannabinoid System: Pivotal Orchestrator of Obesity and Metabolic Disease, **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 26, n. 10, p. 524-537, Oct, 2015.
- McMORROW, A. M.; CONNAUGHTON, R. M.; LITHANDER, F. E., *et al.* Adipose tissue dysregulation and metabolic consequences in childhood and adolescent obesity: potential impact of dietary fat quality. **The Proceedings of the Nutrition Society**, vol. 74, n. 1, p. 67–82, feb. 2015.

- MEIJNIKMAN, A. S.; GERDES, V. E.; NIEUWDORP, M., *et al.*, Evaluating causality of gut microbiota in obesity, **Endocrine Reviews**, v. 39,n. 2, p. 133-153, Apr,2018.
- MEISTER, B. Control of food intake via leptin receptors in the hypothalamus. **Vitamin and Hormones**, v. 59, p. 265-304, 2000.
- MIL, V.; BITER, L. U.; VAN DE GEIJN, G. J. M., *et al.*, The Effect Of Sex And Menopause On Carotid Intima Media Thickness and Pulse Wave Velocity In Morbid Obesity, **European Journal of Clinical Investigation**, Apr, 2019.
- MILLER, G. D.; NORRIS, A.; FERNANDEZ, A. Changes in nutrients and food groups intakes following laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass (RYGB). **Obesity Surgery**, v. 24, n. 11, p. 1926–1932, nov. 2014.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Vigitel 2016, Brasil, 2017. Disponível em: <<https://www.endocrino.org.br/media/uploads/PDFs/vigitel.pdf>>, Acesso em: 09 de Março de 2017.
- MOLINA, P. E. Cálcio. In: _____. Fisiologia endócrina. 2. ed. São Paulo: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2007. cap. 10.
- MORRIS, H. A.; ANDERSON, P. H. Vitamin D metabolism and biological activities. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 347, n. 1-2, p. 1-2, dec. 2011.
- MURRAY, T. É.; WILLIAMS, D.; LEE, M. J. Osteoporosis, obesity, and sarcopenia on abdominal CT: a review of epidemiology, diagnostic criteria, and management strategies for the reporting radiologist. **Abdominal Radiology (New York)**, aug. 2017.
- MUSTAFÁ, S. A cirurgia bariátrica e a perda óssea. **International Journal of Nutrology**, v. 7, n. 1, p. 22-30, jan./apr. 2014.
- NAYLOR, K.; EASTELL, R. Bone turnover markers: use in osteoporosis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 8, n. 7, p. 379-89, jun. 2012.
- NCD. Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19·2 million participants. **Lancet**, v. 387, n. 10026, p. 1377-96, apr. 2016.
- NG, M.; FLEMING, T.; ROBINSON, M., *et al.* Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet**, v. 384, p. 766-781, 2014.
- NETO, S. A.; SAHEB, G. C. B.; ARANTES, S. B., *et al.*, Fatores ambientais, comportamentais e neuroendocrinológicos envolvidos na gênese da epidemia da obesidade, **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde**, v. 33, n. 1, p. 44-53, 2007.
- NIELSON, C. M.; SRIKANTH, P.; ORWOLL, E. S. Obesity and fracture in men and women: an epidemiologic perspective. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 27, n. 1, p. 1-10, jan. 2012.

- NOHR, M. K.; PEDERSEN, M. H.; GILLE, A., *et al.*, GPR41/FFAR3 and GPR43/FFAR2 as cosensors for short-chain fatty acids in enteroendocrine cells vs FFAR3 in enteric neurons and FFAR2 in enteric leukocytes, **Endocrinology**, v. 154, p. 3552–3564, 2013.
- NOKOFF, N.; THURSTON, J.; HILKIN, A., *et al.*, Sex Differences in Effects of Obesity on Reproductive Hormones and Glucose Metabolism in Early Puberty, **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Apr, 2019.
- NOVACK, D. V.; TEITELBAUM, S. L. The osteoclast: friend or foe? **Annual Review of Pathology**, v. 3, p. 457-484, feb. 2008.
- O'BRIEN, P. E.; MACDONALD, L.; ANDERSON, M., *et al.*, Long-term outcomes after bariatric surgery: fifteen-year follow-up of adjustable gastric banding and a systematic review of the bariatric surgical literature. **Annual of Surgery**, v.257, p. 87-94, 2013.
- OGORODNIKOVA, A. D.; KIM, K.; MCGINN, A. P., *et al.* Incident cardiovascular disease events in metabolically benign obese individuals. **Obesity (Silver Spring)**, vol. 20, n. 3, p. 651–9, mar. 2012.
- OKADA, S.; YORK, D. A.; BRAY, G. A., *et al.*, Differential inhibition of fat intake in two strains of rat by the peptide enterostatin. **American Journal of Physiology**, v. 262, n. 6pt2, p. R1111-6, 1992.
- OKUR, G.; KARACAER, Z. The prevalence of non-alcoholic fatty liver disease in healthy young persons. **Northern Clinics of İstanbul**, v. 3, n. 2, p.111–7, oct. 2016.
- OLIVEIRA, M. L. Estimativa dos custos da obesidade para o Sistema Único de Saúde do Brasil. 2013. 109f. Tese (Doutorado em Nutrição Humana) – Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade de Brasília, Brasília, 2013.
- ONG, T.; SAHOTA, O.; TAN, W., *et al.* A United Kingdom perspective on the relationship between body mass index (BMI) and bone health: a cross sectional analysis of data from the Nottingham Fracture Liaison Service. **Bone**, v. 59, p. 207–210, feb. 2014.
- ORMSBEE, M. J.; PRADO, C. M.; ILICH, J. Z., *et al.* Osteosarcopenic obesity: the role of bone, muscle, and fat on health. **The Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 5, n. 3, p.183–192, sep. 2014.
- OVEJO, M. L.; GAMSTEDT, M.; COLIN, M., *et al.* GABAergic nature of hypothalamic leptin target neurones in the ventromedial arcuate nucleus, **Journal of Neuroendocrinology**, v. 13, n. 6, p. 505-16, Jun, 2001.
- OYEYEMI, BF.; OLOGUNDE, C. A.; OLAYONE, A. B., *et al.*, FTO Gene Associates and Interacts with Obesity Risk, Physical Activity, Energy Intake, and Time Spent Sitting: Pilot Study in a Nigerian Population. **Journal of Obesity**, May, 2017.
- PALACIOS, C. The role of nutrients in bone health, from A to Z. Critical reviews in food science and nutrition. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, n. 8, p. 621-628, 2006.

