



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO**

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDOS GRAXOS N-3 EM miRNA
CIRCULANTE, BIOMARCADORES HEPÁTICOS E DESFECHOS CLÍNICOS EM
PACIENTES COM DOENÇA HEPÁTICA ESTEATÓTICA ASSOCIADA A
DISFUNÇÃO METABÓLICA: ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO**

LYGIA NESTAL BARROSO

Rio de Janeiro

2024



**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDOS GRAXOS N-3 EM miRNA
CIRCULANTE, BIOMARCADORES HEPÁTICOS E DESFECHOS CLÍNICOS EM
PACIENTES COM DOENÇA HEPÁTICA ESTEATÓTICA ASSOCIADA A
DISFUNÇÃO METABÓLICA: ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO**

LYGIA NESTAL BARROSO

Tese apresentada à Banca Examinadora para Defesa do Doutorado em Ciências Nutricionais do Programa de Pós-graduação em Nutrição (PPGN), do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Wilza Arantes Ferreira Peres

Coorientadora: Prof^ª Dr^ª Maria das Graças Tavares Carmo

Rio de Janeiro

Março/2024

CIP - Catalogação na Publicação

B277e Barroso, Lygia Nestal
Efeito da suplementação com ácidos graxos n3 em miRNA circulante, biomarcadores hepáticos e desfechos clínicos de pacientes com doença hepática esteatótica associada a disfunção metabólica: ensaio clínico randomizado / Lygia Nestal Barroso. -- Rio de Janeiro, 2024.
127 f.

Orientador: Wilza Arantes Ferreira Peres.
Coorientador: Maria das Graças Tavares do Carmo.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Programa de Pós-Graduação em Nutrição, 2024.

1. Doença hepática esteatótica associada a disfunção metabólica. 2. fibrose hepática. 3. força muscular. 4. ácidos graxos poliinsaturados n-3. 5. microRNA.
I. Peres, Wilza Arantes Ferreira, orient. II. Carmo, Maria das Graças Tavares do, coorient. III. Título.

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDOS GRAXOS N-3 EM miRNA
CIRCULANTE, BIOMARCADORES HEPÁTICOS E DESFECHOS CLÍNICOS EM
PACIENTES COM DOENÇA HEPÁTICA ESTEATÓTICA ASSOCIADA A
DISFUNÇÃO METABÓLICA: ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO**

Lygia Nestal Barroso

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de **Doutor em Ciências Nutricionais**.

Examinada por:

Profa. Dra. Wilza Arantes Ferreira Peres
Instituto de Nutrição Josué de Castro/Universidade Federal do Rio de Janeiro
Presidente da banca (Orientador)

Profa. Dra. Cláudia Saunders
Instituto de Nutrição Josué de Castro/Universidade Federal do Rio de Janeiro
Examinador (Titular/Revisor)

Prof. Dr. Hugo Perazzo Pedroso Barbosa
Fundação Oswaldo Cruz
Examinador (Titular)

Profa. Dra. Eliane Lopes Rosado
Instituto de Nutrição Josué de Castro/Universidade Federal do Rio de Janeiro
Examinador (Titular)

Profa. Dra. Renata de Mello Perez
Faculdade de Medicina/Universidade Federal do Rio de Janeiro
Examinador (Titular)

Profa. Dra. Marcia Soares da Mota e Silva Lopes
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Examinador (Titular)

RIO DE JANEIRO, RJ-BRASIL

MARÇO, 2024

AGRADECIMENTOS

A Deus por me manter forte e resiliente durante todo o processo.

Ao meu filho, Guilherme, maior razão da minha vida e da minha felicidade. Meu maior desafio e aprendizado diário. Principal motivo que me faz querer ser sempre um ser humano e profissional melhores.

A minha mãe, Martha, minha melhor amiga e principal rede de apoio, aquela que sempre me apoiou nos momentos mais difíceis e, que, com a sua ajuda, tornou o caminho mais leve e possível. Essa vitória é sua também.

Ao meu marido, Diego, obrigada pelo suporte e pelo apoio incondicional, pela paciência e pelo companheirismo de sempre.

A minha família, em especial minha prima-irmã, Gabriela Nestal, meu exemplo de dedicação e maior incentivadora da vida acadêmica.

A minha orientadora muito querida, Wilza, quem sempre admirei e hoje ainda mais. Obrigada pela oportunidade e confiança e, principalmente, pelo apoio, compreensão e empatia.

Ao Alberto Davalos, pesquisador do Laboratório de Epigenética e Metabolismo Lipídico do Instituto Madrileño de Estudios Avanzados Alimentación (IMDEA), por sua contribuição nesse trabalho.

Às minhas amigas e parceiras de sempre Tatiana de Paula e Elizabete Goes por me ajudarem em tantos momentos, ouvirem minhas lamentações e vibrarem comigo as vitórias. Obrigada também à minha chefe Márcia Maforte pelo apoio de sempre.

Obrigada aos meus alunos de iniciação científica, meus braços direito e esquerdo, que me auxiliaram tantas e tantas vezes, Emília, Mayara, Ju, Carol, Bia, Mari, Rebecca e Wladimir. Obrigada a minha parceira Jéssica que dividiu as alegrias e os perrengues da coleta comigo e tornou a jornada mais divertida e também a todos os parceiros do maravilhoso grupo de pesquisa NUTBIO liderado pela professora Wilza.

Obrigada às minhas amigas de plantões e toda equipe de nutrição clínica do HUCFF que tornam meu dia a dia mais leve e sempre se dispuseram a realizar trocas comigo para me ajudar a cumprir meu cronograma de análises, coleta e demais afazeres do doutorado.

A equipe do Ambulatório de Hepatologia do HUCFF, principalmente à Dra. Nathalie Carvalho Leite e à Dra. Cristiane Villela.

A Patrícia Novaes e Larissa Alves pela boa vontade, paciência, parceria e enorme contribuição no trabalho auxiliando nas análises de bancada e de cromatografia.

A técnica de laboratório Ísis pela contribuição nas análises de cromatografia.

A técnica em patologia clínica Regina, pela contribuição na coleta de sangue sempre com muito boa vontade.

A professora Marta Citelli, por sua colaboração nas análises de miRNAs.

Aos voluntários participantes do projeto que tornaram possível a realização da pesquisa.

*“Conheça todas as teorias,
domine todas as técnicas,
mas ao tocar uma alma humana
seja apenas outra alma humana”*

(Carl Jung)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Critérios diagnósticos para doença hepática esteatótica associada a disfunção metabólica	24
Figura 2. “ <i>Multiple parallel hits model</i> ” da patogênese da DHGNA.....	26
Figura 3. Fluxograma dos pacientes do estudo.....	49

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

Figura. 1 Fluxograma CONSORT de participantes.....	68
---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Pontos de corte para esteatose e rigidez hepática pelo Fibroscan®.....	31
Quadro 2.	Resumo dos principais estudos que avaliaram miR-122 em humanos.....	35
Quadro 3.	Resumo dos estudos de suplementação com AGPI n-3 em adultos com DHGNA/MASLD.....	38
Quadro 4.	Apresentação das fórmulas de biomarcadores utilizados para estimativa da esteatose e fibrose hepáticas.....	54

LISTA DE QUADROS DO ARTIGO

Quadro 1.	Apresentação de fórmulas de biomarcadores para estimar esteatose hepática.....	65
Quadro 2.	Apresentação de fórmulas de biomarcadores para estimar a fibrose hepática	65

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Tabela 1. Comparação entre variáveis demográficas, clínicas e bioquímicas dos grupos controle e AGPI n-3 de pacientes com MASLD incluídos no estudo.....	68
Tabela 2. Análises no enriquecimento de ácidos graxos em eritrócitos de pacientes com MASLD após 6 meses da ingestão de AGPI n-3 ou óleo de oliva	70
Tabela 3. Análises antropométricas, bioquímicas e clínicas de pacientes com MASLD após 6 meses da ingestão de AGPI n-3 ou óleo de olive.....	71
Tabela 4. Avaliação dos deltas absolutos do enriquecimento com ácidos graxos em eritrócitos, desfechos antropométricos, bioquímicos e clínicos de pacientes com MASLD de acordo com grupo controle e AGPI n-3.....	73

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1.	Ficha de Coleta de Dados.....	108
Anexo 2.	Recordatório de 24h.....	111
Anexo 3.	Avaliação do Nível de Atividade Física (IPAQ versão curta).....	112
Anexo 4.	Questionário AUDIT.....	113
Anexo 5.	Termo de consentimento livre e esclarecido.....	114
Anexo 6.	Artigo publicado com o protocolo do estudo.....	118

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- AASLD – *American Association for the Study Liver Disease*
- AL – ácido linoleico (18:2n-6)
- ALA - ácido α -linolênico
- ALEH – Associação Latinoamericana para Estudo do Fígado
- AGMI – ácidos graxos monoinsaturados
- AG – ácido graxo
- AGPI – ácidos graxos poli-insaturados
- AGPI n-3 – ácidos graxos poli-insaturados da série 3
- AGPI n-6 – ácidos graxos poli-insaturados da série 6
- AGS – ácidos graxos saturados
- ALT – alanina aminotransferase
- AMPK - proteína quinase ativada por AMP (*AMP-activated protein kinase*)
- AST – aspartate aminotransferase
- ATP – adenosina trifosfato
- AUDIT - *Alcohol Use Disorders Identification Test*
- CAP – parâmetro de atenuação controlada (*controlled attenuation parameter*)
- cDNA – ácido desoxirribonucleico complementar
- CG – cromatografia gasosa
- CHC – carcinoma hepatocelular
- DAMPS- padrões moleculares associados a danos
- dB/m - decibéis por metro
- DHA – ácido docosaheptaenoico (22:6n-3)
- DHE- doença hepática esteatótica
- DHEM- doença hepática esteatótica associada a disfunção metabólica
- DHGNA – doença hepática gordurosa não alcoólica
- dL- decilitro
- DM – diabetes *mellitus*
- EASL - Associação Europeia para Estudo do Fígado
- EDTA – ácido dietiltetraaminoacético
- EHNA – esteatohepatite não alcoólica
- EHT – elastografia hepática transitória

EPA - ácido eicosapentaenoico (20:5 n-3)

FA – fosfatase alcalina

FAST-score - Fibroscan-AST escore

FGF21 – fator de crescimento de fibroblastos 21 (*fibroblast growth factor 21*)

FIB-4 – índice de fibrose 4 (*fibrosis index-4*)

FLI - Índice de Esteatose Hepática (*Fatty Liver Index*)

FoxO1 - *Forkhead box protein O1*

G – grama

GGT – gama glutamil transferase

HDL – lipoproteína de alta densidade (*high density lipoprotein*)

HFB – Hospital Federal de Bonsucesso

HOMA-IR – Modelo de Avaliação da Homeostase de resistência à insulina (*homeostatic model assessment- insulin resistance*)

HUCFF – Hospital Universitário Clementino Fraga Filho

IAC – índice de adiposidade corporal

IL - interleucina

IMC – índice de massa corporal

IMG – índice de massa de gordura

IMM – índice de massa magra

INR – *international normalized ratio*

IPAQ – questionário internacional de atividade física

Kg – quilo

kPa - kilopascal

LDL – lipoproteína de baixa densidade

Log - logaritmo

LPS – lipopolissacarídeos

MASLD – Metabolic dysfunction associated steatic liver disease; Doença hepática esteatótica associada à disfunção metabólica

Mg - miligrama

miR – microRNA

miRNAs – microRNAs

mL – mililitro

mm - milímetro

NAFLD – *non-alcoholic fatty liver disease*

NAS – *NAFLD assessment score*

NFS - DHGNA Escore de Fibrose (*NAFLD Fibrosis Score*)

NF- κ B – fator nuclear kappa B

OMS – organização mundial da saúde

PAMPS - padrões moleculares associados à patógenos

PC – perímetro da cintura

PCR – proteína-C reativa

PNPLA3 – *patatin-like phospholipase domain-containing protein 3*

PP – perímetro do pescoço

PPAR – receptores ativados por proliferadores de peroxissomas (*peroxisome proliferator-activated receptor*)

PQ – perímetro do quadril

qRT-PCR – reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real

ReBEC – Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos

RI – resistência à insulina

RNAs – ácido ribonucleico

rpm – rotação por minuto

RT – transcrição reversa

SIRT 1– sirtuína 1

SREBP-1c – proteína de ligação ao elemento de resposta aos esteroides (*sterol regulatory element-binding protein*)

Steato-ELSA – Steato-Estudo Longitudinal da Saúde do Adulto

TBCA – tabela brasileira de composição dos alimentos

TCLE – termo de consentimento livre e esclarecido

TG – triglicerídeos

TLR - receptores *Toll Like*

TNF- α – fator de necrose tumoral- alfa (*tumor necrosis factor-alpha*)

USG – ultrassonografia

VLDL – lipoproteína de muito baixa densidade (*very low density lipoprotein*)

UI – unidades internacionais

LISTA DE SÍMBOLOS

α – alfa

β – beta

$^{\circ}\text{C}$ – graus Celsius

μL – microlitro

δ – delta

APRESENTAÇÃO

A presente tese faz parte de um estudo maior intitulado “Modulação epigenética por ácidos graxos n3 e compostos bioativos (*Silibum Marianum L*) na doença hepática gordurosa não alcoólica” financiado pela FAPERJ - Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro [E-26/010100978/2018;E-26203.250/2017] e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq [312399/2020-0].

Em 2016, fui aprovada no concurso público da UFRJ e, em 2018, iniciei minha trajetória como nutricionista clínica no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) atuando no acompanhamento nutricional de pacientes com doenças hepáticas e hematológicas. A partir da prática clínica em um hospital universitário, onde estamos envolvidos em assistência, ensino e pesquisa, e somado ao contato com a minha orientadora Professora Doutora Wilza Arantes Ferreira Peres surgiu o interesse de cursar o doutorado com projeto de tese na área da hepatologia.

O estudo contou com a parceria dos serviços de hepatologia do HUCFF, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), e do Hospital Federal de Bonsucesso, do Instituto de Nutrição da Universidade do Estado do Rio de Janeiro e do Instituto de Estudos Avançados de Madri. As farmácias Vital Atman® e Ultrafarma® facilitaram a aquisição dos suplementos de óleo de peixe e óleo de oliva, respectivamente, mas não têm qualquer associação com o desenho, coleta e interpretação de dados do presente estudo.

Este documento encontra-se estruturado da seguinte forma: resumo, *abstract*, introdução, referencial teórico, justificativa, hipótese, objetivos, métodos, resultados e discussão. O protocolo de pesquisa da presente tese foi publicado na revista *Clinical Nutrition ESPEN* sob o título “*Effect of fish oil supplementation on the concentration of miRNA-122, FGF-21 and liver fibrosis in patients with NAFLD: Study protocol for a randomized, double-blind and placebo-controlled clinical trial*”. A seção de resultados e discussão está apresentada na forma de artigo científico que consiste na análise dos dados de 52 pacientes com doença hepática esteatótica associada a disfunção metabólica que foram acompanhados no HUCFF. Na presente tese, foi avaliado o efeito da suplementação de óleo de peixe rico em ácido eicosapentaenóico (EPA) sob o perfil de ácidos graxos em eritrócitos, marcadores de fibrose e estatose hepáticas, expressão do microRNA 122, parâmetros bioquímicos, antropometria, composição corporal e força muscular após 6 meses de intervenção. Esta versão do artigo será traduzida e submetida para o periódico científico *Nutrition*.

RESUMO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), atualmente conhecida como Doença Hepática Esteatótica Associada a Disfunção Metabólica (MASLD), tem sua patogênese relacionada à interação de fatores ambientais, epigenéticos e metabolismos lipídico e glicídico anormais. Os ácidos graxos poliinsaturados n-3 (AGPI n-3) podem se associar a melhora de parâmetros relacionados a doença. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da suplementação de AGPI n-3 rico em ácido eicosapentaenoico (EPA) sobre a expressão relativa do miRNA-122, elastografia hepática transitória (EHT), biomarcadores de fibrose e esteatose hepática, lipemia, glicemia, composição corporal e força muscular de pacientes com MASLD. Tratou-se de um ensaio clínico, randomizado, duplo cego e controlado que incluiu indivíduos com diagnóstico de MASLD e idade igual ou superior a 20 anos. Foram avaliados os seguintes desfechos antes e após a suplementação com 4g por dia de AGPI n-3 rico em EPA ou óleo de oliva por 6 meses: expressão relativa do miRNA-122, os graus de fibrose e esteatose hepáticas pela EHT (Fibroscan®) e pelos NAFLD Fibrosis Score, Fibrosis-4 score, FibroScan-AST score, Steato-Brazilian Longitudinal Study of Adult Health e Fatty Liver Index, triglicerídeos, colesterol total, LDL-c e HDL-c, glicose sérica, HbA1c, HOMA-IR, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina, gama-glutamil transferase e PCR. Foi realizada avaliação da composição corporal por bioimpedância elétrica, antropometria e da força muscular pela força de preensão palmar. A análise estatística foi realizada no *software* SPSS versão 26.0, sendo considerados significativos os resultados com $p \leq 0,05$. O grupo AGPI n-3 apresentou aumento do percentual de enriquecimento de eritrócitos de ácido docosapentaenoico (DPA, $p=0,001$), aumento significativamente maior do índice ômega em comparação ao controle ($p = 0,012$), sugerindo adesão à suplementação, redução do percentual de ácido mirístico ($p=0,026$) e aumento significativamente maior da força muscular ($p=0,050$) quando comparada ao controle após intervenção. Não foram encontradas modificação da expressão relativa do miR-122, melhora nos graus de fibrose e esteatose hepáticas ou alteração das demais variáveis bioquímicas após 6 meses de tratamento ($p > 0,05$). Em pacientes com MASLD, a suplementação de AGPI n-3 rico em EPA aumenta o percentual de DPA e o índice ômega em eritrócitos e reduz o percentual de ácido mirístico. Além disso, pode promover aumento significativamente maior da força muscular, mas não tem efeito significativo sobre a expressão relativa do miR 122 e não afeta os graus de fibrose e esteatose hepáticos.