- PAN, X.; WANG, P.; WANG, Z., *et al.* Adipogenic changes of hepatocytes in a high-fat diet-induced fatty liver mice model and non-alcoholic fatty liver disease patients. **Endocrine**, v. 48, n. 3, p. 834-47, apr. 2015.
- PAPPACHAN, J. M.; ANTONIO, F. A.; EDAVALATH, M., *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease: a diabetologist's perspective. **Endocrine**, v. 45, n. 3, p. 344–53, apr. 2014.
- PAREKH, PJ.; ARUSI, E.; VINIK, AI.; JOHNSON, DA.; The Role and Influence of Gut Microbiota in Pathogenesis and Management of Obesity and Metabolic Syndrome, **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 5., 2014.
- PARIKH, S. J.; YANOVSKI, J. A. Calcium intake and adiposity. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, n. 2, p. 281-287, feb. 2003.
- PARK M.; LIN, L.; THOMAS, S., *et al.*, The F1-ATPase beta-subunit is the putative enterostatin receptor. **Peptides**, v. 25, n. 12, p. 2127-33, 2004.
- PATEL, P. S.; BURAS, E. D.; BALASUBRAMANYAM, A. The role of the immune system in obesity and insulin resistance. **Journal of Obesity**, v. 2013, ID. 616193, p. 1-9, mar. 2013.
- PEARLMAN, M.; LOOMBA, R. State of art: treatment of nonalcoholic steatohepatitis. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 30, n. 3, p. 223-37, mayo. 2014.
- PEARSON, T. A.; MENSAH, G. A.; ALEXANDER, R. W., *et al.* Markers of inflammation and cardiovascular disease: Application to clinical and public health practice: A Statement for Healthcare Professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. **Circulation**, v. 107, p. 499-511, jan. 2003.
- PERELLO, M.; SCOTT, M. M.; SAKATA, I., *et al.*, Functional implications of limited leptin receptor and ghrelin receptor coexpression in the brain. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 520, n. 2, p. 281-94, Feb, 2012.
- PERNA, S.; PERONI, G.; FALIVA, M, A., *et al.* Sarcopenia and sarcopenic obesity in comparison: prevalence, metabolic profile, and key differences. A cross-sectional study in Italian hospitalized elderly. **Aging Clinical and Experimental Research**, feb. 2017.
- PHILLIPS, C. M. Metabolically healthy obesity: definitions, determinants and clinical implications. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, vol. 14, n. 3, p. 219–27, sep. 2013.
- PHILLIPS, L. K.; PRINS, J. B. The link between abdominal obesity and the metabolic syndrome. **Current Hypertension Reports**, v. 10, n. 2, p. 156-64, Apr, 2008.
- PLUM, L.; SCHUBERT, M.; BRUNING, J. C., The role of insulin receptor signaling in the brain, **Trends Endocrinology and Metabolism**, v. 16, n. 2, p. 59-65, 2005.
- POGGIOPALLE, E.; DONINI, L. M.; LENZI, A., *et al.*, Non-alcoholic fatty liver disease connections with fat-free tissues: A focus on bone and skeletal muscle, **World Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 10, p. 1747–1757, Mar, 2017.

- POLYZOS, S. A.; KOUNTOURAS, J.; DERETZI, G., *et al.* The emerging role of endocrine disruptors in pathogenesis of insulin resistance: a concept implicating nonalcoholic fatty liver disease. **Current Molecular Medicine**, v. 12, n. 1, p. 68–82, jan. 2012.
- POLYZOS, S. A.; KOUNTOURAS, J.; MANTZOROS, C. S., *et al.* Adipokines in nonalcoholic fatty liver disease. **Metabolism**, v. 65, n. 8, p. 1062-1079, aug. 2016.
- POLYZOS, S. A.; KOUNTOURAS, J.; ZAVOS, C. Nonalcoholic fatty liver disease: the pathogenetic roles of insulin resistance and adipocytokines. **Current Molecular Medicine**, v. 9, n. 3, p. 299–314, apr. 2009.
- POLYZOS, S. A.; KOUNTOURAS, J.; MANTZOROS, C. S. Adipose Tissue, Obesity and non-alcoholic fatty liver disease, **Minerva Endocrinologica**, v. 42, n. 2, p. 92-108, Jun, 2017.
- POONPET, T.; HONSAWEK, S. Adipokines: Biomarkers for osteoarthritis? **The World Journal of Orthopedics**, v. 5, n. 3, p. 319–327, jul. 2014.
- POTTER, J. J.; LIU, X.; KOTEISH, A., *et al.* 1,25-dihydroxyvitamin D3 and its nuclear receptor repress human alpha1 (I) collagen expression and type I collagen formation. **Liver International**, vol. 33, n. 5, p. 677–86, mayo. 2013.
- PRATT, D. S.; KAPLAN, M. M. Avaliação da função hepática. In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson LR, editors. Harrison medicina interna. 15a ed. Rio de Janeiro: Editora Mc Graw Hill, p.1813-6, 2002.
- PRAVEENRAJ, P.; GOMES, R. M.; KUMAR, S., *et al.* Prevalence and Predictors of Non Alcoholic Fatty Liver Disease in Morbidly Obese South Indian Patients Undergoing Bariatric Surgery. **Obesity Surgery**, v. 25, n. 11, p. 2078-87, nov. 2015.
- PRINCE, R. L.; KUK, J. L.; AMBLER, K. A., *et al.* Predictors of metabolically healthy obesity in children. **Diabetes Care**, v. 37, n. 5, p. 1462-1468, may. 2014.
- Protein Cell**, 9(5): 397–403, May, 2018.
- PUJIA, A.; GAZZARUSO, C.; FERRO, Y., *et al.* Individuals with Metabolically Healthy Overweight/Obesity Have Higher Fat Utilization than Metabolically Unhealthy Individuals. **Nutrients**, v. 8, n. 1, p. 2, jan. 2016.
- PURSER, M. J.; DALVI, P. S.; WANG, Z. C., *et al.*, The Cytokine Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) Activates Hypothalamic Urocortin-Expressing Neurons Both In Vitro and In Vivo, **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. e61616., 2013.
- RAMALHO, A. Fome Oculta: Diagnóstico, Tratamento e Prevenção. 1^a ed., São Paulo: Editora Atheneu, 2009.
- RAY, A.; FORNSAGLIO, J.; DOGAN, S., *et al.*, Gynaecological cancers and leptin: A focus on the endometrium and ovary, **Facts Views Obgyn**, v. 10, n. 1, p. 5-18, Mar, 2018.
- REDDON, H.; GUEANT, J. L.; MEYRE, D. The importance of gene–environment interactions in human obesity, **Clinical Neuroscience Research**, v. 130, n. 18, p. 1571–1597, 2016.