ABSTRACT

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), currently known as Steatotic Liver Disease Associated with Metabolic Dysfunction (MASLD), has its pathogenesis related to the interaction of environmental and epigenetic factors and abnormal lipid and glucose metabolisms, and n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA) may be associated with improvement of disease-related parameters. The aim of this study was to evaluate the effect of eicosapentaenoic acid (EPA)-rich n-3 PUFA supplementation on the relative expression of miRNA-122, transient hepatic elastography (EHT), biomarkers of fibrosis and hepatic steatosis, lipemia, blood glucose, body composition and muscle strength of patients with MASLD. This was a randomized, double-blind, controlled clinical trial that included individuals diagnosed with MASLD and aged 20 years or older. The following outcomes were evaluated before and after supplementation with 4g per day of EPA-rich n-3 PUFA or olive oil for 6 months: relative expression of miRNA-122, degrees of hepatic fibrosis and steatosis by EHT (Fibroscan®) and NAFLD Fibrosis Score, Fibrosis-4 score, FibroScan-AST score, Steato-Brazilian Longitudinal Study of Adult Health and Fatty Liver Index, triglycerides, total cholesterol, LDL-c and HDL-c, serum glucose, HbA1c, HOMA-IR, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, gamma-glutamyl transferase, and CRP. Body composition was assessed by bioelectrical impedance, anthropometry, and muscle strength by handgrip strength. Statistical analysis was performed using SPSS version 26.0, and results with $p \leq 0.05$ were considered significant. No change in the relative expression of miR-122, improvement in the degrees of hepatic fibrosis and steatosis, or alteration of the other biochemical variables were found after 6 months of treatment ($p > 0.05$). The n-3 PUFA group showed an increase in the percentage of docosapentaenoic acid erythrocyte enrichment (DPA, $p = 0.001$), a significantly higher increase in the omega index compared to control group ($p = 0.012$), suggesting adherence to supplementation, a reduction in the percentage of myristic acid ($p = 0.026$) and a significantly greater increase in muscle strength ($p = 0.050$) when compared to the control after intervention. No change in the relative expression of miR-122, improvement in the degrees of hepatic fibrosis and steatosis, or alteration of the other biochemical variables were found after 6 months of treatment ($p > 0.05$). In patients with MASLD, EPA-rich n-3 PUFA supplementation increases the percentage of DPA and the omega index in erythrocytes and reduces the percentage of myristic acid. In addition, it can promote a significantly greater increase in muscle strength, but has no significant effect on the relative expression of miR 122 and does not affect the degrees of hepatic fibrosis and steatosis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. REFERENCIAL TEÓRICO	23
2.1 Definição, aspectos epidemiológicos e fatores etiológicos	23
2.2 Fisiopatologia da DHGNA/MASLD.....	26
2.3 Diagnóstico e tratamento.....	32
2.4 MicroRNAs.....	32
2.5 Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e seus efeitos moduladores.....	36
2.6 Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e microRNAs.....	40
3. JUSTIFICATIVA	43
4. HIPÓTESE	44
5. OBJETIVOS	45
5.1 Objetivo geral.....	45
5.2 Objetivos específicos.....	45
6. MÉTODOS	46
6.1 Delineamento e local do estudo.....	46
6.2 População do estudo.....	46
6.2.1 Critérios de inclusão.....	46
6.2.2 Não elegíveis.....	46
6.3 Determinação da amostra.....	47
6.4 Desenho do estudo.....	47
6.5 Avaliação do consumo de bebida alcoólica pelo questionário AUDIT.....	49
6.6 Randomização.....	49
6.7 Características das cápsulas e adesão à suplementação.....	49
6.8 Viabilidade e segurança.....	50
6.9 Coleta de sangue.....	50
6.10 Quantificação da expressão da expressão relativa do miRNA-122.....	50
6.11 Determinação do perfil de ácidos graxos em eritrócitos.....	52
6.12 Avaliação de indicadores bioquímicos.....	52
6.13 Avaliação da esteatose e fibrose hepática pelo Fibroscan®.....	53
6.14 Avaliação da esteatose e fibrose hepática pelos biomarcadores Steato-ELSA, FLI, FIB-4, NFS e FAST <i>score</i>	53

6.15 Avaliação antropométrica.....	54
6.16 Composição corporal.....	54
6.17 Avaliação da força muscular.....	55
6.18 Nível de atividade física.....	55
6.19 Avaliação dietética.....	55
6.20 Análise estatística.....	56
6.21 Aspectos éticos.....	57
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	88
REFERÊNCIAS	89
ANEXOS.....	108

1.INTRODUÇÃO

Em 2023, a nomenclatura de doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) foi modificada para doença hepática esteatótica associada a disfunção metabólica (*metabolic dysfunction associated steatotic liver disease* - MASLD) e o critério diagnóstico foi definido pela presença de no mínimo um fator de risco cardiometabólico em conjunto com a esteatose hepática na ausência de outros fatores etiológicos para a esteatose (RINELLA et al., 2023a). A MASLD apresenta caráter evolutivo e prevalência de 32,5% em adultos (TILG; MOSCHEN, 2010; KALLIGEROS et al., 2023).

A patogênese da MASLD/DHGNA é multifatorial e envolve a resistência à insulina, desregulação do metabolismo lipídico e alteração da microbiota intestinal (THAN; NEWSOME, 2015). O acúmulo de lipídeos em excesso em hepatócitos leva a lipotoxicidade e disfunção celular. Neste sentido, a composição plasmática de ácidos graxos (AGs), que reflete o metabolismo endógeno e a ingestão dietética, pode também se associar a progressão da doença. Como exemplo, o maior percentual de AG saturados, como o ácido palmítico, foi relacionado a fibrose hepática, citotoxicidade e morte celular de hepatócitos (ALLARD et al., 2008; MARTÍNEZ et al., 2015; CANSANÇÃO et al., 2018).

Os AGs podem ser regulados por pequenos ácidos ribonucleicos (RNAs) não codificadores de proteínas conhecidos como microRNAs (miRNA) envolvidos no metabolismo lipídico e, dentro do contexto da MASLD/DHGNA, os miRNAs também podem desempenhar papel na progressão da doença (AFONSO et al., 2016; ARYAL et al., 2017). Dentre os miRNAs associados a doença hepática crônica, o mais expresso pelo fígado e que tem sido indicado como possível biomarcador não invasivo da MASLD/DHGNA, devido a sua relação com a patogênese e progressão da doença, é o miR-122 (BECKER et al., 2015). O miR-122 tem como principal função a regulação do metabolismo hepático de lipídeos, principalmente a biossíntese de colesterol e, em ratos, o silenciamento do miR-122 resultou em redução significativa da esteatose hepática a qual foi associada a redução da síntese de colesterol e estímulo da β -oxidação (ESAU et al., 2006; AFONSO et al., 2016). Também em ratos já foi demonstrado que o óleo de peixe pode reduzir a expressão do miR-122 (BASELGA-ESCUADERO et al., 2013).

Além dos fatores dietéticos, metabólicos e epigenéticos, mais recentemente a força muscular também tem emergido como fator associado ao prognóstico da MASLD/DHGNA (CHARATCHAROENWITTHAYA; KARAKETKLANG; AEKPLAKORN, 2022). A

redução da força muscular e a sarcopenia estão associadas a fibrose hepática significativa e aumento da mortalidade (ZHAO; YIN; DENG, 2023). Estratégias terapêuticas que contribuam para o aumento da força muscular de indivíduos com MASLD/DHGNA podem contribuir para modificar o desfecho. Nesse contexto, apesar das evidências de que os ácidos graxos poliinsaturados n-3 (AGPI n-3) possam melhorar força muscular de adultos e idosos, não há informações sobre os efeitos desses AGs em indivíduos com MASLD/DHGNA (SANTO ANDRÉ et al., 2023).

Os AGPI n-3, principalmente os ácidos eicosapentaenoico (EPA) e o docosahexaenoico (DHA) também parecem apresentar papel positivo sobre a melhora dos parâmetros associados a doença hepática com redução de marcadores de fibrose e esteatose, redução de enzimas hepáticas e melhora do perfil lipídico, no entanto, ainda sem consenso a respeito da dose e composição dos suplementos e duração do tratamento devido a variação entre os estudos (ZHANG et al., 2017).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Definição, Aspectos Epidemiológicos e Fatores Etiológicos

Em 1980, Jurgen Ludwig descreveu alterações hepáticas histológicas compatíveis com doença hepática gordurosa alcoólica em vinte pacientes que negavam consumo de álcool e, então, nomeou a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (LONARDO et al., 2020). A DHGNA é diagnosticada quando o indivíduo que não consome álcool excessivamente ($< 20\text{g}/\text{dia}$ para mulheres e $< 30\text{g}/\text{dia}$ para homens) apresenta acúmulo $\geq 5\%$ de esteatose macrovesicular em hepatócitos sem causa alternativa identificada como, por exemplo, uso medicamentos esteatogênicos e presença de distúrbios monogênicos (RINELLA et al., 2023b). Atualmente, tem se debatido acerca da nomenclatura DHGNA por considerar que o termo "não alcoólica" não captura com precisão a etiologia da doença e o termo "gordurosa" pode ser considerado estigmatizante. É ainda discutido a respeito da sobreposição de fatores etiológicos em pacientes, como a presença de diabetes mellitus (DM) tipo 2 e o consumo significativo de álcool, e a importância da utilização de uma nomenclatura adequada para o aumento da conscientização da doença, diagnóstico e acesso ao tratamento adequados (BIANCO et al., 2020; RINELLA et al., 2023a).

Desta forma, a Associação Americana para Estudos da Doença do Fígado (AASLD) e a Associação Europeia para Estudo do Fígado (EASL), em colaboração com a Associação Latinoamericana para Estudo do Fígado (ALEH), profissionais de saúde de diversas especialidades e organizações de defesa do paciente publicaram um consenso sobre a nova nomenclatura de DHGNA modificada para doença hepática esteatótica associada a disfunção metabólica (*metabolic dysfunction associated steatotic liver disease* - MASLD). O diagnóstico, conforme demonstrado na **Figura 1**, é definido pela presença de no mínimo um fator de risco cardiometabólico em conjunto com a esteatose hepática na ausência de outros fatores etiológicos para a esteatose. Caso sejam identificados outros fatores, como por exemplo consumo significativo de álcool, é considerada etiologia combinada. Na ausência de critérios cardiometabólicos, deve se investigar outras etiologias e, caso nenhuma seja identificada, é considerada doença hepática esteatótica criptogênica (RINELLA et al., 2023c).

Na presente tese, foram inicialmente adotados os critérios diagnósticos para DHGNA, no entanto, todos os pacientes apresentam os critérios estabelecidos para o diagnóstico de MASLD. Em linha, os estudos tem demonstrado que quase todos os pacientes previamente diagnosticados com DHGNA também preenchem os critérios para MASLD devido a alta

sensibilidade do novo critério diagnóstico por considerar a presença de pelo menos um fator de risco metabólico para o diagnóstico de MASLD (ARORA et al., 2023).

Segundo o consenso, é difícil estimar a contribuição relativa de cada fator etiológico em pacientes com etiologia combinada, como por exemplo, naqueles com disfunção metabólica e consumo significativo de álcool. Somado a isso, sabe-se que a ingestão autorreferida de álcool pode ser imprecisa (RINELLA et al., 2023a). Também é pontuado na literatura que os questionários para coleta das informações de ingestão de álcool podem apresentar falhas, pois dependem do relato e memória do paciente (FOUAD et al., 2020). Ainda assim, para estudos clínicos, recomenda-se o uso de questionários validados para quantificação e documentação do consumo de álcool dos participantes envolvidos (SANYAL et al., 2014).

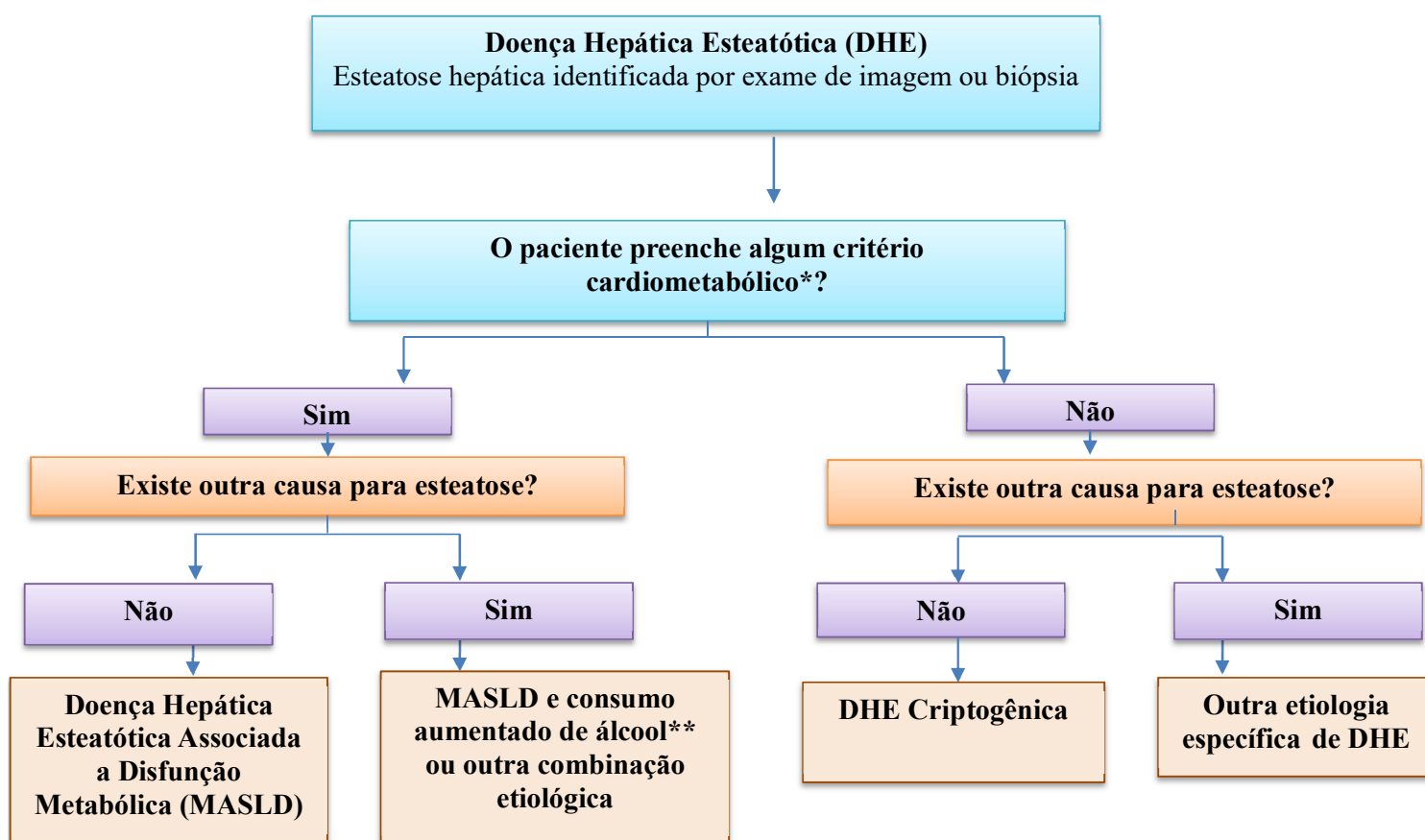


Figura 1. Critérios diagnósticos para doença hepática esteatótica associada a disfunção metabólica. Fonte: Adaptado de (RINELLA et al., 2023c). Abreviações: MASLD, *metabolic dysfunction associated steatotic liver disease*; DHE, doença hepática esteatótica.

Notas: *Critérios Cardiometabólicos - apresentar pelo menos 1 dos 5 critérios: 1)

Índice de massa corporal $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ (23 kg/m^2 – Asia) ou perímetro da cintura $> 94 \text{ cm}$ em homens e 80 cm em mulheres; **2)** Glicose sérica de jejum $\geq 100 \text{ mg/dL}$ ou Glicemia 2h pós sobrecarga de glicose $\geq 140 \text{ mg/dL}$ ou Hemoglobina glicada $\geq 5,7\%$ ou DM tipo 2 ou tratamento para DM tipo 2; **3)** Pressão arterial $\geq 130/85 \text{ mmHg}$ ou tratamento medicamentoso anti-hipertensivo; **4)** Triglicerídeos plasmáticos $\geq 150 \text{ mg/dL}$ ou tratamento com hipolipemiantes; **5)** HDL-colesterol $\leq 40 \text{ mg/dL}$ para homens e $\leq 50 \text{ mg/dL}$ para mulheres. ******Consumo aumentado de álcool considerado $140\text{-}350 \text{ g/semana}$ para mulheres e 210 a 420 g/semana para homens.

Quanto a epidemiologia, a DHGNA/MASLD é considerada a manifestação hepática da síndrome metabólica e, portanto, ambas apresentam fatores de risco comuns. Dessa forma, justifica-se que a prevalência de DHGNA tenha aumentado rapidamente em paralelo com a obesidade e outras doenças metabólicas sendo estimada em 25 a 30% no mundo podendo ser ainda maior devido à ausência de diagnóstico em muitos casos (BELLENTANI, 2017; RINELLA et al., 2023b). Um estudo de 2023 que avaliou a prevalência de MASLD no banco de dados NHANES 2017-2020 encontrou prevalência semelhante de 32,5% (KALLIGEROS et al., 2023).

O espectro da DHGNA/MASLD compreende a esteatose hepática não alcoólica, caracterizada pela esteatose hepática macrovesicular que pode ser acompanhada por inflamação leve, esteatohepatite não alcoólica (EHNA)/esteatohepatite associada à disfunção metabólica, estágio em que ocorre inflamação e lesão celular com ou sem fibrose e, ainda, cirrose, quando há presença de septos fibrosos que levam à formação de nódulos cirróticos (BEDOSSA, 2017; RINELLA et al., 2023b). Os principais fatores de risco para o desenvolvimento da doença são a obesidade, resistência à insulina (RI), DM tipo 2, síndrome metabólica, alterações da microbiota intestinal, alterações genéticas e epigenéticas, idade, sexo e a dieta ocidental (CONLON et al., 2013).