- REES, SD.; ISLAM, M.; HYDRIE, M. Z. I., *et al.* An FTO variant is associated with Type 2 diabetes in South Asian populations after accounting for body mass index and waist circumference, **Diabetic Medicine**, v.28, n. 6, p. 673–680, Jun, 2011.
- REGA-KAUN, G.; KAUN, C.; WOJTA, J. More than a simple storage organ: adipose tissue as a source of adipokines involved in cardiovascular disease. **Thrombosis and Haemostasis**, vol. 110, p. 641–50, mar. 2013.
- REINHER, T.; ROTH, C. L. A new link between skeleton, obesity and insulin resistance: relationships between osteocalcin, leptin and insulin resistance in obese children before and after weight loss. **International Journal of Obesity**, v. 34, p. 852–858, mayo. 2010.
- RICHEV, J. M. ; WOOLCOTT, O. Re-visiting the Endocannabinoid System and Its Therapeutic Potential in Obesity and Associated Diseases. **Current Diab Reports**, v. 17, n. 10, p. 99, Sep, 2017.
- RICHEY, JM.; WOOLCOTT, O. Re-visiting the Endocannabinoid System and Its Therapeutic Potential in Obesity and Associated Diseases, **Current Diabetes Reports**, v. 17, n. 10, p. 99., Sep,2017
- RIDAURA, V. K.; FAITH, J.J.; REY, F. E., *et al.* Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. **Science**, v. 341, p. 1241214, 2013.
- RINELLA, M. E. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. **The Journal of the American Medical Association**, v. 313, n. 22, p. 2263-73, jun. 2015.
- RIVAS, E.; HUYNH, H.; GALASSETTI, P. R. Obesity Affects Submaximal Oxygen Uptake-Heart Rate Relationship and Exercise Economy Differently in Pre- and Post-pubescent Boys and Girls. **International Journal of Exercise Science**, v. 12, n. 3, p. 748-763, 2019.
- RIVERA, M.; LOCKE, A. E.; CORRE, T., *et al.*, Interaction between the FTO gene, body mass index and depression: meta-analysis of 13701 individuals. **The British Journal of Psychiatry**, v. 211, n. 2, p. 70–76, Aug, 2017.
- RIVEROS-MCKAY, F.; MISTRY, V.; BOUNDS, R., *et al.*, Genetic architecture of human thinness compared to severe obesity, **PLoS Genet**, v. 15, n. 1, Jan, 2019.
- ROMAN-GARCIA, P.; QUIROS-GONZALEZ, I.; MOTTRAM, L., *et al.* Vitamin B12-dependent taurine synthesis regulates growth and bone mass. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 7 p. 2988-3002, jul. 2014.
- RONDANELLI, M.; PERNA, S.; FALIVA, M., *et al.* Focus on metabolic and nutritional correlates of polycystic ovary syndrome and update on nutritional management of these critical phenomena. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 290, n. 6, p. 1079–1092, dec. 2014.
- ROTH, C. L.; ELFERS, C. T.; FIGLEWICZ, D. P., *et al.* Vitamin D deficiency in obese rats exacerbates nonalcoholic fatty liver disease and increases hepatic resistin and Toll-like receptor activation. **Hepatology**, v. 55, n. 4, p.1103-11, apr. 2012.

SAMAROPOULOS, X. F.; HAIRSTON, K. G.; ANDERSON, A., *et al.* A metabolically healthy obese phenotype in hispanic participants in the IRAS family study. **Obesity**, v. 21, n. 11, p. 2303-2309, nov. 2013.

SAMUEL, L.; BORRELL, L. N. The effect of body mass index on optimal vitamin D status in U.S. adults: the National Health and Nutrition Examination Survey 2001-2006. **Annals of Epidemiology**, v. 23, n. 7, p. 409–414, jul. 2013.

SARAIVA, G. L.; LAZARETTI-CASTRO, M. Marcadores Bioquímicos da Remodelação Óssea na Prática Clínica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 1, p. 72-8, fev. 2002.

SARWAR, R.; PIERCE, N.; KOPPE, S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: current perspectives. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v.11, p. 533–542, 2018.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA (SBC). VII Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. 2016. Available from: <http://publicacoes.cardiol.br/2014/diretrizes/2016/05_HIPERTENSAO_ARTERIAL.pdf>. Accessed February 2, 2016.

SBCBM (Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e Metabólica). Dúvida sobre cirurgia bariátrica. [Internet] disponível em: <<http://www.sbcbm.org.br/wordpress/tratamento-cirurgico/cirurgialaparoscopica/>>. Acesso em: 25/05/2017.

SCHEITHAUER, T. P. M; DALLINGA-THIE, G. M.; VOS, W. M., *et al.* Causality of small and large intestinal microbiota in weight regulation and insulin resistance. **Molecular Metabolism**, v. 10, n. 5, p. 759-70, jun. 2016.

SCHENK, J. M.; NEUHouser, M. L; BEATTY, S. J., *et al.*, Randomized trial evaluating the role of weight loss in overweight and obese men with early stage prostate Cancer on active surveillance: Rationale and design of the Prostate Cancer Active Lifestyle Study (PALS), **Contemporary Clinical Trials**, p. 34-39, Apr, 2019.

SCHERNTHANER, G.; SCHERNTHANER-REITE, M. H.; SCHERNTHANER, G. H., *et al.* EMPA-REG and Other Cardiovascular Outcome Trials of Glucose-lowering Agents: Implications for Future Treatment Strategies in Type 2 Diabetes Mellitus. **Clinical Therapeutics**, v. 38, n. 6, p. 1288-98, jun. 2016.

SCHOLZ, C.; ANDERGASSEN, U.; HEPP, P., *et al.* Obesity as an independent risk factor for decreased survival in node-positive high-risk breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 151, n. p. 569–76, jun. 2015.

SCHRODER, H.; RAMOS, R.; BAENA-DIEZ J. M., *et al.* Determinants of the transition from a cardiometabolic normal to abnormal overweight/obese phenotype in a Spanish population. **European Journal of Nutrition**, vol. 53, n. 6, p. 1345-53, sep. 2014.

SCHROEDER, BO; BACKHED, F. Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. **Nature Medicine**, v. 22, p. 1079–1089, 2016.

SCHWERGER, K.; ALLARD, J. P. Clinical approaches to non-alcoholic fatty liver disease. **The World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 7, p. 1712-23, feb. 2014.

SEO, J. A.; CHO, H.; EUN, C. R., et al. Association between visceral obesity and sarcopenia and vitamin D deficiency in older Koreans: the Ansan Geriatric Study. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 60, n. 4, p. 700-6, apr. 2012.

SERAVALLE, G; GRASSI, G. Obesity and hypertension. **Pharmacological Research**, v. 122, p. 1-7, August, 2017.

SEVERSON, T. J.; BESSUR, S.; BONKOVSKY, H. L., et al. Genetic factors that affect nonalcoholic fatty liver disease: A systematic clinical review. **The World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 29, p. 6742–6756, aug. 2016.

SHANBHOGUE, V. V.; HANSEN, S.; FROST, M., et al. Bone disease in diabetes: another manifestations of microvascular disease?, **Lancet Diabetes Endocrinol.** v.5, n.10, p. 827-838, Oct., 2017.

SHAPSES, S. A.; RIEDT, C. S. Bone, body weight, and weight reduction: what are the concerns? **Journal of Nutrition**, v. 136, n. 6, p. 1453-1456, jun. 2006.

SHAPSES, S. A.; POP, L. C.; WANG, Y. Obesity is a concern for bone health with aging. **Nutrition Research**, v. 39,p. 1–13, march, 2017.

SHARIFI, N.; AMANI, R.; HAJIANI, E., et al. Does vitamin D improve liver enzymes, oxidative stress, and inflammatory biomarkers in adults with non-alcoholic fatty liver disease? A randomized clinical trial. **Endocrine**, vol. 47, n. 1, p. 70-80, 2014.

SHEA, M. K.; HOUSTON, D. K.; TOOZE, J. A., et al., Health, Aging and Body Composition Study. Correlates and prevalence of insufficient 25-hydroxyvitamin D status in black and white older adults: the health, aging and body composition study. **Journal of The American Geriatrics Society**, v. 59, n. 7, p. 1165–1174, jul. 2011.

SHEIKH, A.; NASRULLAH, A.; HAG, S., et al., The Interplay of Genetics and Environmental Factors in the Development of Obesity, **Cureus**,v. 9, n. 7, p. e1435, jul.2017.

SHIMIZU, Y.; KIM, H.; YOSHIDA, H., et al. Serum 25-hydroxyvitamin D level risk of falls in Japanese community-dwelling elderly women: a 1-year follow-up study, **Osteoporosis International**, 2015.

SHIN, D.; KIM, S.; KIM, K. H., et al. Association between insulin resistance and bone mass in men. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 99, n. 3, p. 998–995, mar. 2014.

SILVA, R. A.; MALTA, F. M.; CORREIA, M. F. Serum vitamin b12, iron and folic acid deficiencies in obese individuals submitted to different bariatric techniques. **ABCD - ARQUIVOS BRASILEIROS DE CIRURGIA DIGESTIVA**, v. 29, n. 1 (Suppl 1), p. 62-66, 2016.

- SILVESTRI, C; DI MARZO, V. Second generation CB1 receptor blockers and other inhibitors of peripheral endocannabinoid overactivity and the rationale of their use against metabolic disorders. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 21, n 9, p. 1309-22, Sep, 2012.
- SIMON, V.; COTA, D. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Endocannabinoids and metabolism: past, present and future, **European Journal of Endocrinology**, v. 176, n. 6, p. R309-R324, Jun, 2017.
- SNOW, C. F. Laboratory diagnosis of vitamin B₁₂ and folate deficiency: a guide for the primary care physician. **Archives of Internal Medicine**, v. 159, n. 12, p. 1289-98, jun. 1999.
- SORIGUER, F.; GUTIERREZ-REPISO C.; RUBIO-MARTIN E., *et al.* Metabolically healthy but obese, a matter of time? Findings from the prospective Pizarra study. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, vol. 98, n. 6, p. 2318–2325, jun. 2013.
- SOROP, O.; OLVER, T. D.; VAN DE WOUW, J., *et al* The microcirculation: a key player in obesity-associated cardiovascular disease. **Cardiovascular Research** , v. 113, n. 9, p. 1035-1045, July ,2017.
- STAGI, S.; CAVALLI, L.; IURATO, C., *et al*. Bone metabolism in children and adolescents: main characteristics of the determinants of peak bone mass. **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism**, v. 10, n. 3, p. 172–179, 2013.
- STEFAN, N.; HARING, H. U.; HU, F. B., *et al*. Metabolically healthy obesity: epidemiology, mechanisms, and clinical implications. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, vol.1, n. 2, p. 152-62, oct. 2013.
- STEIN, E. M.; CARRELLI, A.; YOUNG, P., *et al*. Bariatric surgery results in cortical bone loss. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 98, n. 2, p. 541–549, jan. 2013.
- SUN, L.; MA, L.; MA, Y., *et al*. Insights into the role of gut microbiota in obesity: pathogenesis, mechanisms, and therapeutic perspectives, **Protein Cell**, v. 9, n. 5, p. 397–403, May, 2018.
- SUZUKI, T. Frontiers in vitamin D; basic research and clinical application. Vitamin D and falls. **Clinical Calcium**, vol. 21, n. 11, p. 71-9, nov. 2011.
- SVEGLIATI-BARONI, G.; PIERANTONELLI, I.; TORQUATO, P., *et al*. Lipidomic biomarkers and mechanisms of lipotoxicity in non-alcoholic fatty. **Free Radical Biology and Medicine**, pii: S0891-5849(19)30326-0, 2019.
- SZLEJF, C.; PARRA-RODRÍGUEZ, L.; ROSAS-CARRASCO, O. Osteosarcopenic Obesity: Prevalence and Relation with Frailty and Physical Performance in Middle-Aged and Older Women. **Journal of the American Medical Directors Association**, v. 18, n. 8, p. 733e1-733e5, aug. 2017.
- TANAKA, N.; T. AYOYAMA.; KIMURA, S., *et al*. Targeting nuclear receptors for the treatment of fatty liver disease. **Pharmacology and Therapeutics**, pii: S0163 7258(17)30130-4, mayo, 2017.