A progressão da fibrose hepática também pode ser influenciada por diversos motivos como a idade avançada, presença de DM, elevação das aminotransferases, índice de massa corporal (IMC) superior a 28 kg/m^2 e consumo significativo de álcool (BELLENTANI, 2017). Uma metanálise publicada em 2015 demonstrou que a taxa de progressão correspondente a um estágio da doença hepática é de 7 anos em pacientes com EHNA e de 14 em pacientes apenas com esteatose (SINGH et al., 2015). Cabe ressaltar ainda que a doença hepática crônica tem importante impacto econômico, reduzindo a produtividade do trabalhador e aumentando os

gastos em saúde (YOUNOSSI, 2019).

2.2 Fisiopatologia da DHGNA/MASLD

Em 1998, foi proposto que a fisiopatologia da doença hepática poderia ser dividida em duas etapas em uma teoria nomeada “*two-hit hypothesis*”. Inicialmente (*first hit*), a RI, presente na obesidade, especialmente intra-abdominal, favorece o acúmulo de triglicerídeos no hepatócito e leva ao desenvolvimento da esteatose hepática e, posteriormente (*second hit*), ocorre a continuidade do processo com peroxidação lipídica, aumento de citocinas pró-inflamatórias, estresse oxidativo e fatores pró-fibrogênicos (DAY; JAMES, 1998). Essa teoria, no entanto, não é considerada adequada para explicar a complexidade da patogênese da DHGNA/MASLD que envolve fatores ambientais e genéticos. Dessa forma, em 2010, foi proposto novo modelo sobre o desenvolvimento e progressão da doença denominado “*multiple parallel hits model*”. Nesse caso, fatores genéticos e ambientais associam-se ao desenvolvimento da obesidade, RI e alteração da microbiota intestinal. O acúmulo de triglicerídeos no fígado induz disfunção mitocondrial, estresse do retículo endoplasmático, estresse oxidativo e produção de espécies reativas de oxigênio culminando na inflamação e fibrose hepática (**Figura 2**) (TILG; MOSCHEN, 2010).

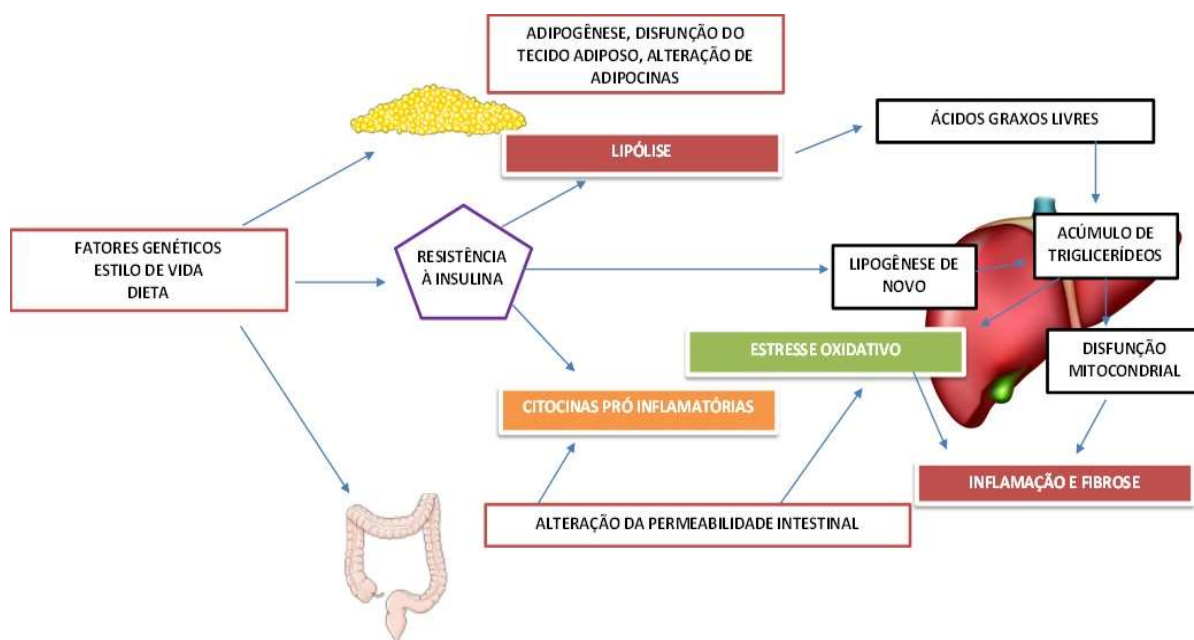


Figura 2. “*Multiple parallel hits model*” da patogênese da DHGNA/MASLD.

A resistência à ação do hormônio insulina associa-se à redução da inibição da enzima lipase hormônio sensível e consequente manutenção da lipólise do tecido adiposo e maior

fluxo de ácidos graxos que alcançam a circulação e o fígado. Estima-se que aproximadamente 60% dos triglicerídeos acumulados nos hepatócitos sejam provenientes da lipólise do tecido adiposo (GARIANI; JORNAYVAZ, 2021). Em situações normais, o fígado incorpora os triglicerídeos às lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), porém, pacientes com DHGNA/MASLD apresentam redução da capacidade de incorporação dos triglicerídeos à Apolipoproteína B, aumento da degradação intracelular da VLDL e, ainda, redução da beta-oxidação mitocondrial dos ácidos graxos. Essas alterações favorecem o acúmulo de triglicerídeos no tecido hepático (CORTEZ-PINTO; DE MOURA; DAY, 2006; TAKAMURA et al., 2012). Além da lipólise, os ácidos graxos podem acumular-se no fígado por meio da lipogênese de novo e a dieta rica em lipídeos. A lipogênese de novo representa um percentual de 26% enquanto a dieta rica em ácidos graxos saturados (AGS) contribui com uma parcela de 15% para o acúmulo de gordura nos hepatócitos. A lipogênese de novo consiste na via metabólica da conversão dos carboidratos simples em excesso na dieta em ácidos graxos e é estimulada pela hiperinsulinemia compensatória à RI (PARTHASARATHY; REVELO; MALHI, 2020; GARIANI; JORNAYVAZ, 2021).

A composição plasmática de AG reflete a ingestão dietética, mas também o metabolismo endógeno com importante relação com a patogênese e progressão da doença hepática. As concentrações de AGS e AG monoinsaturados (AGMI) na membrana de eritrócitos parece ter correlação fraca com a dieta (ALLARD et al., 2008). Nesse sentido, Cansanção et al (2018) encontraram associação entre a fibrose hepática significativa e maiores percentuais de ácido palmítico, esteárico e oleico. O aumento do percentual de AGS palmítico está associado ao aumento da lipogênese *de novo*, uma via importante de acúmulo de lipídeo em hepatócitos (CANSANÇÃO et al., 2018) enquanto o aumento do ácido oleico foi justificado por aumento da produção endógena por ser substrato para a síntese hepática de triglicerídeos (ALLARD et al., 2008). É bem estabelecido que a maior concentração de AGS na membrana de eritrócitos está associada a citotoxicidade e morte celular de hepatócitos (TOMITA et al., 2011; KAWANO; COHEN, 2013; MARTÍNEZ et al., 2015) enquanto AGPI n-3 são relacionados com melhor perfil metabólico, redução da inflamação e da lipogênese (DI MINNO et al., 2012; CALDER, 2021).

Em relação aos estudos que avaliaram a associação da dieta com a DHGNA/MASLD, maior consumo de AGS também foram relacionados ao aumento da esteatose hepática e podem prejudicar o metabolismo da glutathiona, levando ao aumento do estresse oxidativo e maior risco de progressão da doença (BERNÁ; ROMERO-GOMEZ, 2020). Por outro lado, o efeito isolado dos AGMI da dieta ainda não está totalmente esclarecido. Rezaei et al. (2019)

e Shidfar et al. (2018) demonstraram que o efeito positivo do óleo de oliva (dose de 20g/dia) sobre a esteatose hepática foi acompanhado de dieta hipocalórica (SHIDFAR et al., 2018; REZAEI et al., 2019), Bozzetto et al. (2012) identificou redução na esteatose hepática quando comparado dieta rica em AGMI (perfazendo 26g de AGMI) com dieta rica em carboidratos (BOZZETTO et al., 2012) e Sofi et al. (2010) relatou redução das enzimas hepáticas e dos triglicerídeos e aumento de adiponectina com a suplementação de óleo de oliva (na dose de 6,5 ml/dia) enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) n-3 (SOFI et al., 2010). Outros trabalhos também avaliaram o efeito do óleo de oliva dentro do contexto da dieta mediterrânea a qual compreende outras recomendações com potencial anti-inflamatório e antioxidante (RYAN et al., 2013; KONTOGIANNI et al., 2014). Um consenso de especialistas publicado em 2019 define que, embora estudos apontem benefícios do uso do óleo de oliva dentro do contexto da dieta mediterrânea, são necessários mais estudos clínicos com o objetivo de comprovar os efeitos diretos desse óleo em humanos com DHGNA/MASLD (ABENAVOLI et al., 2019). Por fim, sugere-se que maior ingestão de ácidos AGPI n-6 estejam associados à esteatohepatite não alcoólica enquanto a de AGPI n-3 parecem ter efeito positivo sobre a DHGNA/MASLD (JEYAPAL et al., 2018; YAN et al., 2018).

Ademais, dietas ricas em açúcar (sacarose ou xarope de milho rico em frutose) estão associadas à esteatose hepática e esteatohepatite. As vias possivelmente envolvem a lipogênese de novo e o bloqueio da β -oxidação de ácidos graxos. Além disso, o metabolismo da frutose leva a geração de ácidos úrico que está relacionado à efeitos pro-inflamatórios e pró-oxidativos com aumento do processo lipogênico hepático e da permeabilidade intestinal (JENSEN et al., 2018).

A disbiose intestinal se relaciona a maior produção de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPS) como lipopolissacarídeo (LPS) derivado da parede celular de bactérias gram-negativas que colonizam o intestino. A permeabilidade da mucosa intestinal e translocação bacteriana permite que esses produtos alcancem a circulação sanguínea sendo o fígado um dos órgãos mais expostos devido à veia porta. A endotoxina é hepatotóxica e estimula os receptores *Toll Like* (TLR) em células de *Kupffer* que podem reconhecer padrões moleculares associados a danos (DAMPs) liberados por células danificadas e levar a ativação do fator nuclear kappa β (NF- κ B) e liberação de citocinas como as interleucinas (IL) 1 e 6 e o fator de necrose tumoral (TNF)- α . Portanto, a translocação bacteriana promove o estabelecimento de um meio pró-inflamatório favorecendo a progressão da doença (MARCHISELLO et al., 2019; PARTHASARATHY; REVELO; MALHI, 2020).

Fatores de estilo de vida e dietéticos estão associados à adipogênese, disfunção de adipócitos, alteração na secreção de adipocinas, obesidade, acúmulo de gordura visceral, RI, alteração da microbiota intestinal e inflamação (BOUTARI; MANTZOROS, 2020; GARIANI; JORNAYVAZ, 2021). Alguns indivíduos, no entanto, podem desenvolver esteatose hepática mesmo na ausência de fatores etiológicos clássicos. A variante genética mais fortemente associada ao desenvolvimento e evolução da DHGNA/MASLD é o polimorfismo do gene *palatin-like phospholipase domain containing 3* (PNPLA3) que se encontra associado à hidrólise de triglicerídeos em hepatócitos, assim, alterações associadas ao PNPLA3 facilitam o acúmulo de triglicerídeos nas células do fígado. Além disso, pacientes que apresentam variantes desse gene têm um fenótipo mais pró-inflamatório e pró-fibrogênico (MARCHISELLO et al., 2019).

Enquanto a adiposidade tem papel bem estabelecido na patogênese e progressão da DHGNA/MASLD, a força muscular parece estar relacionada com o prognóstico da doença, independente do IMC (CHARATCHAROENWITTHAYA; KARAKETKLANG; AEKPLAKORN, 2022). Segundo Haring et al. (2023), pacientes com sarcopenia, caracterizada pela redução da massa e da força muscular, têm maior risco de apresentar fibrose significativa ou avançada (HARRING et al., 2023) e maior risco de mortalidade (KIM et al., 2021). Ainda não está claro, portanto, se a sarcopenia seria causa ou consequência da doença hepática. Enquanto a inflamação presente na doença bem como a RI tem efeito desfavorável na massa e na qualidade muscular, onde a RI aumenta o acúmulo de triglicerídeos no músculo, favorecendo a mioesteatose, e o estado inflamatório estimula o catabolismo proteico (BHANJI et al., 2017), a baixa massa muscular esquelética pode induzir dano hepático ao ativar o receptor de miostatina nas células estreladas hepáticas (ZHANG et al., 2022).

2.3 Diagnóstico e Tratamento

Na maior parte dos casos, o diagnóstico inicial é realizado por meio de exames de imagem por ultrassom, tomografia computadorizada ou ressonância magnética. Porém, ressalta-se que estes exames não refletem a histologia hepática como a biópsia (CHALASANI et al., 2018). Além disso, os pacientes devem preencher os critérios expostos no **Tópico 1.1** da presente tese para diagnóstico de DHGNA/MASLD (RINELLA et al., 2023b, 2023c). Um posicionamento publicado em 2023 pela Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabolismo, Sociedade de Hepatologia e Associação Brasileira de Estudos de Obesidade e Síndrome Metabólica recomenda o rastreamento para MASLD de todos os indivíduos com

IMC ≥ 25 kg/m² por meio da ultrassonografia (USG) de abdômen total (MOREIRA et al., 2023).

Dentre os exames de imagem disponíveis para o diagnóstico da esteatose hepática, USG de abdômen total é o mais comumente utilizado devido ao seu baixo custo quando comparado à ressonância magnética ou à tomografia, embora estes sejam mais sensíveis e específicos. A USG apresenta baixa sensibilidade para detectar esteatose leve ou quantificar a esteatose. A identificação do acúmulo de gordura pela USG é dada pelo aumento da ecogenicidade do fígado, atenuação do feixe sonoro e visibilidade limitada dos vasos intra-hepáticos e do diafragma (ZHANG et al., 2018; ZHOU et al., 2019).

A biópsia hepática é considerada padrão ouro para o diagnóstico, diferenciação da esteatohepatite de esteatose hepática e acessar o grau de fibrose. No entanto, devido à sua natureza invasiva, limitações relacionadas a riscos, custo e utilização de recursos, a realização de biópsias hepáticas para classificar e estadiar EHNA não ocorre de forma frequente na prática clínica e deve ser reservada para casos específicos. Nesse contexto, o uso de biomarcadores, principalmente o índice de fibrose (FIB) -4, são apontados como estratégia importante para rastrear pacientes que possam apresentar fibrose avançada e avaliar a resposta ao tratamento sem a necessidade de biópsia (VALLET-PICHARD et al., 2007; RINELLA et al., 2023b).

Outros índices preditivos com boa acurácia e baixo custo que se baseiam em dados antropométricos e bioquímicos também podem ser utilizados para o monitoramento não invasivo da fibrose e da esteatose hepática. Para esteatose, ressalta-se o Steato-ELSA e o Índice de Esteatose Hepática (*Fatty Liver Index* – FLI) (BEDOGNI et al., 2006b; PERAZZO et al., 2020). Para fibrose, o DHGNA Escore de Fibrose (*NAFLD Fibrosis Score* – NFS) e o FIB-4. (ANGULO et al., 2007; VALLET-PICHARD et al., 2007).

A elastografia hepática transitória (EHT) (Fibroscan[®]) também é indicada para avaliação não invasiva da fibrose e da esteatose hepática, com boa performance comparada ao padrão ouro (biópsia) (TOVO et al., 2019), e consiste em exame que utiliza uma sonda portátil tamanho “M”, quando a distância pele-cápsula do fígado é de até 25mm ou “XL”, quando essa distância é superior a 25mm ou IMC ≥ 32 kg/m², e se baseia no ultrassom para analisar a rigidez hepática, ou seja, a estimativa de deposição de colágeno associada à fibrose que transmite a característica de rigidez do parênquima hepático (YOUNOSSI et al., 2018; CARDOSO et al., 2021). A rigidez hepática é expressa em kilopascal (kPa) e a esteatose hepática por meio do parâmetro de atenuação controlada (*controlled attenuation parameter*-CAP), uma medida de quantificação da atenuação do ultrassom expressa em decibéis por

metro (dB/m) (EDDOWES et al., 2019). Os valores mais elevados de CAP e da medida de rigidez hepática indicam esteatose/fibrose mais pronunciada (MIKOLASEVIC et al., 2016).

Em 2010 e 2012 foram publicados estudos que propuseram pontos de corte para fibrose significativa (F2), avançada (F3) e cirrose (F4) utilizando as sondas M e XL (**Quadro 1**) (WONG et al., 2010, 2012). Em 2017, foi conduzida metanálise que se dispôs a reunir artigos que tivessem avaliado o CAP em comparação com biópsias hepáticas a fim de propor pontos de corte para os graus de esteatose (>S0 – leve, >S1 – moderada, >S2 - grave) (**Quadro 1**). Foi demonstrado no presente trabalho excelente correlação entre os valores de CAP e avaliação histológica, porém com limitação para avaliação de pacientes com obesidade grave que não foram incluídos no estudo (KARLAS et al., 2017). Neste estudo, os pontos de corte foram definidos utilizando a sonda M, mas a Sociedade Brasileira de Hepatologia recomenda que sejam utilizados os mesmos pontos de corte para ambas as sondas (CARDOSO et al., 2021). Outro trabalho, publicado em 2020, demonstrou que possivelmente pontos de corte de CAP mais altos podem ser necessários para diagnosticar esteatose moderada a severa em pacientes com obesidade mórbida (PARENTE et al., 2020).

Quadro 1. Pontos de corte para esteatose e rigidez hepática pelo Fibroscan®.

Estágios	Pontos de Corte	
Esteatose hepática^a		
>S0	248 dB/m	
>S1	268 dB/m	
>S2	280 dB/m	
Rigidez hepática^b		
	Sonda M	Sonda XL
F2	7,0 kPa	6,2 kPa
F3	8,7 kPa	7,2 kPa
F4	10,3 kPa	7,9 kPa
^a KARLAS et al. (2017). ^b WONG et al. (2010) e WONG et al. (2012). Legenda: >S0, esteatose leve; >S1 esteatose moderada; >S2, esteatose grave; F2, fibrose significativa; F3, fibrose avançada; F4, cirrose.		