- TANAKA, S.; KURODA, T.; SAITO, M., *et al.* Overweight/obesity and underweight are both risk factors for osteoporotic fractures at different sites in Japanese postmenopausal women. **Osteoporosis International**, v. 24, n. 1, p. 69-76, jan. 2013.
- TARGHER, G.; LONARDO, A.; ROSSINI, M. Nonalcoholic fatty liver disease and decreased bone mineral density: is there a link? **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 38, n. 8, p. 817–825, aug. 2015.
- TEDESCO, A. K.; BIAZOTTO, R.; GEBARA, T. S. S., *et al.* Pré e pós-operatório de cirurgia bariátrica: algumas alterações bioquímicas. **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 29, n. 1 (Supl.1), p. 67-71, 2016.
- THE 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). **The Journal of the American Medical Association**, v.16, n. 285(19), p. 2486-97, 2002.
- THON M.; OZAWA, K., Insulin enhanced leptin-induced STAT3 signaling by inducing GRP78, **Science Reports**, v. 6, p. 34312, 2016.
- THURNHEER, M.; BISANG, P.; ERNST, B., *et al.* A novel distal very long Roux-en Y gastric bypass (DVLRYGB) as a primary bariatric procedure--complication rates, weight loss, and nutritional/metabolic changes in the first 355 patients. **Obesity Surgery**, v. 22, n. 9, p. 1427-36, Sep, 2012.
- TOREZAN, E. F. G. Revisão das principais deficiências de micronutrientes no pós-operatório do Bypass Gástrico em Y de Roux. **International Journal of Nutrology**, v. 6, n. 1, p. 37–42, jan./fev. 2013.
- TORKAMANI, A.; TOPOL, E. Polygenic Risk Scores Expand to Obesity. **Cell**, v.177, n. 3, p. 518–520, 2019.
- TORSONI, M. A.; CAVALHEIRA, J. B.; PEREIRA-DA-SILVA, J. M., *et al.*, Molecular and functional resistance to insulin in hypothalamus of rats exposed to cold. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v. 285, n. 1, p. E216-23. 14, 2003.
- TOVO, C.; FERNANDES, S. A.; BUSS, C., *et al.*, Sarcopenia and non-alcoholic fatty liver disease: Is there a relationship? A systematic review. **World Journal of Hepatology**, v. 9, n. 6, p. 326-332, feb. 2017.
- TRONIERI, J. S.; WURST, C. M.; PEARL, R. L., *et al.*, Sex Differences in Obesity and Mental Health. **Current Psychiatry Reports**, v. 19, n. 6, 2017.
- TSUNODA, K.; KAI, Y.; KITANO, N., *et al.* Impact of physical activity on nonalcoholic steatohepatitis in people with nonalcoholic simple fatty liver: A prospective cohort study. **Preventive Medicine**, v. 88, p. 237-40, 2016.
- TURNBAUGH, P. J.; LEY, R. E.; MAHOWALD, M. A., *et al.*, An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest, **Nature**, v. 444, p. 1027–1031, 2006.

- VAJRO, P. Diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease in children and adolescents: position paper of the ESPGHAN Hepatology Committee. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition, Philadelphia*, v. 54, n. 5, p. 700-713, may. 2012.
- VAN DER, A. D. L.; NOOYENS, A. C.; VAN DUJINHOVEN, F. J., et al. All-cause mortality risk of metabolically healthy abdominal obese individuals: the EPIC- MORGEN study. *Obesity (Silver Spring)*, vol. 22, n. 2, p. 557-64, 2014.
- VAN VLIET-OSTAPTCHOUK, J. V., NUOTIO, M. L., SLAGTER, S. N., et al. The prevalence of metabolic syndrome and metabolically healthy obesity in Europe: a collaborative analysis of ten large cohort studies. *BMC Endocrine Disorders*, vol. 14, n. 9, feb. 2014.
- VAN WIJNGAARDEN, J. P.; SWART, K. M.; ENNEMAN, A. W., et al. Effect of daily vitamin B-12 and folic acid supplementation on fracture incidence in elderly individuals with an elevated plasma homocysteine concentration: B-PROOF, a randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 100, n. 6, p.1578-86, dec. 2014.
- VASCONCELOS, R. S.; RENATA, S. Factors associated with secondary hyperparathyroidism in premenopausal women undergoing Roux-en-Y gastric bypass for the treatment of obesity. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 54, n. 2, p. 233-238, mar. 2010.
- VELLOSO LA., O controle hipotalâmico fome e da termogênese: implicações no desenvolvimento da obesidade, *Arq Bras Endocrinol Metab*, 50(2):165-76, 2006.
- VERHEYEN, N. Relationship between bone turnover and left ventricular function in primary hyperparathyroidism: The EPATH trial. *PLoS One*. v. 12, n. 4, p. e0173799, apr. 2017.
- VIA, M. A.; MECHANICK, J. I. Nutritional and Micronutrient Care of Bariatric Surgery Patients: Current Evidence Update. *Current Obesity Reports*, v. 6, n. 3, p. 286–296, jul. 2017.
- VIGITEL, VIGITEL BRASIL- 2017 Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas Por Inquérito Telefônico, *Ministério da Saúde*, 2018.
- VILAÇA, T.; et al. Tratado de Obesidade. In: MANCINI, C. M., et al. (Org). – 2.ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. p. 319 – 326.
- VILAR, C. P.; COTRIM, H. P.; FLORENTINO, G. S., et al., Nonalcoholic fatty liver disease in patients with coronary disease from a Brazil northeast area. *Arquivos de Gastroenterologia*, v. 52, n. 2, p.111-6, apr./jun. 2015.
- VIMALESWARAN, K. S.; BERRY, D. J.; LU, C., et al. Causal Relationship between Obesity and Vitamin D Status: Bi-Directional Mendelian Randomization Analysis of Multiple Cohorts. *PLoS Med*, v. 10, n. 2, p. 1-13, 2013.
- VOGEL, C. L.; BOES, T.; REINEHR, T., et al., Common variants near MC4R: exploring gender effects in overweight and obese children and adolescents participating in a lifestyle intervention, *Obesity Facts*, v. 4, p. 67-75, 2011.