Em 2020 foi publicado estudo de desenvolvimento e validação global da ferramenta Fibroscan-AST score (FAST *score*) com o objetivo de identificar pacientes com EHNA, escore de atividade da DHGNA elevado (*NAFLD Activity Score* - $NAS \geq 4$) e fibrose avançada elegíveis para ensaios clínicos e terapias emergentes sem necessidade de realização de biópsia hepática. O FAST score inclui em seu cálculo a enzima hepática aspartato aminotransferase (AST), além do CAP e da rigidez hepática que apresentam baixa taxa de falha em pacientes

com EHNA e bom desempenho ao determinar os graus de esteatose hepática e fibrose (NEWSOME et al., 2020). Em 2022, o FAST score foi validado para a população brasileira, como ferramenta de triagem, inclusive em pacientes com IMC mais elevado, quando a sonda XL é adotada (CARDOSO et al., 2022).

Embora o acompanhamento das enzimas hepáticas (AST; alanina aminotransferase – ALT, razão AST/ALT, fosfatase alcalina – FA e gama glutamil transpeptidase – GGT) seja realizado de forma rotineira, sabe-se que valores normais das enzimas hepáticas podem ser encontrados em pacientes com doença avançada e, portanto, não é recomendado para rastreamento ou acompanhamento (HARRISON; NEUSCHWANDER-TETRI, 2004; MOREIRA et al., 2023).

Quanto ao tratamento da DHGNA/MASLD, não foram encontrados até o presente momento medicamentos específicos, aprovados por agências reguladoras, recomendados para a DHGNA/MASLD. É importante que o paciente siga o tratamento clínico da comorbidade metabólica associada. Segundo a *American Association for the Study of Liver Disease* (AASLD), o padrão ouro é a mudança do estilo de vida, com intervenção dietética e prática de atividade física, objetivando a redução do peso corporal, melhora dos parâmetros histológicos e atraso na progressão da doença (CHALASANI et al., 2018). Modificações no padrão alimentar, com redução do consumo de AGS e alimentos ultraprocessados, redução do consumo de frutose adicionada a alimentos e incentivar a ingestão de 1 a 3 porções de café ao dia estão associados a redução do risco de progressão da doença hepática (MOREIRA et al., 2023). Ademais, terapias adicionais como AGPI n-3, silimarina e o ácido ursodesoxicólico têm sido objetos de pesquisa para o tratamento da doença (MARCHESINI et al., 2016; CHALASANI et al., 2018; BISCHOFF et al., 2020; KALOPITAS et al., 2021).

2.4 *MicroRNAs*

Os microRNAs (miRNAs) constituem o grupo de RNAs não codificantes de proteína, apresentam fita simples, 20 a 22 nucleotídeos de comprimento e se associam à regulação de processos biológicos por meio da modulação da expressão de genes alvo pós transcricionalmente (AMBROS, 2004; YANG et al., 2011). Os miRNAs, podem ser identificados no meio celular ou extracelular, como em fluidos biológicos (sangue, urina e saliva), onde apresentam boa estabilidade à temperatura ambiente, congelamento e descongelamento. Essa estabilidade se dá por serem secretados para a circulação na forma de exossomos e microvesículas que os protegem da degradação (CHEN et al., 2008; MITCHELL

et al., 2008; WEBER et al., 2010; GALLO et al., 2012). Alterações nos miRNAs circulantes demonstraram refletir alterações na expressão de miRNA nos tecidos (ATIC et al., 2023).

Os miRNAs são apontados como possíveis biomarcadores não invasivos do diagnóstico e prognóstico da DHGNA/MASLD uma vez que suas concentrações podem se alterar de acordo com o estágio da doença hepática e podem apresentar papel na sua patogênese (AFONSO et al., 2016; DISTEFANO; GERHARD, 2016). Em 2020 foi proposto pela primeira vez a utilização de miRNA como parte de teste diagnóstico não invasivo para identificar pacientes em alto risco de EHNA e fibrose hepática. Foi desenvolvido painel de biomarcadores baseados no sangue (NIS4) o qual considera o miR-34a-5p, dentre outros marcadores, e é produzido escore que identifica pacientes em alto risco de NAS ≥ 4 e estágio de fibrose ≥ 2 (HARRISON et al., 2020).

Embora outros miRNAs sejam relacionados ao fígado, o miRNA- (miR)122 é o mais abundante miRNA expresso por este órgão e tem como principal função a regulação do metabolismo hepático de lipídeos, principalmente a biossíntese de colesterol (AFONSO et al., 2016; ATIC et al., 2023). Neste sentido, Esau et al. (2006) observaram que o silenciamento do miR-122 em ratos alimentados com dieta hiperlipídica resultou em redução significativa da esteatose hepática a qual foi associada a redução da síntese de colesterol e estímulo da β -oxidação (ESAU et al., 2006). Long et al. (2019) demonstraram que o miR-122 reduziu a expressão de Sirtuína-1 (SIRT1), levando à regulação positiva de genes lipogênicos, aumento da produção de lipídeos e esteatose nos hepatócitos (LONG et al., 2019).

No estudo de Long et al. (2019), foi demonstrado que, em fígado de ratos com doença hepática, a expressão de SIRT1 está reduzida enquanto o miR-122 e outros genes lipogênicos, como a Proteína de ligação a elementos reguladores de esteróis 1 (*sterol regulatory element binding protein 1* – SREBP1), estão aumentados. Em cultura de hepatócitos foi identificada, neste mesmo trabalho, a regulação negativa do miR-122 sobre SIRT1, reprimindo a via de sinalização da Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK), que acaba por induzir a lipogênese. Desta forma, a inibição do miR-122 levou ao aumento da expressão de SIRT1 e reativação da via AMPK protegendo o fígado do depósito excessivo de lipídeos (LONG et al., 2019). Um estudo anterior também sugeriu que o aumento da expressão de SIRT1 pode ser investigada como uma estratégia terapêutica para pacientes com DHGNA/MASLD (COLAK et al., 2014). Além disso, a inibição de miR-122 também parece ter efeito inibidor na expressão de marcadores pró inflamatórios como interleucinas (IL) e fator de necrose tumoral (TNF) – α demonstrando papel regulador de miR-122 no estado inflamatório da doença (HU et al., 2021).

Em humanos com DHGNA/MASLD, foi identificada maior concentração sérica de miR-122 quando comparado a indivíduos saudáveis e, essa concentração também parece ser superior em pacientes com EHNA quando comparado a pacientes somente com esteatose hepática. Cermelli et al. (2011), Yamada et al. (2013), Becker et al. (2015) e Salvoza et al. (2016) avaliaram indivíduos saudáveis e com DHGNA/MASLD e identificaram maior concentração do miR-122 em indivíduos com DHGNA/MASLD quando comparado ao grupo controle e, também, concentrações mais elevadas em pacientes com esteatohepatite quando comparado à presença apenas da esteatose hepática. Akuta et al. (2016) e Liu et al. (2016) também verificaram associação positiva entre o miR-122 e as alterações histológicas caracterizadas por inflamação lobular, balonização de hepatócitos e fibrose hepática (**Quadro 2**). Neste contexto, em seu estudo, Pirola et al. (2015) identificaram uma concentração 7,2 vezes maior do miR-122 em pacientes com EHNA comparado ao grupo controle sem doença hepática e 3,1 vezes maior quando comparado ao grupo com apenas esteatose (PIROLA et al., 2015). Uma coorte de 871 adultos jovens identificou concentração do miR-122 aumentada em indivíduos com esteatose hepática (RAITOHARJU et al., 2016).

Foi encontrado por Akuta et al. (2016), em um estudo que comparou biópsias hepáticas seriadas de pacientes com DHGNA/MASLD, que os indivíduos que apresentaram melhora do escore histopatológico (esteatose, balonização e inflamação) na segunda biópsia também obtiveram níveis de miR-122 significativamente menores. Também houve associação entre o miR-122 e as enzimas hepáticas ALT e AST (AKUTA et al., 2016a). Esses dados corroboram com a forte associação entre a concentração sérica de miR-122 e os achados histopatológicos da DHGNA/MASLD.

No entanto, enquanto a concentração sérica do miR-122 parece estar aumentada em pacientes com DHGNA/MASLD e positivamente associada à progressão da doença, a expressão desse miRNA está reduzida no parênquima hepático desses pacientes em comparação a indivíduos saudáveis. Para justificar esse paradoxo uma das explicações propostas é que, enquanto em indivíduos saudáveis a produção é predominantemente hepática, em pacientes com doença hepática, o aumento da concentração sérica do miR-122 seria justificada por produção de tecidos extrahepáticos, como o tecido adiposo (BARANOVA; MALTSEVA; TONEVITSKY, 2019). Com a progressão da doença hepática e as alterações metabólicas, a capacidade do tecido adiposo em secretar miR-122 também tende a reduzir resultando em concentrações menores encontradas em pacientes com carcinoma hepatocelular (CHC) (AKUTA et al., 2016b). As modificações dinâmicas do miR-

122 também fortalecem seu uso como biomarcador de risco para doença hepática avançada (fibrose avançada, cirrose, CHC) (SUN et al., 2023).

Quadro 2. Resumo de estudos que avaliaram miR-122 em humanos.

Referência	País	População do estudo (N)	Método de diagnóstico	Principais resultados
(CERMELLI et al., 2011)	Estados Unidos	18 indivíduos saudáveis, 35 com diagnóstico de hepatite viral C e 34 com DHGNA/MASLD	Biópsia hepática	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Associação positiva de miR-122 com ALT e AST. ➤ Grupo com DHGNA/MASLD apresentou maior concentração do miR-122 quando comparado ao grupo de indivíduos saudáveis. A concentração dos miRNAs também foi maior em indivíduos com estatohepatite quando comparada à esteatose. ➤ Correlação positiva do miRNA com o grau de fibrose, atividade inflamatória e gravidade da doença.
(YAMADA et al., 2013)	Japão	311 indivíduos saudáveis e 92 com diagnóstico de DHGNA/MASLD	USG abdominal	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Concentração do miR-122 foi maior nos indivíduos com DHGNA/MASLD. ➤ miR-122 se correlacionou com a severidade da esteatose hepática (maior concentração na esteatose moderada comparada ao grupo controle e na esteatose grave comparada à moderada).
(BECKER et al., 2015)	Alemanha	61 indivíduos saudáveis e 137 com diagnóstico de DHGNA/MASLD	FibroScan® e biópsia hepática	<ul style="list-style-type: none"> ➤ A concentração do miR-122 foi significativamente maior no grupo com esteatose hepática comparado aos indivíduos saudáveis e, também,

				maior no grupo com esteatohepatite comparado à esteatose hepática.
(AKUTA et al., 2016a)	Japão	305 pacientes com DHGNA/MASLD	Biópsia hepática	<ul style="list-style-type: none"> ➤ A concentração do miR-122 aumenta de acordo com aumento da esteatose, inflamação lobular, balonização de hepatócitos e fibrose hepática. ➤ Correlação significativa entre miR-122 e AST, ALT e GGT.
(LIU; CAO; FAN, 2016)	China	37 indivíduos saudáveis, 26 indivíduos com hepatite viral B e 48 indivíduos com DHGNA/MASLD	Biópsia hepática	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Concentração de miR-122 foi associada à esteatose hepática e atividade inflamatória.
(SALVOZA et al., 2016)	Filipinas	36 indivíduos saudáveis e 28 com DHGNA/MASLD	Biópsia hepática	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Concentração de miR-122 foi significativamente maior em indivíduos com DHGNA/MASLD comparado aos saudáveis.
<p>Abreviações: DHGNA, doença hepática gordurosa não alcoólica; MASLD; metabolic dysfunction associated steatotic liver disease; ALT, alanina aminotransferase; AST, aspartato aminotransferase; miRNA, microRNA; USG, ultrassonografia; GGT, gama glutamiltransferase.</p>				

2.5 Ácidos Graxos Poli-insaturados n-3 e seus Efeitos Moduladores

Os AGPI n-3 apresentam uma dupla ligação entre os carbonos 3 e 4 da cadeia de hidrocarbonetos contando a partir da extremidade metílica. Podem haver variações quanto ao comprimento da cadeia de carbonos e a quantidade de duplas ligações (CALDER, 2014). Por definição, AGPI n-3 são denominados ácidos graxos essenciais, pois não são sintetizados endogenamente, sendo necessário consumo de alimentos fonte. Essa família de ácidos graxos inclui principalmente os ácidos α -linolênico (C18:3n-3 - ALA), docosaexaenoico (C22:6n-3 - DHA) e eicosapentaenoico (C20:5n-3 - EPA). O ALA é encontrado principalmente a partir dos óleos de linhaça, canola, soja e perila e pode sofrer ação de enzimas dessaturases e alongases gerando EPA e DHA. No entanto, a eficiência dessa conversão parece ser limitada, principalmente quando há consumo de dieta rica em ácido linoleico (C18:2n-6 - AL),

pertencente à família dos AGPI n-6, pois há competição pelas mesmas enzimas. O EPA e o DHA também podem ter origem marinha, sendo obtidos diretamente de determinados peixes como atum, arenque, cavala e sardinha (BARCELÓ-COBLIJN; MURPHY, 2009; CALDER, 2015; BRENNAN, 2002).

AGPI n-3 são precursores de moléculas bioativas denominadas eicosanoides que participam como mediadores do processo inflamatório. EPA e DHA são metabolizados pelas enzimas lipooxigenase e ciclooxigenase gerando prostaglandinas, leucotrienos e resolvinas com potencial predominantemente anti-inflamatório e, por isso, são compostos bastante estudados na DHGNA/MASLD (DE ROOS; MAVROMMATIS; BROUWER, 2009; CALDER, 2011). Estudos que se propuseram a avaliar o efeito dos AGPI n-3 em humanos com DHGNA/MASLD encontraram associação entre a suplementação de EPA e DHA e a melhora das enzimas hepáticas, perfil lipídico, RI, esteatose e fibrose hepática (CAPANNI et al., 2006; SPADARO et al., 2008; TANAKA et al., 2008; ARGO et al., 2015; NOGUEIRA et al., 2016). Revisões sistemáticas e metanálises também concluíram que a suplementação de AGPI n-3 pode melhorar a esteatose hepática, IMC e perfil lipídico (**Quadro 3**) (PARKER et al., 2012; LEE et al., 2020).

Em 2010, um importante estudo denominado WELCOME (Avaliação de wessex de fígado gorduroso e marcadores cardiovasculares em DHGNA com ômega-3 Omacor) foi delineado para testar a hipótese dos benefícios do tratamento com a suplementação de ômega 3 e identificou que o enriquecimento da membrana de eritrócitos com EPA e DHA foi linearmente associado à redução do percentual de gordura no fígado (**Quadro 3**) (SCORLETTI et al., 2014b). Cabe ressaltar que no estudo de Scorletti et al. (2014) foi utilizado suplemento de EPA e DHA purificados, bem como Tanaka et al (2008) que trabalhou com suplemento de EPA purificado. A purificação auxilia a evitar contaminação com partículas poluentes e reduz a toxicidade devido a outros compostos que podem estar presente na preparação de óleo de peixe (TANAKA et al., 2008; SCORLETTI et al., 2014a).

Alguns mecanismos vêm sendo descritos a fim de elucidar as vias de ação para os efeitos dos AGPI n-3 na DHGNA/MASLD. Um dos mecanismos seria a capacidade dos AGPI n-3 em ativar receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR)- α , o qual está envolvido na β -oxidação, aumentando, portanto, a oxidação hepática de lipídeos. Além disso, os AGPI n-3 também podem suprimir a expressão do gene SREBP-1c reduzindo a lipogênese. Adicionalmente, os AGPI n-3 aumentam a expressão de genes associados a sensibilidade à insulina, melhoram a fluidez da membrana celular com efeito positivo no transporte de glicose para o citoplasma e sinalização da insulina e regulam negativamente

citocinas pró inflamatórias como TNF- α e IL-6 (SALEM et al., 2001; BUGIANESI; MCCULLOUGH; MARCHESINI, 2005; TAKEUCHI et al., 2010; DI MINNO et al., 2012; SCORLETTI; BYRNE, 2013; DENG et al., 2015; DU PLESSIS et al., 2015; CHEN et al., 2020).

Outra possível via de ação dos AGPI n-3 é a melhora da sensibilidade ao fator de crescimento de fibroblastos 21 (FGF 21). O FGF 21 é predominantemente expresso e secretado pelo fígado e associa-se à sensibilidade à insulina e ao metabolismo lipídico. Estudos demonstraram associação positiva entre esse marcador e a progressão da DHGNA/MASLD e, ainda, que pacientes com DHGNA/MASLD possivelmente apresentam resistência à ação de FGF 21 (TUCKER et al., 2019). Um estudo de intervenção publicado anteriormente demonstrou que a suplementação com AGPI n-3 (dose: 4g) reduziu a concentração de FGF 21 e aumentou a concentração de adiponectina sendo essas alterações relacionadas com a melhora do perfil lipídico, glicemia e enzimas hepáticas (QIN et al., 2015). Em animais, a melhora da sensibilidade ao FGF 21 promovida pela suplementação de óleo de peixe se associou a maior expressão de adiponectina e melhora da esteatose hepática (GUO et al., 2022).

Algumas diferenças encontradas entre os trabalhos de intervenção dificultam a definição de dose e tempo de tratamento específicos. Os estudos revisados apresentaram diferentes tempos de tratamento (como 4, 6, 12 e 18 meses). Uma revisão sistemática publicada em 2020 (**Quadro 3**) encontrou 6 meses como a duração mediana da suplementação de AGPI n-3 em pacientes com DHGNA/MASLD. Aos 6 meses, houve melhora na esteatose hepática, enzimas hepáticas, perfil lipídico e IMC (LEE et al., 2020). Além disso, há bastante variação quanto à dosagem utilizada nos suplementos de AGPI dificultando a definição de uma dose ótima. Neste sentido, a dose de 4g/dia foi eleita por estudos anteriores que comprovaram a eficácia da dose em pacientes com hipertrigliceridemia e promoção do enriquecimento de eritrócitos (SCORLETTI et al., 2014b; BISCHOFF et al., 2020).

Ademais, é possível que a composição do suplemento, ou seja, a proporção de EPA e DHA influencie a resposta ao tratamento (CALDER, 2006). A heterogeneidade de métodos utilizados para avaliar a doença hepática, os diferentes placebos (óleo de soja, óleo mineral, azeite, óleo de milho dentre outros) utilizados e a associação com outras estratégias terapêuticas também podem afetar os resultados encontrados dificultando determinar diretrizes acerca da suplementação isolada de AGPI n-3 na DHGNA/MASLD.

Quadro 3. Resumo dos estudos de suplementação com AGPI n-3 em adultos com DHGNA/MASLD.

Autor, ano	Amostra	Desenho do estudo	Intervenção (dose n-3 e placebo)	Duração	Principais resultados
Parker et al., 2012 ⁹	355 pacientes com DHGNA/MASLD	Revisão sistemática e metanálise	Tratamento: diferentes doses variando de 830mg a 9g/dia Placebo: não notificado	2 meses a 1 ano	Redução da esteatose hepática.
Li et al., 2015 ¹⁰	78 pacientes com EHNA	Ensaio clínico randomizado	Tratamento: 50 mL/dia Placebo: Salina	6 meses	Redução de ALT, AST, PCR. Melhora do grau de esteatose, fibrose e balonização.
Nogueira et al., 2016 ¹¹	50 pacientes com EHNA confirmada por biópsia	Estudo duplo-cego, randomizado, placebo-controlado	Tratamento: 0,945g/ dia Placebo: óleo mineral	6 meses	Melhora histológica. Redução de triglicerídeos.
Lee et al., 2020 ¹²	1366 pacientes com DHGNA/MASLD	Revisão sistemática e metanálise	Tratamentos: diferentes doses variando de 250mg a 5g/dia Placebo: azeite ou óleo de milho ou óleo mineral ou salina ou óleo de girassol ou óleo de soja	6 meses (3 a 18 meses)	Redução da esteatose hepática. Melhora do IMC e das concentrações de TG, HDL, COL
Capanni et al., 2006 ¹³	56 pacientes com DHGNA/MASLD confirmada por US	Estudo piloto	Tratamento: 1g/dia	1 ano	Redução de AST, ALT, GGT; TG e glicemia de jejum. Melhora da ecogenicidade e do índice de perfusão Doppler pela US.
Spadaro et al., 2008 ¹⁴	40 pacientes com DHGNA/MASLD confirmada por US	Estudo randomizado aberto	Tratamento: Plano alimentar + 3g/dia Placebo: Plano alimentar	6 meses	Redução de ALT, TG, TNF α , HOMA-IR. Aumento do colesterol HDL. Regressão completa da esteatose hepática em 33,4% dos pacientes e redução global de 50% no grau de esteatose hepática. No grupo

					controle, não houve regressão completa e apenas 27,7% apresentaram alguma redução da esteatose.
Tanaka et al., 2008 ¹⁵	23 pacientes com EHNA confirmada por biópsia	Estudo piloto	Tratamento: 2.7g/dia	12 meses	Melhora da esteatose, fibrose, balonização de hepatócitos e inflamação lobular em 6 dos 7 pacientes biopsiados ao final do estudo.
Argo et al., 2015 ¹⁶	51 pacientes com EHNA confirmada por biópsia	Duplo-cego, randomizado, placebo-controlado	Tratamento: 3g/dia Placebo: Óleo de soja Todos receberam orientação nutricional e para atividade física	1 ano	Redução da esteatose hepática avaliada por ressonância magnética, independente da perda de peso. Não houve diferença significativa entre os grupos quanto às alterações histológicas.
Scorletti et al., 2014 ¹⁷	103 pacientes com DHGNA/MASLD confirmada histologicamente	Estudo duplo-cego, randomizado, placebo-controlado	Tratamento: 4g/dia Placebo: 4g/dia de azeite	15 a 18 meses	Tendência para melhorar a porcentagem de gordura nos hepatócitos. Não houve melhora no grau de fibrose hepática.

Abreviações: EHNA, esteatohepatite não alcoólica; DHGNA, Doença hepática gordurosa não alcoólica; MASLD, metabolic dysfunction associated steatotic liver disease; AST, Aspartato aminotransferase; ALT, Alanina aminotransferase; GGT, Gama-glutamilttransferase; TG, Triglicerídeos; HDL, lipoproteína de alta densidade; IMC, Índice de massa corporal; PCR, proteína C reativa; COL, Colesterol; US; Ultrassom; TNF α , fator de necrose tumoral- α ; HOMA-IR, HOMA- Resistência à insulina.

Fonte: Traduzido de figura suplementar do artigo de protocolo da metodologia do estudo publicado pelo nosso grupo. (BARROSO et al., 2023)

2.6 Ácidos Graxos Poli-insaturados N-3 e MicroRNAs

A modulação dietética de miRNAs como potencial alvo terapêutico tem sido objetivo de pesquisas envolvendo curcumina, resveratrol, AGPI n-3 e silimarina (BASELGA-ESCUADERO et al., 2013; FIORINO et al., 2014; CIONE et al., 2019; YANG et al., 2021). Baselga-Escudero et al. (2013) avaliaram os efeitos do DHA na expressão do miR-33a e do

miR-122 em animais com dislipidemia. Nesse estudo, os ratos foram acompanhados por três semanas após serem separados em grupo controle (dieta de cafeteria) e grupo intervenção (dieta de cafeteria + DHA). Apenas no grupo controle foi verificado aumento dos miRNAs 33a e 122 e do gene SREBP2, relacionado à síntese de colesterol, demonstrando efeito protetor do DHA (BASELGA-ESCUADERO et al., 2013). Wang et al. (2017) trabalharam com animais com DHGNA/MASLD induzida pela dieta ocidental e determinaram três grupos que foram acompanhados por 16 semanas: grupo controle (10% de gordura), dieta ocidental (45% de gordura e 2% de colesterol) e dieta ocidental com óleo de peixe (45% de gordura, 2% de colesterol e 10% de óleo de peixe). Foi identificado que o óleo de peixe reduziu a expressão dos miR -33-5p e miR-34a-5p, envolvidos no metabolismo do colesterol e triglicérideo hepáticos, e contribuiu para a melhora da DHGNA/MASLD em ratos (WANG et al., 2017). Corroborando com os estudos anteriores, Albracht-Schulte, et al. (2019), verificaram regulação negativa dos miR-19b-3p, miR-21a-5p em tecido hepático, melhora do metabolismo lipídico hepático e atenuação de vias inflamatórias de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (45% de gordura) suplementada com EPA comparados aos animais que receberam apenas dieta hiperlipídica reforçando assim os benefícios do EPA na DHGNA/MASLD (ALBRACHT-SCHULTE et al., 2019).

Apenas um estudo foi conduzido em humanos com objetivo de avaliar o efeito modulador da suplementação de AGPI n-3 sobre a expressão de miRNA em pacientes com DHGNA/MASLD. Cansanção et al. (2020) publicaram estudo piloto em que avaliaram pacientes com DHGNA/MASLD randomizados em grupo intervenção (3 cápsulas ao dia de óleo de peixe perfazendo 1.509 mg de DHA e 306 mg de EPA) e controle (3 cápsulas ao dia de óleo de oliva perfazendo 2.250 mg de ácido oleico) durante 6 meses. Foi verificado o enriquecimento da membrana dos eritrócitos com DHA no grupo intervenção, com redução significativa da fibrose hepática avaliada pela elastografia hepática transitória, sem alteração do miR-122 em ambos os grupos. Um dos motivos propostos pelos autores para não ter sido encontrada modulação do miRNA é a alta variação desse biomarcador de acordo com a etnia e o fato do Brasil ser um país de grande miscigenação racial (CANSANÇÃO et al., 2020). Ressalta-se que esse estudo utilizou suplementos com maior proporção de DHA. Hong et al. (2019) ressaltam que DHA parece mais efetivo em reduzir os níveis de ácidos graxos no fígado, embora ambos (EPA e DHA) possam regular a síntese hepática de lipídeos e, portanto, evitar seu acúmulo em hepatócitos. Além disso, pontua que o EPA, mas não outros AGPI n-3, está associado à redução da expressão de FoxO1 (*Forkhead box protein O1* – FoxO1)

hepático afetando a gliconeogênese (HONG et al., 2019). Dessa forma, diferentes composições dos suplementos de AGPI n-3 podem também possivelmente justificar resultados variados.

3 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a crescente prevalência da DHGNA/MASLD, bem como seu potencial evolutivo para cirrose, principal causa de transplante hepático, e, ainda, sabendo a respeito da ausência de terapêuticas específicas voltadas para o seu tratamento, o qual baseia-se na modificação de estilo de vida que apresenta baixa adesão no longo prazo, são importantes estudos que avaliem o efeito de terapias que potencialmente contribuam para a melhora dos parâmetros da doença. Neste sentido, a suplementação de AGPI n-3 tem sido estudada e tem sido mostrado efeito sob parâmetros clínicos e bioquímicos, porém sem diretrizes claras devido a variabilidade de dados a cerca da dose, composição de suplementos e tempo de tratamento. A literatura é escassa a respeito do efeito modulador dos AGPI n-3 sobre miRNAs envolvidos na progressão da doença hepática crônica e outros marcadores relacionados ao prognóstico de pacientes com MASLD, como a força muscular. Portanto, o presente estudo pretende gerar resultados inéditos acerca do efeito da suplementação de AGPI n-3 rico em EPA sobre a modulação do miRNA-122, parâmetros clínicos, bioquímicos, composição corporal, força muscular e composição de ácidos graxos em eritrócitos em pacientes com MASLD, brasileiros, acompanhados em um hospital universitário no Rio de Janeiro.

4 HIPÓTESE

O presente estudo trabalha com a hipótese que a suplementação com AGPI n-3 rico em EPA pode modificar favoravelmente a composição de ácidos graxos em eritrócitos, melhorar os desfechos clínicos, bioquímicos e nutricionais e modular a expressão relativa do miR-122 de pacientes com MASLD.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da suplementação de ácidos graxos poli-insaturados n-3 (AGPI n-3) rico em ácido eicosapentaenoico (EPA) sobre a composição de ácidos graxos em eritrócitos, expressão relativa do miR-122, biomarcadores de lipemia e glicemia, graus de fibrose e esteatose hepáticas e sobre a composição corporal e força muscular em pacientes com doença hepática esteatótica associada a disfunção metabólica.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar, entre os grupos controle e intervenção, após 6 meses de tratamento com AGPI n-e rico em EPA, em pacientes com MASLD:

- A expressão relativa do miR-122;
- A concentração dos ácidos graxos em eritrócitos;
- Os marcadores de metabolismo lipídico (colesterol total, HDL, LDL e TG), glicídico (glicemia e insulina de jejum, hemoglobina glicada e HOMA-IR) e a concentração das enzimas hepáticas (AST, ALT, GGT e FA);
- O grau de acúmulo de gordura e fibrose no fígado, pela elastografia hepática transitória (Fibroscan®) e pelos índices Steato-ELSA, FLI, NFS, FIB-4 e FAST *score*;
- A composição corporal pela antropometria e bioimpedância;
- A força muscular pela força de preensão palmar;

6 MÉTODOS

A publicação do protocolo de metodologia do presente estudo (BARROSO et al., 2023) encontra-se no ANEXO 6.

6.1 Delineamento e local de estudo

O presente estudo trata-se de um ensaio clínico randomizado duplo cego e controlado incluindo pacientes adultos de ambos os sexos, com diagnóstico de MASLD acompanhados nos ambulatórios de hepatologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) e do Hospital Federal de Bonsucesso (HFB). O estudo encontra-se registrado na plataforma ReBEC sob o número RBR-8dp876.

6.2 População do estudo

A amostra foi composta por 52 indivíduos, de ambos os sexos, selecionados por meio de consulta ao prontuário clínico, atendendo aos critérios de inclusão e exclusão, e que aceitaram participar da pesquisa.

6.2.1 Critérios de inclusão

- Ter 20 anos de idade ou mais;
- Diagnóstico de MASLD: presença de esteatose hepática, identificada por ultrassonografia (US) abdominal ou biópsia hepática, mais pelo menos 1 critério cardiometabólico dentre os 5: **(1)** Índice de massa corporal $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ ou perímetro da cintura $> 94 \text{ cm}$ em homens e 80 cm em mulheres; **(2)** Glicose sérica de jejum $\geq 100 \text{ mg/dL}$ ou Glicemia 2h pós sobrecarga de glicose $\geq 140 \text{ mg/dL}$ ou Hemoglobina glicada $\geq 5,7\%$ ou DM tipo 2 ou tratamento para DM tipo 2; **(3)** Pressão arterial $\geq 130/85 \text{ mmHg}$ ou tratamento medicamentoso anti-hipertensivo; **(4)** Triglicerídeos plasmáticos $\geq 150 \text{ mg/dL}$ ou tratamento com hipolipemiantes; **(5)** HDL-colesterol $\leq 40 \text{ mg/dL}$ para homens e $\leq 50 \text{ mg/dL}$ para mulheres.

6.2.2 Não elegíveis

- Cirrose hepática classificada como grau de rigidez hepática F4 pela sonda M ou XL;
- Hepatites virais;
- Febre ou focos infecciosos;
- Câncer com ou sem quimioterapia e radioterapia;

- Doenças autoimunes e/ou que apresentem maior potencial inflamatório como doenças inflamatórias intestinais, doença renal crônica nos estágios IV e V, lúpus eritematoso sistêmico, dentre outras;
- Transplante, trauma, cirurgia ou internação hospitalar nos últimos 30 dias;
- Uso de esteroides ou anti-inflamatórios não esteroides ou agentes imunomoduladores;
- Uso de suplemento de AGPI n-3 ou outro que influencie os resultados, como a silimarina, nos últimos 3 meses anteriores ao estudo;
- Gravidez e lactação;
- Teste de identificação de distúrbio de uso de álcool (*Alcohol Use Disorders Identification Test – AUDIT*) com pontuação maior ou igual a 8 pontos.

6.3 Determinação da amostra

O tamanho da amostra foi calculado com base no estudo conduzido por Capanni et al. (2006) que avaliou o efeito dos AGPI n-3 em pacientes com DHGNA/MASLD (CAPANNI et al., 2006). O cálculo do tamanho amostral foi realizado no software GPower 3.1.9.2 e os seguintes parâmetros foram considerados: nível de significância de 5% (bilateral), poder do teste $1-\beta = 80\%$ e diferença esperada no delta absoluto dos parâmetros bioquímicos entre os grupos relativamente "grande" (tamanho do efeito $> 1,0$). Para opção teste Wilcoxon-Mann-Whitney dois grupos independentes, o número mínimo foi de 18 casos por grupo. Assumindo um percentual de perda (drop out) de até 25%, chegou-se a 52 pacientes para o estudo.

6.4 Desenho do estudo

A captação dos pacientes foi realizada por meio da análise de prontuários selecionados para acompanhamento pelo ambulatório do fígado do HUCFF e do HFB. Os pacientes identificados como elegíveis foram abordados na sala de espera para consulta médica, informados a respeito da pesquisa, realizado convite para participação e, então, aqueles que concordam, foi coletado contato telefônico para agendar dia específico para prosseguimento da pesquisa. Com 7 dias de antecedência da data determinada para retorno do paciente para coleta de dados foi realizado novo contato telefônico e fornecimento de informações a respeito das condições para realização dos exames.

No dia determinado para coleta de dados, foi realizada assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e, então, prosseguiu para a coleta de sangue, realização da elastografia hepática transitória (Fibroscan®) e aplicação protocolo de coleta

de dados da pesquisa (**ANEXO 1**) que contém dados sociodemográficos, medicamentos em uso pelo paciente, realização da antropometria, bioimpedância e coleta dos resultados dos exames bioquímicos recentes, solicitados pelo médico assistente como parte da rotina, por meio de consulta ao prontuário. Também foi realizada aplicação do recordatório de 24h para avaliação dietética (**ANEXO 2**) e avaliação do nível de atividade física (**ANEXO 3**). Neste dia foram fornecidos 2 potes contendo cápsulas de AGPI n-3 rico em EPA ou óleo de oliva com orientações para o uso e armazenamento. Além disso, os pacientes foram orientados a buscar outros 2 frascos dois meses após o início da intervenção, e novamente no quarto mês para retirar os 2 últimos frascos (**Figura 3**), sendo orientados a entregar os frascos anteriores para controle das sobras.

Após 6 meses de acompanhamento, os pacientes repetiram todas as análises realizadas inicialmente. Cabe ressaltar que, todos os indivíduos foram orientados a manter seu estilo de vida habitual.

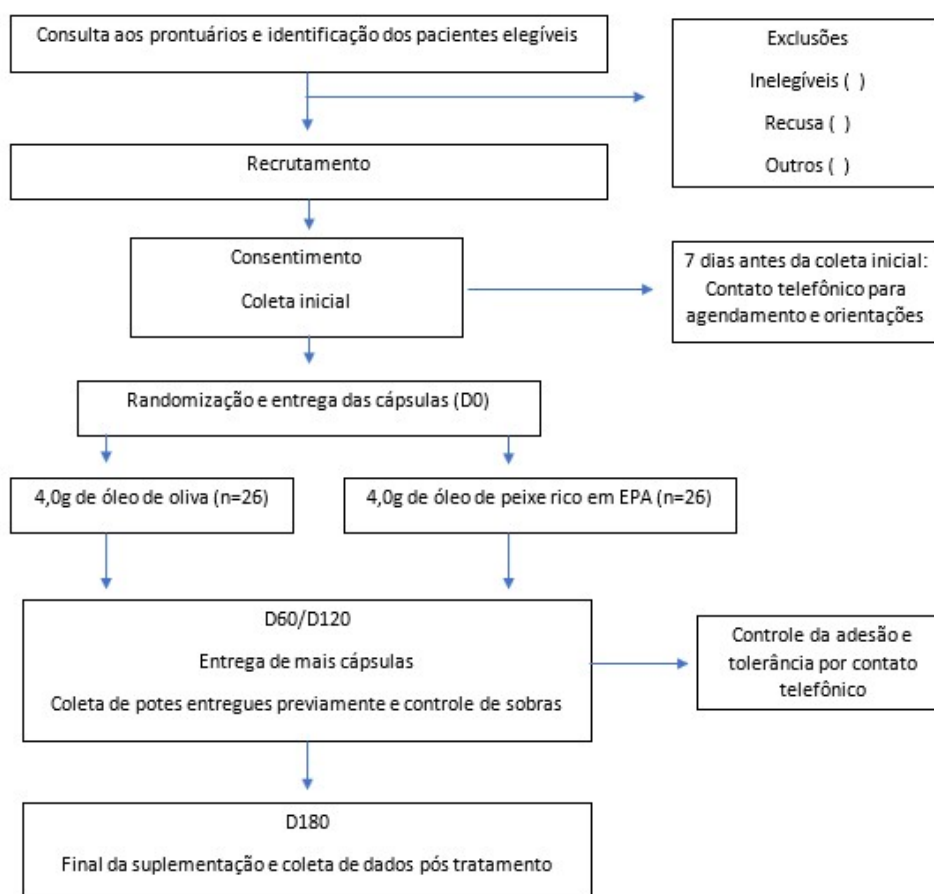


Figura 3. Fluxograma dos participantes do estudo traduzido (BARROSO et al., 2023).