- WALSH, J. S.; BOWLES, S.; EVANS, A. L. Vitamin D in obesity. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**, v. 24, p. 000 – 000, 2017.
- WALSH, J. S.; EVANS, A. L.; BOWLES, S., et al. Free 25-hydroxyvitamin D is low in obesity, but there are no adverse associations with bone health. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 103, n. 6, p. 1465–1471, may. 2016.
- WALSH, J. S.; HENRY, Y. M.; FATAYERJI, D., et al. Hormonal determinants of bone turnover before and after attainment of peak bone mass. **Clinical Endocrinology (Oxford)**, v. 72, n. 3, p. 320-7, mar. 2010.
- WANG, J. H.; WANG, F.; YANG, M. J., et al., Leptin regulated calcium channels of neuropeptide Y and proopiomelanocortin neurons by activation of different signal pathways, **Neuroscience**, v. 156, n. 1, p. 89-98, Sep,2008.
- WANNAMETHEE, S. G.; ATKINS, J. L. Muscle loss and obesity: the health implications of sarcopenia and sarcopenic obesity. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 74, n. 4, p. 405–412, nov. 2015.
- WAUQUIER, F.; PHILIPPE, C.; LEOTOING, L., et al. The free fatty acid receptor G protein-coupled receptor 40 (GPR40) protects from bone loss through inhibition of osteoclast differentiation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 9, p. 6542–51, mar. 2013.
- WENG, T. C.; CHANG, C. H.; DONG, Y. H., et al. Anaemia and related nutrient deficiencies after Roux-en-Y gastric bypass surgery: a systematic review and meta-analysis. **BMJ Open**, v. 5, n. 7, p. e006964, jul. 2015.
- WIEGERT, E. V. M., et al. Minerais. In: Calixto-Lima, L; Reis, NT. Interpretação de exames laboratoriais aplicados à nutrição clínica. Rio de Janeiro: **Rubio**, 2012. p.135-152.
- WIMALAWANSA, S, J. Vitamin D deficiency is a surrogate marker for visceral Fat content, metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes, and Future Metabolic Complications. **Journal of Diabetes, Metabolic Disorders & Control**, v. 3, n. 1, p. 00059, feb. 2016.
- WINTERS, S. J.; CHENNUBHATLA, R.; WANG, C., et al. Influence of obesity on vitamin D-binding protein and 25-hydroxy vitamin D levels in African American and white women. **Metabolism**, v. 58, n. 4, p. 438–442, apr. 2009.
- WOLF, E.; UTECH, M.; STEHLE, P., et al. Preoperative micronutrient status in morbidly obese patients before undergoing bariatric surgery: results of a cross-sectional study. **Surgery for Obesity and Related Diseases**, v. 11, n. 5, p. 1157–1163, sep./oct. 2015.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Diet, Nutrition and prevention of chronic diseases. Report of a WHO Expert Committee. Technical Report Series, n. 916, Geneva, 2003.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Fact sheet: obesity and overweight, n. 311, 2011. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. Acesso em: 28 de maio de 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Fact sheet: obesity and overweight, n. 311, 2015. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>>. Acesso em: 06 fev. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Obesity and overweight. Fact sheet N°311. Atualizado em jun. 2016. Disponível em:<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>, Acesso em: 09 set. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Geneva: WHO, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a World Health Organization Consultation. Geneva: WHO, 2000. p. 256. (WHO Obesity Technical Report Series, n. 284).

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The World Health Report, Fighting disease, Fostering development. 1996. Available online: <www.who.int/whr/1996/en/>. (Accessed on 06/06/2016)

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The world health report. Chapter 5. Choosing Interventions to Reduce Specific Risks. 2016. Disponível em: <http://www.who.int/whr/2002/chapter5/en/index5.html>. Acesso em: 28 de ago de 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION- WHO, Controlling the global obesity epidemic, World Health Organization, 2019, Available from: <<https://www.who.int/nutrition/topics/obesity/en/>>, Accessed 02/06/2019

WREE, A.; KAHRAMAN, A.; GERKEN, G., et al. Obesity affects the liver — the link between adipocytes and hepatocytes. **Digestion**, v. 83, n. 1-2, p.124-133, 2011.

WREN, A. M. ; BLOOM, S. R. Gut Hormones and appetite control, **Gastroenterology**, V. 132, n. 6, p. 2116-30, May, 2007.

WU, N.; WANG, Q. O.; LI, H., et al. Relationships between serum adiponectin, leptin concentrations and bone mineral density, and bone biochemical markers in Chinese women. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, n. 9-10, p. 771–775, may. 2010.

WYATT, H. R. Update on Treatment Strategies for Obesity, **Journal Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 98, n. 4, p. 1299-306, Apr, 2013.

XU, A. W.; KAELIN, C. B.; TAKEDA, K., et al., PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons, **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 4, p. 951-8, Apr, 2005.

XU, B.; DUBE, M. G.; KALRA, P. S., et al., Anoretic effects of the cytokine, ciliary neurotropic factor, are mediated by hypothalamic neuropeptide Y: comparison with leptin, **Endocrinology**, v. 139, n. 2, p. 466-73, 1998.

- XU, L.; JIANG, C. Q.; SCHOOLING, C. M., *et al.* Liver enzymes as mediators of association between obesity and diabetes: the Guangzhou Biobank Cohort Study. **Annals of Epidemiology**, v. 27, n. 3, p. 204-207, 2017.
- YANG, M. J.; WANG, F.; WANG, J. H., *et al.*, PI3K integrates the effects of insulin and leptin on large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in neuropeptide Y neurons of the hypothalamic arcuate nucleus, **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, vol. 298, n. 2, p.:E193-201, Feb, 2010.
- YANG, C. W.; LI, C. I.; LI, T. C., *et al.* Association of Sarcopenic Obesity with Higher Serum High-Sensitivity C-Reactive Protein Levels in Chinese Older Males-A Community-Based Study (Taichung Community Health Study-Elderly, TCHS-E). **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0132908, jul. 2015.
- YANG, Y., FENG, Y.; MA, X., *et al.* Visceral adiposity index and insulin secretion and action in first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 31, n. 3, p. 315-21, mar. 2015.
- YOUNOSSI, Z. M.; MARCHEZINI, G.; PINTO-CORTEZ, H., *et al.* Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis: Implications for Liver Transplantation. **Transplantation**, v. 103, n. 1, 2019.
- YOO, H. J.; PARK, M. S.; LEE, C. H., *et al.* Cutoff points of abdominal obesity indices in screening for non-alcoholic fatty liver disease in Asians. **Liver International**, v. 30, n. 8, p. 1189-1196, sep. 2010.
- YOUSSEF, Y.; RICHARD, W. O.; SEKHAR, N., *et al.* Risk of secondary hyperparathyroidism after laparoscopic gastric bypass surgery in obese women. **Surgical Endoscopy**, v. 21, n. 8, p.1393-1396, aug. 2007.
- YU, E. W. Bone metabolism after bariatric surgery. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 29, n. 7, p. 1507–1518, jul. 2014.
- ZILLIKENS, M. C.; UITTERLINDEN, A. G.; VAN LEEUWEN, J. P., *et al.* The role of body mass index, insulin, and adiponectin in the relation between fat distribution and bone mineral density. **Calcified Tissue International**, v. 86, n. 2, p. 116–125, feb. 2010.