6.5 Avaliação do consumo de bebida alcoólica pelo questionário AUDIT

Para avaliação da frequência e quantidade de ingestão de bebidas alcoólicas foi utilizado o questionário AUDIT (ANEXO 4) proposto pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para rastreamento do consumo excessivo de álcool. O questionário foi aplicado e não foram incluídos na pesquisa os pacientes com pontuação igual ou superior a 8 pontos identificada como consumo de álcool clinicamente relevante com boa sensibilidade. O questionário AUDIT foi aplicado novamente ao final do estudo a fim de avaliar se houve modificação na ingestão de bebida alcoólica durante o tempo de intervenção (BABOR; HIGGINS-BIDDLE, J.C., SAUNDERS; MONTEIRO, 2001).

6.6 Randomização

A randomização foi realizada pela coordenadora da pesquisa utilizando um sistema disponível no site <http://www.random.org> e enviada para a farmacêutica responsável pelo cegamento dos suplementos. Todos os demais, entre pacientes e pesquisadores foram cegos para o tratamento fornecido. A lista de randomização só foi acessada ao final da intervenção de todos os participantes que foram divididos em dois grupos:

Grupo I - Suplementação com AGPI n-3 rico em EPA (INTERVENÇÃO): 26 pacientes, receberam 4 cápsulas ao dia contendo 1 grama de óleo de peixe totalizando aproximadamente 2.100 mg de EPA e 924 mg de DHA por dia durante o período de 06 meses.

Grupo II- óleo de oliva (CONTROLE): 26 pacientes, receberam 4 cápsulas contendo 1 grama de óleo de oliva refinado totalizando cerca de 2.800 mg de ácido oleico por dia durante o período de 06 meses.

6.7 Características das cápsulas e adesão à suplementação

Os suplementos de AGPI n-3 continham óleo de peixe, além de vitamina E em pequena quantidade para evitar a oxidação das duplas ligações dos AGPI n-3. Cada cápsula continha 525 mg de EPA e 231 mg de DHA. Quanto ao controle, foi utilizado óleo de oliva refinado (*Olea europaea*), contendo 750 mg de ácido oleico cada, além de quantidade menores de ácido palmítico e ácido linoleico. Cabe ressaltar que, ambas as cápsulas, eram macias e de coloração amarelada, sem nenhuma codificação, mantendo o cegamento duplo.

Cada frasco continha 120 cápsulas e a adesão da ingestão das cápsulas foi avaliada quinzenalmente, por contato telefônico, e também pelo controle entre a quantidade de

cápsulas fornecidas e as sobras. Os pacientes foram orientados a guardar as cápsulas sob refrigeração e fazer a ingestão em horários pré determinados a fim de minimizar o risco de efeitos colaterais e sabor residual. Ademais, os pacientes não receberam aconselhamento nutricional.

6.8 Viabilidade e Segurança

A viabilidade da intervenção foi avaliada pela capacidade da suplementação com AGPI n-3 rico em EPA, comparado com óleo de oliva, de produzir efeitos sobre a expressão relativa do miR-122, a esteatose e fibrose hepáticas, antropometria, composição corporal e avaliação bioquímica do perfil lipídico e do metabolismo de carboidratos. O uso destes resultados clínicos permite a avaliação da eficácia potencial da intervenção e fornece informações para pesquisas futuras e evidências para o tratamento da MASLD.

A segurança foi monitorada por meio de contato telefônico e questionamento sobre sintomas de intolerância ao tratamento. Esclarecemos que ambos suplementos são regulamentados e comercializados em farmácias. A dose do óleo de peixe utilizada nesta pesquisa já foi testada e aprovada em outros estudos (SCORLETTI et al., 2014b; BISCHOFF et al., 2020) e foi fornecida para nossa pesquisa diretamente do fabricante farmacêutico, colaborador da pesquisa.

6.9 Coleta de sangue

Os participantes foram submetidos a coleta de sangue periférico por profissional devidamente treinado, utilizando 2 tubos distintos, 1 contendo ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) e outro sem anticoagulante, após jejum noturno de 12 horas em tubo *vacutainer*®. Esses tubos foram colocados em centrifuga por 15 minutos a 3000 rotações por minuto (rpm) para separação do plasma, eritrócitos e do soro, ambos foram armazenados em freezer -80°C para as posteriores análises. Aos eritrócitos, foram adicionados 100µL da solução de ditionito de sódio 9,57% (p/v) para evitar a oxidação das duplas ligações dos AGPI (BROEKHUYSE, 1974).

6.10 Quantificação da expressão relativa do miRNA-122

As análises da quantificação da expressão relativa do miR-122 foram realizadas no Laboratório de Bioquímica Nutricional da Universidade do Federal do Rio de Janeiro. Inicialmente, a extração do RNA total foi realizada com o kit miRNeasy soro/plasma (*Quiagen, Hilden, Alemanha*), conforme as instruções do fabricante, utilizando 200 µL de

plasma de cada paciente. Foram adicionados às amostras 1000 µL de Trizol, levado ao vórtex e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, foi adicionado 3,5 µL do Spike-in miRNA-39 (*miRNA-39 sintético, Caenorhabditis Elegans -cel-miR-39; Qiagen, Alemanha*), 200 µL de clorofórmio, levado ao vórtex e incubado por 3 minutos a temperatura ambiente. Após, os eppendorfs foram centrifugados a 12.000g a 4 graus Celsius por 15 minutos para separação da fase aquosa (que contém o RNA total). A fase aquosa foi transferida para novo eppendorf e adicionado mesmo volume de etanol 70% (Merk, Alemanha). Após homogeneização, a mistura foi transferida para as colunas RNeasy MinElute (*Qiagen, Alemanha*) que foram centrifugadas por 15 segundos a $\geq 8000g$ descartando o fluxo.

Posteriormente, foram iniciadas as lavagens, primeiramente com 700 µL do tampão RW1 e, depois, com 500 µL do tampão RPE, realizando centrifugação por 15 segundos a $\geq 8000g$ descartando o fluxo após cada lavagem. Seguiu-se com adição de 30-50 µL de água livre de DNA-ase/RNA-ase, incubando a temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugando por $\geq 8000g$ por 1 minuto, 2 vezes, descartando o fluxo em todas as vezes.

Após a extração, foi realizada obtenção do DNA complementar (cDNA) utilizando o kit TaqMan® Advanced miRNA Assay (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*) e seguindo as instruções do fabricante. Esta etapa compreendeu as fases: 1) Síntese da cauda Poli(A), utilizando o *Poly(A) Reaction Mix*, onde a partir de uma amostra de RNA total, a enzima polimerase poli (A) adicionou adenosina à extremidade da cauda 3' do miRNA; 2) Ligação do adaptador, utilizando *Ligation Reaction Mix*, onde o miRNA com cauda poli (A) sofreu ligação do adaptador na extremidade 5' que atua como o local de ligação do iniciador direto para a reação miR-Amp e; 3) Reação de transcrição reversa, utilizando *RT Reaction Mix*, em que um iniciador de transcrição reversa universal se ligou à cauda 3' poli (A) e o miRNA foi transcrito reversamente. Por fim, as amostras de RT foram pré-amplificadas com o kit TaqMan® Advanced miRNA Assays (*Applied Biosystems, Foster City, California, USA*) utilizando 5µl da RT e 45µl do *miR-Amp Reaction Mix*.

Para quantificação em tempo real, foram utilizados o TaqMan® Fast Master Mix [2x] e o primer específico para hsa-miR-122 (*Thermo Fisher Scientific*), além do gene U6 (*Thermo Fisher Scientific*), utilizado como normalizador, em triplicata. A análise foi realizada pelo sistema StepOnePlus (*Applied Biosystems, marca Thermo Fisher, Foster City, CA, EUA*) foi realizada leitura do RT-qPCR. O cálculo da expressão relativa do miR-122 foi realizado com base em uma amostra de controle de calibração após normalização dos valores do limiar do

ciclo (CT) pelo controle interno miR-39 e os resultados foram analisados pelo método $\Delta\Delta CT$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

6.11 Determinação do perfil de ácidos graxos em eritrócitos

O percentual do enriquecimento de EPA e DHA em eritrócitos foi avaliado por meio por cromatografia gasosa (CG) no Laboratório de Bioquímica Nutricional do Instituto de Nutrição da Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ. As amostras de hemácias são submetidas à extração lipídica, saponificação e metilação alcalina direta utilizando a adaptação do método proposto pela American Oil Chemist's Society AOCS 2b-11 (AOCS, 2017). São adicionados ao tubo 4 mg do padrão interno C13: 0 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), 100 mg de eritrócitos e, depois, 5 ml de hidróxido de sódio (NaOH) em 0,5M metanol. Os tubos são vertidos manualmente e colocados em banho-maria por 15 min a 100 °C sob agitação (4 rpm). Após o resfriamento, 5 ml de BF₃-CH₃OH (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) é adicionado e colocado em banho-maria a 100 °C agitando por dois minutos. Posteriormente, os tubos são novamente resfriados e adiciona-se 5 mL de hexano e 3 mL de NaCl saturado. As amostras são mantidas em repouso em temperatura ambiente por aproximadamente duas horas para transesterificação.

Seguindo as condições cromatográficas descritas anteriormente por (ASSUMPCÃO et al., 2017), os ácidos graxos foram quantificados no cromatógrafo GC 7890A, equipado com um detector de ionização de chama de hidrogênio e EZChrom Elite Software CDS (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, EUA) usando a coluna capilar SP 2560 (bisulopropilpolissiloxano, 100 m × 0,25 mm DI, espessura de 0,20 µm; Supelco, Bellefonte, PA, EUA). Os ésteres metílicos de AGs são identificados comparando o tempo de retenção em relação aos padrões (Padrão de referência GLC 463, Nu-Chek Prep, Inc., Elysian, MN, EUA), que são expressos no presente estudo como porcentagem. O índice ômega 3 é calculado somando o % EPA e % DHA em eritrócitos.

6.12 Avaliação de indicadores bioquímicos

A obtenção dos dados dos exames bioquímicos alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FAL), gama-glutamil transferase (GGT), glicemia de jejum, hemoglobina glicada (HbA1C), triglicerídeos (TG), colesterol total, lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de densidade elevada (HDL) e proteína C reativa (PCR) foi realizada por meio de consulta aos prontuários físicos e eletrônicos. São exames solicitados habitualmente na rotina do acompanhamento pelo

ambulatório da hepatologia e realizados pelo laboratório de análises clínicas do HUCFF e do HFB. Foram coletados os dados presentes em prontuário nos últimos 3 meses anteriores ao início da pesquisa e, ao final, os exames foram repetidos. A insulina de jejum não é habitualmente realizada no hospital e, portanto, foi analisada pelo método de eletroquimioluminescência no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da UFRJ a partir da amostra de soro do paciente. O modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina (HOMA-IR) foi calculado por meio da fórmula: $(\text{glicose (mg/dl)} \times 0,0555) \times \text{insulina } (\mu\text{UI/mL}) / 22,4$.

6.13 Avaliação da esteatose e fibrose hepática pela elastografia hepática transitória

A esteatose e a fibrose hepáticas foram avaliadas por meio da elastografia transitória hepática pelo equipamento de FibroScan® modelo 502 (Echosens, Paris), operado por profissional experiente (> 2000 avaliações), com uso das sondas modelos M e XL (profundidade das medidas variando entre 25 e 65 mm e 35 e 75 mm, respectivamente), após jejum noturno dos pacientes agendados. O grau de acúmulo de gordura hepática foi realizado pelo CAP, expresso em dB/m e variação de 100 a 400 dB/m, e a rigidez hepática foi expressa em kilopascals (kPa), variando de 1,5 a 75 Kpa, com precisão de 0,5 Kpa. O exame foi realizado com o paciente em decúbito dorsal, com o braço direito em abdução máxima e a medida da rigidez hepática foi obtida entre o sexto e sétimo espaço intercostal na linha axilar média. Os resultados da avaliação foram expressos como a mediana de 10 medidas válidas de CAP para esteatose e rigidez hepática para fibrose, considerando percentual de sucesso superior a 60% e intervalo interquartil (IIQ) inferior a 30% da mediana dos valores de CAP e rigidez hepática (GOMEZ-DOMINGUEZ et al., 2006; DE LÉDINGHEN; VERGNIOL, 2008; ZHANG; WONG; WONG, 2020).

6.14 Avaliação da esteatose e fibrose hepática pelos biomarcadores Steato-ELSA, FLI, FIB-4, NFS e FAST score

A esteatose e fibrose hepática também foram avaliadas pelos biomarcadores Steato-ELSA, FLI, FIB-4, NFS e FAST score (BEDOGNI et al., 2006a; ANGULO et al., 2007; VALLET-PICHARD et al., 2007; NEWSOME et al., 2020; PERAZZO et al., 2020), respectivamente, por meio das seguintes fórmulas apresentadas no **Quadro 4**.

Quadro 4. Apresentação das fórmulas de biomarcadores utilizados para estimativa da esteatose e fibrose hepáticas.

Steato-ELSA	$[2.71828 ((0.0823 \times \text{IMC}) + (0.0337 \times \text{PC}) + (0.0596 \times \text{HOMA-IR}) + (0.0036 \times \text{TG}) + (0.0173 \times \text{ALT}) - (0.0124 \times \text{AST}) - 6.6434) / 1 + 2.71828 ((0.0823 \times \text{IMC}) + (0.0337 \times \text{PC}) + (0.0596 \times \text{HOMA-IR}) + (0.0036 \times \text{TG}) + (0.0173 \times \text{ALT}) - (0.0124 \times \text{AST}) - 6.6434)]$
FLI	$[e^{(0,953 \times \log(\text{TG}) + 0,137 \times \text{IMC} + 0,718 \times \log(\text{GGT}) + 0,053 \times \text{PC} - 15,745)}] / [1 + (e^{0,953 \times \log(\text{TG}) + 0,137 \times \text{IMC} + 0,718 \times \log(\text{GGT}) + 0,053 \times \log(\text{PC}) - 15,745})]$
NFS	$[1.675 + 0.037 \times \text{idade (anos)} + 0.094 \times \text{IMC} + 1.13 \times \text{diabetes (sim = 1/ não = 0)} + 0.99 \times \text{AST/ALT} - 0.013 \times \text{plaquetas (x109/L)} - 0.66 \times \text{albumina}]$
FIB-4	$(\text{idade (anos)} \times \text{AST}) / (\text{plaquetas} / 1000) \times \text{raiz quadrada de ALT}$
FAST score	$e^{(-1.65 + 1.07 \times \ln(\text{kPa}) + 2.66 \times 10^{-8} \times \text{CAP3} - 63.3 \times \text{AST}^3)} / 1 + e^{(-1.65 + 1.07 \times \ln(\text{kPa}) + 2.66 \times 10^{-8} \times \text{CAP3} - 63.3 \times \text{AST}^3)}$
Abreviações: FLI, <i>Fatty liver index</i> ; NFS, <i>NAFLD Fibrosis score</i> ; FIB-4, <i>Fibrosis index -4</i> ; FAST score, <i>Fibroscan-AST score</i> ; IMC, índice de massa corporal; PC, perímetro da cintura; ALT, alanina aminotransferase; AST, aspartato aminotransferase; TG, triglicerídeos; HOMA-IR, modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina; GGT, gama glutamiltransferase; kPa, kilopascals; CAP, parâmetro de atenuação controlada.	

6.15 Avaliação antropométrica

O peso atual foi obtido por meio de balança mecânica (Fillizola®) e a estatura aferida por meio do estadiômetro tipo plataforma com o paciente posicionado verticalmente com braços estendidos ao longo do corpo, ombros relaxados, calcanhares juntos e a cabeça posicionada no plano de Frankfurt. O cálculo do IMC foi realizado por meio da fórmula Quetlet: $\text{IMC (kg/m}^2\text{)} = \text{Peso atual (kg)} / \text{Estatura}^2$ (WHO, 1995). Foi aferido o perímetro da cintura (PC) utilizando uma fita métrica flexível e inelástica no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca (LOHMAN; ROCHE; MARTORELL, 1988, WHO, 2000).

6.16 Avaliação da composição corporal

A avaliação da composição corporal foi realizada pelo aparelho tetrapolar Biodynamics®, modelo 450, por meio da disposição de dois conjuntos de dois eletrodos de folha de alumínio, que se subdividem em quatro terminais. Devido à presença de corrente elétrica, foram excluídos da avaliação os pacientes com marca-passos e prótese metálica. Os eletrodos foram posicionados no pé e na mão direita do paciente deitado em decúbito dorsal, sem calçados, relógios e outros metais, com os braços relaxados ao longo do corpo e pernas esticadas e separadas. No pé, o eletrodo distal foi localizado na base do dedo médio e o

proximal um pouco acima do tornozelo, entre os maléolos medial e lateral. Na mão direita, o eletrodo distal encontrou-se na base do dedo médio e o distal um pouco acima da linha da articulação do punho, coincidindo com o processo estiloide (LUKASKI et al., 1986; BIODYNAMICS®, 1994; KYLE et al., 2004).

Os pacientes foram orientados quanto ao jejum, evitar a ingestão de álcool e cafeína (café, chá, chocolate) e não realizar atividade física nas últimas 8 horas anteriores ao teste (KYLE et al., 2004). Para avaliação, foram calculados os índices propostos por (KYLE et al., 2003): índice de massa magra (IMM), índice de massa de gordura corporal (IMG) (obtidos a partir da massa magra (Kg) e da gordura corporal (Kg), respectivamente, e divididos pela altura (m) ao quadrado (Kg/m^2)) e percentual de gordura corporal.

6.17 Avaliação da força muscular

A força muscular foi avaliada pela força de preensão palmar com uso do dinamômetro (Jamar®). O paciente foi mantido sentado, com a coluna ereta, pés apoiados no chão e os cotovelos flexionados a 90 graus sob o apoio para os braços. Foi adotado o protocolo Southampton que recomenda que as medidas das duas mãos sejam realizadas alternadamente, três vezes, começando pela mão direita e com comando verbal a fim de garantir o máximo de esforço durante a avaliação. Foi registrado o maior valor das seis medidas (ROBERTS et al., 2011).

6.18 Avaliação da atividade física

Para avaliação do nível de atividade física antes e após a intervenção foi utilizado o questionário internacional de atividade física (IPAQ), versão curta (ANEXO 3), validado para a população brasileira (CRAIG et al., 2003).

6.19 Avaliação dietética

A ingestão alimentar foi analisada por meio da aplicação do recordatório de 24h (R24h) (ANEXO 2), antes e após a intervenção, em 2 dias típicos e 1 dia considerado atípico. Para maior qualidade na coleta desses dados, a aplicação do R24H foi baseada no método de múltiplas passagens do Departamento de Agricultura dos EUA. (MOSHFEHGH et al., 2008) As medidas caseiras foram convertidas em unidades de massa e volume usando a Tabela para a Avaliação do Consumo de Alimentos em Medidas Caseiras e a ingestão média de energia e os macronutrientes foram analisados com base na Tabela Brasileira de Composição Alimentar

(TBCA) (PINHEIRO, 2009 USP, 2020).

6.20 Análise estatística

A análise descritiva apresentou na forma de tabelas os dados observados, expressos pelas medidas de tendência central e de dispersão adequadas para dados numéricos e pela frequência e porcentagem para dados categóricos. A análise inferencial foi composta pelos seguintes métodos:

- a comparação das variáveis basais entre os grupos (casos e controles) foi analisada pelo teste t de Student para amostras independentes ou de Mann-Whitney para variáveis numéricas e pelo teste do qui-quadrado ou exato de Fisher para variáveis categóricas;

- a variação do momento inicial para o final nas variáveis numéricas no interior de cada grupo foi avaliada pelo teste dos postos sinalizados de Wilcoxon;

- a comparação da evolução (deltas) entre os grupos foi analisada pelo teste de Mann-Whitney; e

Foi realizada uma análise prévia para verificar a normalidade das variáveis. Para tal, foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk juntamente com a análise gráfica do histograma. Uma vez que as variáveis apresentaram distribuição não-Gaussiana foram utilizados testes não paramétricos. O critério de determinação de significância adotado foi p valor $\leq 0,05$. A análise estatística foi processada pelo software estatístico SPSS versão 26.0.

6.21 Aspectos éticos

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUCFF, nº 2.193.438. A inclusão de cada indivíduo foi feita mediante autorização formal, por meio da assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido (**ANEXO 5**) após esclarecimentos sobre os objetivos e procedimentos do projeto por parte do pesquisador, de acordo com a Resolução nº 466 de 12/12/2012 do Conselho Nacional de Saúde. Adicionalmente, o protocolo do estudo foi registrado e aprovado ReBEC número RBR-8dp876.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seção de resultados e discussão encontra-se no artigo elaborado para esta tese de doutorado a ser submetido para a revista *Nutrition*.

Efeito da suplementação com AGPI n-3 rico em EPA sobre o perfil de ácidos graxos em eritrócitos, força muscular, fibrose e esteatose hepáticas e expressão relativa de miR-122 em indivíduos com doença hepática esteatótica associada a disfunção metabólica (MASLD): Ensaio clínico randomizado, duplo cego e controlado.

Palavras-chave: Doença hepática gordurosa não alcoólica, Doença hepática esteatótica associada a disfunção metabólica, óleo de peixe, ácidos graxos poliinsaturados n-3, esteatose hepática, fibrose hepática, miRNAs, miR-122, força muscular.

Número de palavras: 7181 palavras

Autor correspondente: Professora Wilza Arantes Ferreira Peres, Departamento de Nutrição e Dietética, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 367, CCS, Bloco J2, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brasil. e-mail: wilza@nutricao.ufrj.br.

Introdução: Doença hepática esteatótica associada a disfunção metabólica (MASLD) apresenta como fatores de risco a resistência à insulina e aumento da adiposidade e tem prevalência estimada de 32% em adultos. Os ácidos graxos poliinsaturados n-3 (AGPI n-3) parecem ter efeito positivo na melhora dos parâmetros da doença.

Métodos: Ensaio clínico randomizado, duplo cego e controlado, que avaliou o efeito da suplementação de 4g/dia de AGPI n-3 rico em ácido eicosapentaenoico (EPA) em pacientes com MASLD. Os 52 pacientes foram randomizados entre os grupos e receberam suplementação de AGPI n-3 rico EPA ou óleo de oliva durante o período de 6 meses. Foram avaliados no início e no final da intervenção a expressão relativa do miR-122, os graus de fibrose e esteatose hepáticas pela elastografia hepática transitória (Fibroscan®) e pelos biomarcadores NAFLD Fibrosis Score, Fibrosis-4 score, FibroScan-AST score, Steato-Brazilian Longitudinal Study of Adult Health e Fatty Liver Index, a incorporação de ácidos graxos (AGs) na membrana de eritrócitos, perfis lipídico e glicídico, proteína C reativa, antropometria, composição corporal pela bioimpedância elétrica e força muscular pela força de preensão palmar.

Resultados: Não houveram diferenças significativas entre os grupos no baseline dentre todas as variáveis analisadas ($P > 0,05$). Após a suplementação com AGPI n-3 rico em EPA, foi encontrado aumento do percentual de incorporação do ácido docosapentanoico (DPA, $p = 0,001$) e aumento significativamente maior do índice ômega em comparação com grupo controle ($p = 0,012$), sugerindo adesão à suplementação. O grupo AGPI n-3 apresentou redução do percentual de AG mirístico ($p = 0,026$) e aumento significativamente maior da força muscular quando comparada ao controle após intervenção ($p = 0,050$). Não foram encontradas modificação da expressão relativa do miR-122, melhora nos graus de fibrose e esteatose hepáticas ou alteração das demais variáveis bioquímicas após 6 meses de tratamento com AGPI n-3 rico em EPA ($p > 0,05$).

Conclusão: Em pacientes com MASLD, a suplementação de AGPI n-3 rico em EPA promove aumento de DPA e do índice ômega e redução do AGS mirístico melhorando a composição de AGs na membrana de eritrócitos. Além disso, o grupo AGPI n-3 apresentou aumento significativamente maior da força muscular em comparação com grupo controle. Não foi detectado efeito significativo sobre a expressão relativa do miR 122 e os graus de fibrose e esteatose hepáticos. **Registro: ReBEC número RBR-8dp876.**

1. Introdução

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), atualmente conhecida como Doença hepática esteatótica associada a disfunção metabólica (MASLD) (1), apresenta como fatores de risco a resistência à insulina e aumento da adiposidade, justificando que a sua prevalência tenha aumentado rapidamente em paralelo com a obesidade e outras doenças metabólicas sendo atualmente estimada em 25 a 30% da população mundial (2,3). Em um estudo recente com o banco de dados NHANES 2017-2020 a prevalência de MASLD foi semelhante, estimada em 32,45% nos Estados Unidos (4). Por considerar a presença de pelo menos um fator de risco metabólico para o diagnóstico de MASLD, outros estudos também tem demonstrado que quase todos os pacientes previamente diagnosticados com DHGNA também preenchem os critérios para MASLD(5).

Embora o presente estudo tenha inicialmente incluído pacientes com diagnóstico definido de DHGNA, observou-se que todos os pacientes apresentam os critérios de MASLD que é definido pela presença de no mínimo um fator de risco cardiometabólico, em conjunto com a esteatose hepática, na ausência de outros fatores etiológicos para a esteatose (6).

Os ácidos graxos (AGs) são mediadores da doença hepática e podem ser regulados por microRNAs (miRNAs) envolvidos no metabolismo lipídico (7). O acúmulo excessivo de lipídeos e a lipotoxicidade estão relacionados a patogênese e progressão da MASLD e, a composição plasmática de AGs, que reflete a ingestão dietética, mas principalmente o metabolismo endógeno, é considerado um biomarcador da disfunção do metabolismo hepático associado a esteatose (8). Neste contexto, ácidos graxos saturados (AGS), como mirístico (C14:0), palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0) são mais deletérios para fígado que os demais, estando associados a fibrose hepática avançada, estresse do retículo endoplasmático e apoptose de hepatócitos (9,10).

Por outro lado, os ácidos graxos poliinsaturados n-3 (AGPI n-3) podem regular a via de sinalização antioxidante e modular processos inflamatórios, além de influenciar o metabolismo lipídico hepático (11). Os AGPI n-3 mais estudados são os ácidos eicosapentanoico (EPA, C20:5) e docosahexanoico (DHA, C22:6) e, mais recentemente, o docosapentanoico (DPA, C22:5). Estudos prévios vem demonstrando que a suplementação de AGPI n-3 está associada ao aumento da concentração desses AGs eritrócitos e parece estar relacionada a melhora de parâmetros metabólicos e

laboratoriais relacionados as enzimas hepática, assim como ao grau de esteatose hepática, embora haja grande variação nos desfechos dependendo da doses e composição de suplementos e tempos de tratamento nos estudos (12,13). No fígado, os AGPI n-3 podem ativar os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR)- α o qual está envolvido na β -oxidação, aumentando, portanto, a oxidação hepática de lipídeos. Além disso, os AGPI n-3 também podem suprimir a expressão do gene *sterol regulatory element binding protein* (SREBP)-1c reduzindo a lipogênese (14).

Os miRNAs se associam à regulação de processos biológicos por meio da modulação da expressão de genes alvo pós transcricionalmente e são considerados reguladores do metabolismo lipídico, um fator importante que pode influenciar o risco de MASLD. O miRNA- (miR)122 é o mais abundante miRNA expresso pelo fígado e tem como principal função a regulação do metabolismo hepático de lipídeos (15,16). Além disso, é apontado como possível biomarcador não invasivo do diagnóstico e prognóstico da doença hepática, pois sua concentração se altera de acordo com o estágio da doença (15,17).

Ademais, a disfunção metabólica relacionada a doença hepática parece ter associação com a redução do volume muscular e presença de mioesteatose (18). Neste sentido, foi previamente encontrada associação positiva da baixa massa e força muscular com DHGNA/MASLD(19). A sarcopenia, caracterizada pela redução da força e da massa muscular, tem relação direta com o prognóstico e é preditora de mortalidade na doença hepática(20). No entanto, embora o efeito do AGPI n-3 na massa e força muscular já tenha sido avaliado anteriormente(21), não foram encontrados estudos em pacientes com MASLD.

Com base no exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade da suplementação de AGPI n-3, em comparação com controle, em modificar a expressão relativa do miR-122 e os graus de fibrose e esteatose hepáticas, modular favoravelmente a composição de AG da membrana celular de eritrócitos, melhorar o metabolismo glicídico, perfil lipídico, a composição corporal e a força muscular de indivíduos com MASLD.

2. Materiais e Métodos

2.1 Desenho do estudo e participantes

O presente estudo consiste em um ensaio clínico randomizado duplo cego e

controlado conduzido entre Agosto de 2021 a Junho de 2023 que incluiu de pacientes com idade ≥ 20 anos, de ambos os sexos, com diagnóstico de MASLD, acompanhados no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) e no Hospital Federal de Bonsucesso (HFB), Rio de Janeiro, Brasil. Detalhes completos do desenho e da população do estudo foram publicados anteriormente (22).

O diagnóstico de MASLD é definido pela presença de esteatose hepática associada a pelo menos 1 fator de risco cárdio metabólico (**1**) Índice de massa corporal $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ ou perímetro da cintura > 94 cm em homens e 80 cm em mulheres; **2**) Glicose sérica de jejum $\geq 100 \text{ mg/dL}$ ou Glicemia 2h pós sobrecarga de glicose $\geq 140 \text{ mg/dL}$ ou Hemoglobina glicada $\geq 5,7\%$ ou DM tipo 2 ou tratamento para DM tipo 2; **3**) Pressão arterial $\geq 130/85 \text{ mmHg}$ ou tratamento medicamentoso anti-hipertensivo; **4**) Triglicerídeos plasmáticos $\geq 150 \text{ mg/dL}$ ou tratamento com hipolipemiantes; **5**) HDL-colesterol $\leq 40 \text{ mg/dL}$ para homens e $\leq 50 \text{ mg/dL}$ para mulheres) em pacientes que não apresentem outras causas etiológicas para esteatose, como consumo aumentado de álcool. Foram não elegíveis os pacientes que apresentassem cirrose, hepatites virais; febre ou focos infecciosos; câncer com ou sem quimioterapia e radioterapia; doenças autoimunes e/ou com que apresentem maior potencial inflamatório como doenças inflamatórias intestinais, doença renal crônica nos estágios IV e V, lúpus eritematoso sistêmico, dentre outras; transplante, trauma, cirurgia ou internação hospitalar nos últimos 30 dias; uso de esteroides ou anti-inflamatórios não esteroides ou agentes imunomoduladores; uso de suplemento de AGPI n-3 ou outros que possam influenciar os resultados, como silimarina, nos últimos 3 meses anteriores ao estudo; gravidez e lactação e pontuação maior ou igual a 8 no teste de identificação de distúrbio de uso de álcool (*Alcohol Use Disorders Identification Test – AUDIT*).

A randomização foi realizada pela coordenadora da pesquisa pelo sistema <http://www.random.org> e enviada para a farmacêutica responsável pelo cegamento dos suplementos. Todos os demais, entre pacientes, colaboradores e pesquisadores foram cegos para o tratamento fornecido. O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUCFF, nº 2.193.438 e o estudo foi registrado na plataforma ReBEC número RBR-8dp876.

Os indivíduos foram randomizados em proporções iguais (1:1) em dois grupos: Grupo I – Intervenção (AGPI n-3 rico em EPA): 26 pacientes que receberam 4 cápsulas ao dia contendo 1 grama de óleo de peixe cada totalizando aproximadamente 2.100 mg de EPA e 924 mg de DHA por dia e Grupo II – Controle (óleo de oliva): 26 pacientes

que receberam 4 cápsulas contendo 1 grama de óleo de oliva refinado cada totalizando cerca de 2.800 mg de ácido oleico por dia. Os grupos foram suplementados durante o período de 06 meses.

A captação foi realizada por meio da análise de prontuários dos ambulatórios. Os indivíduos identificados como elegíveis foram abordados na sala de espera para consulta médica e convidados para participação. No dia determinado para coleta de dados, foi realizada coleta de sangue; elastografia hepática transitória (Fibroscan®); antropometria; bioimpedância elétrica, dinamometria, coleta dos resultados dos exames bioquímicos recentes, por meio de consulta ao prontuário, aplicação do recordatório de 24h (R24h) e avaliação do nível de atividade física pelo questionário internacional de atividade física (IPAQ).

2.2 Desfechos

Os desfechos foram avaliados pela capacidade do AGPI n-3 rico em EPA em 1) modular a expressão relativa do miR-122; 2) melhorar os graus de fibrose e esteatose hepáticos estimados por meio da elastografia transitória hepática (ETH) (rigidez hepática e parâmetro de atenuação controlada (CAP), respectivamente) e dos biomarcadores NAFLD Fibrosis Score (NFS), Fibrosis-4 score (FIB4), FibroScan-AST score (FAST score), Steato-Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (Steato-ELSA) e Fatty Liver Index (FLI); 3) modificar favoravelmente a composição de AGs em eritrócitos; 4) afetar variáveis antropométricas como índice de massa corporal (IMC) e perímetro da cintura (PC); 5) melhorar a composição corporal (índices de massa magra e de gordura e percentual de gordura corporal); 6) aumentar a força muscular e; 7) melhorar indicadores bioquímicos de perfil lipídico (colesterol total - TC, lipoproteína de baixa densidade - LDL, lipoproteína de densidade elevada - HDL e triglicerídeos - TG), glicídico (glicemia e insulina de jejum, hemoglobina glicada - HbA1C e o modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina - HOMA-IR), enzimas hepáticas (alanina aminotransferase - ALT, aspartato aminotransferase - AST, fosfatase alcalina - ALP e gama-glutamil transferase - GGT) e proteína C reativa (PCR) em indivíduos com MASLD após 6 meses.

2.3 Intervenção

Os suplementos de AGPI n-3 continham óleo de peixe, além de vitamina E em pequena, quantidade para evitar a oxidação das duplas ligações dos AGPI n-3. Cada cápsula continha 525 mg de EPA e 231 mg de DHA. Quanto ao controle, foi utilizado

óleo de oliva refinado, contendo 750 mg de ácido oleico cada. A intervenção foi composta apenas pela suplementação de AGPI n-3 e, portanto, todos os participantes não receberam aconselhamento nutricional e foram orientados a manter seu estilo de vida habitual. Após 6 meses de acompanhamento, os pacientes repetiram todas as análises realizadas no início da pesquisa.

Ambos suplementos são regulamentados, comercializados em farmácias e não oferecem risco à saúde dos participantes. A dose do suplemento de AGPI n-3 utilizada nesta pesquisa já foi testada em outro estudo (23). Os suplementos de AGPI n-3 e óleo de oliva foram fornecidos para nossa pesquisa diretamente dos fabricantes farmacêuticos, colaboradores da pesquisa, que não têm qualquer associação com o desenho, coleta e interpretação de dados do presente estudo.

2.4 Coleta de sangue

Os participantes foram submetidos a coleta de sangue periférico, antes e após a intervenção, utilizando 2 tubos Vacutainer® distintos, 1 contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e outro sem anticoagulante, após jejum noturno. Posteriormente foi realizada separação do plasma, eritrócitos e do soro e armazenamento em freezer - 80°C para as posteriores análises (24).