ANEXOS

ANEXO 1- Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP)

ANEXO 2- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NUCLEO DE PESQUISA EM MICRONUTRIENTES

CLÍNICA CIRÚRGICA CARLOS SABOYA

INFORMAÇÃO AO PACIENTE

Prezado (a) Paciente:

A vitamina D é bastante conhecida pela sua função no desenvolvimento e na manutenção do tecido ósseo, bem como pela manutenção da homeostase normal do cálcio e do fósforo, além do envolvimento em diversos processos celulares vitais, como: diferenciação e proliferação celular, secreção hormonal, sistema imunológico e em diversas doenças crônicas não transmissíveis. A obesidade pode levar à deficiência dessa vitamina, que pode ser tratada sob orientação do nutricionista e médico especialista.

Para saber se você apresenta esta deficiência, estamos realizando uma pesquisa denominada “Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica e sua relação com estado nutricional da vitamina D em indivíduos com obesidade classe III”, para a qual solicitamos o seu consentimento. Para a pesquisa você fará, além dos exames de rotina, um exame de sangue que avaliará os seus níveis de vitamina D e no momento da cirurgia será realizada biópsia hepática para classificar o estágio da doença hepática, caso exista. Qualquer dúvida poderá ser esclarecida pelo telefone da Clínica Cirúrgica Carlos Saboya: 2286-8382 ou 981294425 (Sílvia

Se você concorda em participar, por favor, assine o Termo de Consentimento abaixo:

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, abaixo assinado, dou meu consentimento livre e esclarecido para participar do Projeto de Pesquisa descrito acima, tendo recebido uma cópia deste termo de consentimento. Declaro, também, que tive oportunidade de questionar maiores detalhes sobre o estudo e que estou ciente de que meus dados permanecerão confidenciais e que não receberei nenhuma ajuda de custo pela minha participação. Assinando este termo, autorizo minha participação voluntária neste projeto, do qual eu posso me retirar a qualquer momento, sem penalidades, perda de benefícios ou tratamento que eu tenha direito.

NOME:.....

ASSINATURA:.....

PESQUISADOR:

Rio de Janeiro, _____ de _____ de 20____

ANEXO 3 – PROTOCOLO DE COLETA DE DADOS**Formulário de Coleta de Dados****I – IDENTIFICAÇÃO**

Nome: _____

-

Data: ____ / ____ / ____

Telefone: _____

Endereço: _____

-

Data de nascimento: ____ / ____ / ____ Idade: _____ Sexo () M () F

Profissão: _____

Entrevistador: _____

II - BÍOQUIMICA:

Albumina	
AST	
ALT	
Fosfatase Alcalina	
GGT	
Glicemia	
Insulina basal	
Colesterol	
HDL-c	
LDL-c	
Triglicerídios	
HOMA IR	

IV - ANTROPOMETRIA:

Medidas	
Peso	

Altura	
Índice de Massa Corporal (IMC)	
Circunferência do Abdômen	

ANEXO 4 – PROTOCOLO DE EXPOSIÇÃO SOLAR

Protocolo de avaliação de exposição solar

Nome:

Data:

	Tempo ao ar livre			Exposição ao sol				Total
	< 5 min	5-30 min	> 30 min	Mãos e rosto	Mãos, rosto e braços	Mãos, rosto e pernas	Banho de sol	
Segunda	0	1	2	1	2	3	4	
Terça	0	1	2	1	2	3	4	
Quarta	0	1	2	1	2	3	4	
Quinta	0	1	2	1	2	3	4	
Sexta	0	1	2	1	2	3	4	
Sábado	0	1	2	1	2	3	4	
Domingo	0	1	2	1	2	3	4	
Total Pré-op								
Total 30 dias								
Após								
Total 180 dias após								

Fonte: HANWELL et al., (2010).

ANEXO 5 – PROTOCOLO DE ATIVIDADE FÍSICA - THE INTERNATIONAL PHYSICAL ACTIVITY QUESTIONNAIRE (IPAQ)

INTERNATIONAL PHYSICAL ACTIVITY QUESTIONNAIRE

We are interested in finding out about the kinds of physical activities that people do as part of their everyday lives. The questions will ask you about the time you spent being physically active in the **last 7 days**. Please answer each question even if you do not consider yourself to be an active person. Please think about the activities you do at work, as part of your house and yard work, to get from place to place, and in your spare time for recreation, exercise or sport.

Think about all the **vigorous** activities that you did in the **last 7 days**. **Vigorous** physical activities refer to activities that take hard physical effort and make you breathe much harder than normal. Think **only** about those physical activities that you did for at least 10 minutes at a time.

1. During the **last 7 days**, on how many days did you do **vigorous** physical activities like heavy lifting, digging, aerobics, or fast bicycling?

_____ days per week

No vigorous physical activities → **Skip to question 3**

2. How much time did you usually spend doing **vigorous** physical activities on one of those days?

_____ hours per day

_____ minutes per day

Don't know/Not sure

Think about all the **moderate** activities that you did in the **last 7 days**. **Moderate** activities refer to activities that take moderate physical effort and make you breathe somewhat harder than normal. Think only about those physical activities that you did for at least 10 minutes at a time.

3. During the **last 7 days**, on how many days did you do **moderate** physical activities like carrying light loads, bicycling at a regular pace, or doubles tennis? Do not include walking.

_____ days per week

No moderate physical activities → **Skip to question 5**

4. How much time did you usually spend doing moderate physical activities on one of those days?

_____ hours per day

_____ minutes per day

Don't know/Not sure

Think about the time you spent **walking** in the **last 7 days**. This includes at work and at home, walking to travel from place to place, and any other walking that you have done solely for recreation, sport, exercise, or leisure.

5. During the **last 7 days**, on how many days did you walk for at least 10 minutes at a time?

_____ days per week

No walking → **Skip to question 7**

6. How much time did you usually spend **walking** on one of those days?

_____ hours per day

_____ minutes per day

Don't know/Not sure

The last question is about the time you spent **sitting** on weekdays during the **last 7 days**. Include time spent at work, at home, while doing course work and during leisure time. This may include time spent sitting at a desk, visiting friends, reading, or sitting or lying down to watch television.

7. During the **last 7 days**, how much time did you spend **sitting** on a **week day**?

_____ hours per day

_____ minutes per day

Don't know/Not sure

This is the end of the questionnaire, thank you for participating.

ANEXO 6: COMPROVANTE (ARTIGO 1) – Submetido em 30/03/2019

(Revista: *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*)

ORIGINAL RESEARCH

Loureiro, et al

Clinic, Anthropometric and Metabolic Changes in Adults With Class III Obesity Classified as Metabolically Healthy and Metabolically Unhealthy

Ligiane M Loureiro^{1,2,3} (ORCID: 0000-0002-3348-449X)

Adryana Cordeiro^{3,4} (ORCID: 0000-0002-5712-4907)

Rodrigo Mendes⁵ (ORCID: 0000-0002-3109-0630)

Mariana Luna³ (ORCID: 0000-0003-4540-9101)

Sílvia Pereira^{3,6} (ORCID: 0000-0001-7793-2461)

Carlos J Saboya^{3,6} (ORCID: 0000-0003-1853-5495)

Andrea Ramalho^{3,7} (ORCID: 0000-0001-9859-4545)

Manuscript:	Clinic, Anthropometric and Metabolic Changes in Adults With Class III Obesity Classified as Metabolically Healthy and Metabolically Unhealthy
Journal:	Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy
Sub ID:	210616
Submit Date:	30/Mar/2019
Status:	3B - REPORT: ACCEPT
THE EDITORIAL TEAM WILL BE IN TOUCH WITH YOU SHORTLY.	
Status Last Updated:	22/Jun/2019

ANEXO 7: COMPROVANTE (ARTIGO 2) – Submetido em 30/11/2018

(Revista *Nutrients*)

Article

Does the Metabolically Healthy Obese Phenotype protect adults with class III obesity from biochemical alterations related to bone metabolism?

Ligiane Marques Loureiro^{1,2}, Suzane Lessa², Rodrigo Mendes³, Sílvia Pereira^{2,4,5}, Carlos José Saboya^{2,4} and Andrea Ramalho^{2,5}

¹PostgraduateProgram, Doctorate in NutritionalSciences, Federal Universityof Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro 21.941-902, Brazil; liginutri@gmail.com (L.M.L)

²Center for ResearchonMicronutrients (NPqm), InstituteofNutritionJosué de Castro of UFRJ, Rio de Janeiro 21.941-902, Brazil; suzane.laura@gmail.com (S.L); se.pereira@gmail.com (S.P.); cjsaboya@carlossaboya.com.br (C.S.); aramalho.rj@gmail.com (A.R.)

³PostgraduateProgram, Master in AppliedMathematics, Pontifical CatholicUniversityof Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 22.451-900, Brazil; rcmends@gmail.com

⁴Multidisciplinary Center for BariatricandMetabolicSurgery, Rio de Janeiro 22.280-020, Brazil

⁵Department of Social and Applied Nutrition of the Institute of Nutrition, UFRJ, Rio de Janeiro 21.941-902, Brazil

* Correspondence: liginutri@gmail.com; Tel.: +55-091-98171-5886

[Nutrients] Manuscript ID: nutrients-409057 - Submission Received Caixa de entrada

Editorial Office <nutrients@mdpi.com>

para eu, Suzane, Rodrigo, Sílvia, Carlos, Andrea

sex, 30 de nov de 2018 22:27

Traduzir mensagem Desativar para: inglês

Dear Dr. Loureiro,

Thank you very much for uploading the following manuscript to the MDPI submission system. One of our editors will be in touch with you soon.

Journal name: Nutrients
 Manuscript ID: nutrients-409057
 Type of manuscript: Article
 Title: Does the Metabolically Healthy Obese Phenotype protect adults with class III obesity from biochemical alterations related to bone metabolism?
 Authors: Ligiane Marques Loureiro *, Suzane Lessa, Rodrigo Mendes, Sílvia Pereira, Carlos José Saboya, Andrea Ramalho
 Received: 1 December 2018

ANEXO 8: COMPROVANTE (ARTIGO 3) – Submetido em 17/06/2019(Revista: *Hepatic Medicine: Evidence e Research*)

ORIGINAL RESEARCH

Loureiro, et al

Relationship between the biomarkers of bone metabolism and hepatic enzymes according to the stage of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and the Metabolically Healthy Obesity Phenotype

Ligiane M Loureiro^{1,2,3} (ORCID: 0000-0002-3348-449X)Adryana Cordeiro^{3,4} (ORCID: 0000-0002-5712-4907)Letícia Barboza³ (ORCID: 0000-0003-4943-1816)Rodrigo Mendes⁵ (ORCID: 0000-0002-3109-0630)Sílvia Pereira^{3,6} (ORCID: 0000-0001-7793-2461)Carlos J Saboya^{3,6} (ORCID: 0000-0003-1853-5495)Andrea Ramalho^{3,7} (ORCID: 0000-0001-9859-4545)

Manuscript Status (2)	
Guide to submission status indicators	
Manuscript:	Relationship between the biomarkers of bone metabolism and hepatic enzymes according to the stage of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and the Metabolically Healthy Obesity Phenotype
Journal:	Hepatic Medicine: Evidence and Research
Sub ID:	219737
Submit Date:	17/Jun/2019
Status:	3B - REPORT: ACCEPT
Status Last Updated:	10/Jul/2019
THE EDITORIAL TEAM WILL BE IN TOUCH WITH YOU SHORTLY	