2.5 Determinação do perfil de AG em eritrócitos

As amostras de hemácias, antes e após a intervenção, foram submetidas à extração lipídica, saponificação e metilação alcalina direta utilizando a adaptação do método proposto pela American Oil Chemist's Society AOCS 2b-11 (2017) (25). Foram adicionados ao tubo 4 mg do padrão interno C13: 0 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), 100 mg de eritrócitos e, depois, 5 ml de hidróxido de sódio (NaOH) em 0,5M metanol. Os tubos foram vertidos manualmente e colocados em banho-maria por 15 min a 100 °C sob agitação (4 rpm). Após o resfriamento, 5 ml de BF₃-CH₃OH (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) foi adicionado e colocado em banho-maria a 100 °C agitando por dois minutos. Posteriormente, os tubos foram novamente resfriados e adicionou-se 5 mL de hexano e 3 mL de NaCl saturado. As amostras foram mantidas em repouso em temperatura ambiente por aproximadamente duas horas para transesterificação.

Seguindo as condições cromatográficas descritas anteriormente (26), os AGs foram quantificados no Cromatógrafo GC 7890A, equipado com um detector de ionização de chama de hidrogênio e EZChrom Elite Software CDS (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, EUA) usando a coluna capilar SP 2560

(bisulopropilpolissiloxano, 100 m × 0,25 mm DI, espessura de 0,20 µm; Supelco, Bellefonte, PA, EUA). Os ésteres metílicos de AGs foram identificados comparando o tempo de retenção em relação aos padrões (Padrão de referência GLC 463, Nu-Chek Prep, Inc., Elysian, MN, EUA), que foram expressos no presente estudo como porcentagem. O índice ômega 3 foi calculado somando o % EPA e % DHA.

2.6 Extração de RNA, PCR em Tempo Real e Expressão Relativa do miR-122

A extração do RNA total foi realizada com o kit miRNeasy soro/plasma (Quiagen, Hilden, Alemanha), conforme as instruções do fabricante, utilizando 200 µL de plasma de cada paciente, e adicionado o Spike-in miR-39 (miRNA-39 sintético, *Caenorhabditis Elegans* -cel-miR-39; Qiagen, Alemanha). Após a extração, foi realizada obtenção do cDNA por meio da transcrição reversa utilizando o kit TaqMan® Advanced miRNA Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Por fim, foram utilizados o TaqMan® Fast Master Mix [2x] e o primer específico para hsa-miR-122 (Thermo Fisher Scientific), além do gene U6 (Thermo Fisher Scientific), utilizado como normalizador, em triplicata, para quantificação em tempo real e, pelo sistema StepOnePlus (Applied Biosystems, marca Thermo Fisher, Foster City, CA, EUA) foi realizada leitura do RT-qPCR. O cálculo da expressão relativa do miR-122 foi realizado com base em uma amostra de controle após normalização dos valores do limiar do ciclo (CT) pelo controle interno miR-39 e os resultados foram analisados pelo método $\Delta\Delta CT$ (27).

2.7 Avaliação da esteatose e fibrose hepáticas

A esteatose e a fibrose hepáticas foram avaliadas, antes e após a intervenção, por meio da ETH, pelo equipamento de FibroScan® modelo 502 (Echosens, Paris), e por meio dos biomarcadores hepáticos apresentados nos **Quadros 1 e 2**. A EHT foi realizada por profissional experiente (> 2000 avaliações), com uso das sondas modelos M e XL, após jejum. O exame foi realizado com o paciente em decúbito dorsal, com o braço direito em abdução máxima e a medida da rigidez hepática foi obtida entre o sexto e sétimo espaço intercostal na linha axilar média. Os resultados da avaliação foram expressos como a mediana de 10 medidas válidas de CAP para esteatose e rigidez hepática para fibrose, considerando percentual de sucesso superior a 60% e intervalo interquartil (IIQ) inferior a 30% da mediana dos valores de CAP e rigidez hepática (28–30).

Quadro 1. Apresentação de fórmulas de biomarcadores utilizados para estimar a esteatose hepática.

Steato-ELSA	$[2.71828 ((0.0823 \times \text{IMC}) + (0.0337 \times \text{PC}) + (0.0596 \times \text{HOMA-IR}) + (0.0036 \times \text{TG}) + (0.0173 \times \text{ALT}) - (0.0124 \times \text{AST}) - 6.6434) / 1 + 2.71828 ((0.0823 \times \text{IMC}) + (0.0337 \times \text{PC}) + (0.0596 \times \text{HOMA-IR}) + (0.0036 \times \text{TG}) + (0.0173 \times \text{ALT}) - (0.0124 \times \text{AST}) - 6.6434)]$
FLI	$[e^{(0,953 \times \log(\text{TG}) + 0,137 \times \text{BMI} + 0,718 \times \log(\text{GGT}) + 0,053 \times \text{WC} - 15,745)}] / [1 + (e^{0,953 \times \log(\text{TG}) + 0,137 \times \text{BMI} + 0,718 \times \log(\text{GGT}) + 0,053 \times \log(\text{WC}) - 15,745})]$

Abreviations: IMC, índice de massa corporal; PC, ; IR, resistência à insulina; TG, triglicerídeos; ALT, alanina aminotransferase; AST, aspartato aminotransferase; e, exponencial, log, logaritmo; GGT, gamma glutamiltransferase; Steato-ELSA, Steato-Estudo Brasileiro Longitudinal da Saúde do Adulto; FLI, fatty liver index.

Quadro 2. Apresentação de fórmulas de biomarcadores utilizados para estimar a fibrose hepática.

NFS	$[1.675 + 0.037 \times \text{idade (anos)} + 0.094 \times \text{IMC} + 1.13 \times \text{diabetes (sim = 1/não= 0)} + 0.99 \times \text{AST/ALT razão} - 0.013 \times \text{plaquetas (x109/L)} - 0.66 \times \text{albumina}]$
FIB-4	$(\text{idade (anos)} \times \text{AST}) / (\text{plaquetas} / 1000) \times \text{raiz quadrada de ALT}$
FAST score	$e^{(-1.65 + 1.07 \times \ln(\text{kPa}) + 2.66 \times 10^{-8} \times \text{CAP3} - 63.3 \times \text{AST}^3)} / 1 + e^{(-1.65 + 1.07 \times \ln(\text{kPa}) + 2.66 \times 10^{-8} \times \text{CAP3} - 63.3 \times \text{AST}^3)}$

Abreviations: IMC, índice de massa corporal; ALT, alanina aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; e, exponencial, log, logaritmo; GGT, gamma glutamiltransferase; CAP, parâmetro de atenuação controlada; kPa, kilopascals; NFS, NAFLD Fibrosis Score; FIB, Fibrosis-4 score; FAST score, FibroScan-AST score.

2.8 Avaliação bioquímica

ALT, AST, ALP, GGT, glicemia de jejum, HbA1C, TG, CT, LDL, HDL e PCR foram avaliados antes e após a intervenção por meio de consulta aos prontuários. Foram considerados os exames realizados até 3 meses antes da inclusão dos pacientes na pesquisa e, ao final do tratamento, todos os exames foram repetidos. A insulina de jejum foi analisada pelo método de eletroquimioluminescência no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da UFRJ a partir da amostra de soro do paciente. O HOMA-IR foi calculado por meio da fórmula: (glicose (mg/dl) x 0,0555) x insulina (μUI/mL) / 22,4.

2.9 Composição corporal, antropometria e força muscular

Foram aferidos, antes e após a intervenção, peso e estatura, para cálculo do IMC (peso (kg)/ altura (m²), e PC utilizando fita métrica flexível e inelástica (31–33). A avaliação da composição corporal foi realizada pelo aparelho portátil tetrapolar Biodynamics®, modelo 450 (TBW, São Paulo, Brasil). Os eletrodos foram posicionados no pé e na mão direita do paciente deitado em decúbito dorsal, sem calçados, relógios e outros metais, com os braços relaxados ao longo do corpo e pernas esticadas e separadas (34–36). Os pacientes foram orientados quanto ao jejum, evitar a ingestão de álcool e cafeína (café, chá, chocolate) e não realizar atividade física nas últimas 8 horas anteriores ao teste (34–36). Devido à presença de corrente elétrica, foram excluídos da avaliação os pacientes com marca-passo e prótese metálica. Para avaliação, foram calculados os índice de massa magra (IMM), índice de massa de gordura corporal (IMG) (obtidos a partir da massa livre de gordura (Kg) e da gordura corporal (Kg), respectivamente, e divididos pela altura (m) ao quadrado (Kg/m²)) e percentual de gordura corporal (37).

A força muscular foi avaliada pela força de preensão palmar com uso do dinamômetro (Jamar®). O paciente foi mantido sentado, com a coluna ereta, pés apoiados no chão e os cotovelos flexionados a 90 graus sob o apoio para os braços. Foi adotado o protocolo Southampton que recomenda que as medidas das duas mãos sejam realizadas alternadamente, três vezes, começando pela mão direita e com comando verbal a fim de garantir o máximo de esforço durante a avaliação. Foi registrado o maior valor das seis medidas (38).

2.10 Avaliação dietética

A ingestão alimentar foi avaliada por meio da aplicação, baseado no método de múltiplas passagens, do recordatório de 24h (R24h), antes e após a intervenção, em 2 dias típicos e 1 dia considerado atípico (39). A ingestão média de energia e os macronutrientes foram analisados com base na Tabela Brasileira de Composição Alimentar (TBCA) (40).

2.11 Avaliação de atividade física

Para avaliação do nível de atividade física, antes e após a intervenção, foi utilizado o IPAQ, versão curta, validado para a população brasileira (41).

2.12 Cálculo da amostra

O cálculo do tamanho amostral foi realizado com base no estudo de CAPANNI et al., 2006 (42). Foram considerados os seguintes parâmetros: nível de significância α

= 5% (bilateral), poder do teste $1-\beta = 80\%$ e diferença esperada no delta absoluto dos parâmetros bioquímicos entre os grupos relativamente "grande" (tamanho do efeito $> 1,0$). De acordo com GPower 3.1.9.2 para opção teste Wilcoxon-Mann-Whitney dois grupos independentes, o número mínimo foi de 18 casos por grupo. Assumindo um percentual de perda (drop out) de até 25%, chegou-se a 52 pacientes para o estudo.

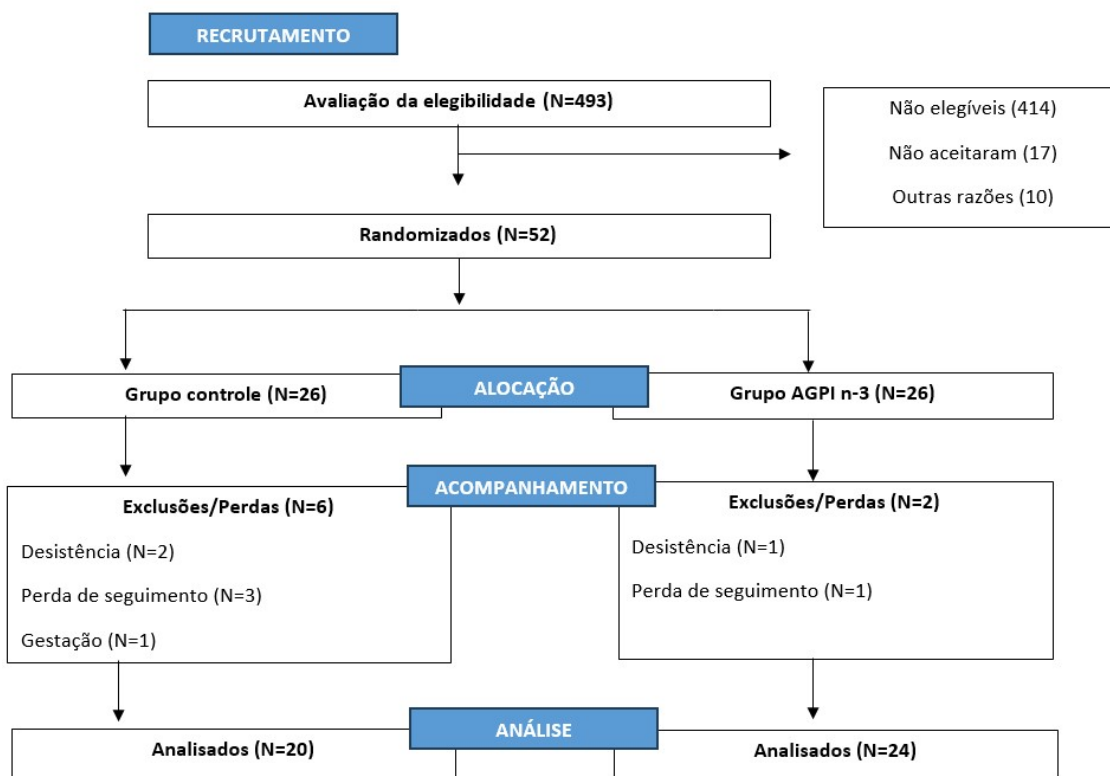
2.13 Análise estatística

A hipótese de normalidade foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk. As variáveis numéricas no baseline foram apresentadas em média \pm desvio padrão ou mediana e intervalo interquartilico, de acordo com a distribuição da amostra, e frequência para as variáveis categóricas. Os dados numéricos entre o grupo controle e AGPI n-3 no baseline foram comparados pelos testes de *Mann-Whitney* ou teste-t, de acordo com a normalidade dos dados, e o teste do qui-quadrado (X^2) foi utilizado para variáveis categóricas. As modificações dentro dos grupos foram avaliadas usando os testes de postos sinalizados de *Wilcoxon*. Os deltas das variáveis entre o início e o final do tratamento foram apresentados em mediana e intervalo interquartilico e comparados entre os grupos pelos testes de *Mann-Whitney*. Um p-valor $\leq 0,05$ foi considerado significativo. A análise estatística foi processada pelo software estatístico SPSS versão 26.0.

3. Resultados

Dos 52 pacientes randomizados, 44 completaram o estudo (20 no grupo controle e 24 no grupo intervenção) e foram analisados. Os principais motivos para perda de segmento dos pacientes foram ingestão irregular das cápsulas, desistência do paciente e descoberta de gestação durante o estudo (**Figura 1**). A presença de sintomas gastrointestinais como náuseas (N=4, sendo 1 do grupo controle e 3 do grupo n-3), desconforto abdominal (N=1 do grupo controle), diarreia (N=1 do grupo n-3) e sabor residual de peixe (N=3 do grupo n-3) foram relatados por 8 pacientes (2 do grupo controle e 6 do grupo n-3).

A população do presente ensaio clínico randomizado, duplo cego e controlado (N=44) foi composta predominantemente por mulheres (N=34) com médias de idade de 62,10 (9,57) e 61,54 (9,07) para os grupos controle e n-3, respectivamente. As comparações entre as demais variáveis clínicas, bioquímicas, antropométricas e de ingestão alimentar não demonstraram diferenças significativas entre os grupos controle e n-3 no baseline (**Tabela 1**).

Figura. 1 Fluxograma CONSORT dos participantes.**Table 1.** Comparação entre variáveis demográficas, clínicas e bioquímicas dos grupos controle e AGPI n-3 de pacientes com MASLD incluídos no estudo.

Variáveis	Grupo Controle (n=20)	Grupo AGPI n-3 (n=24)	P valor
Sexo, M/F [§]	5/15	5/19	0,789
Idade, anos [#]	62,10(9,57)	61,54 (9,07)	0,844
Atividade física, ativo/inativo [§]	12/12	7/13	0,372
Força muscular (kgf)	24,0 (16,5;47,5)	29,0 (20,0;40,0)	0,660
IMC (kg/m ²)*	33,83 (30,52;36,79)	32,55 (29,69;34,70)	0,370
PC (cm)*	107,15 (100,75;118,95)	106,0 (101,51;111,50)	0,258
IMG (kg/m ²)*	13,36 (10,95;16,61)	13,38 (11,43;14,97)	0,654
IMM (kg/m ²)*	19,37 (18,37;21,12)	19,22 (17,66;21,0)	0,525
GC (%)*	41,30 (36,80;45,71)	41,95 (37,98;43,98)	0,832
Ingestão energética (kcal, R24h)*	1333,02 (973,52;1541,77)	1249,79 (992,21;1499,91)	0,654
Ingestão proteica (g, R24h)*	62,26 (42,48;85,16)	64,10 (32,59;85,30)	0,961
Ingestão carboidratos (g, R24h)*	170,61 (133,98;211,66)	158,40 (134,57;191,23)	0,608
Ingestão lipídica (g, R24h)*	43,66 (28,59;57,51)	40,20 (24,54;61,56)	0,961
Ácidos graxos saturados (% ET)*	44,41 (38,47;47,29)	44,23 (38,41;46,49)	1,000

Ácidos graxos monoinsaturados (%ET)*	42,07 (34,90;44,85)	42,01 (37,70;46,25)	0,869
Ácidos graxos poliinsaturados (%ET)*	12,75 (8,53;23,36)	11,63 (9,32;16,41)	0,540
ALT (U/L)*	24,50 (15,75;33,50)	23,0 (16,25;38,0)	0,887
AST (U/L)*	21,0 (17,0;25,75)	25,0 (16,0;32,0)	0,379
GGT (U/L)*	32,0 (24,25;41,0)	33,0 (21,0;41,0)	0,865
FAL (U/L)*	73,0 (61,25;83,0)	58,50 (52,0;77,0)	0,273
Glicemia de jejum (mg/dL)*	102,0 (95,0;142,0)	108,0 (94,0;139,75)	0,941
HbA1c %*	6,0 (5,7;7,97)	6,40 (5,70;7,90)	0,850
Insulina de jejum (μ UI/mL)*	16,90 (10,20;24,37)	12,55 (9,52;19,92)	0,346
HOMA-IR*	4,61 (2,66;7,40)	3,87 (2,19;7,18)	0,366
COL (mg/dL)*	171,0 (155,25;222,75)	187 (142,0;223,25)	0,869
LDL (mg/dL)*	84,0 (66,75;133,75)	103,0 (60,0;138,0)	0,865
HDL (mg/dL)*	47,50 (41,25;54,50)	52,0 (45,0;55,0)	0,428
TG (mg/dL)*	182,0 (132,0;244,0)	140,50 (115,75;170,75)	0,099
PCR (mg/dL)*	3,40 (1,75;4,70)	3,80 (1,52;6,77)	0,809
CAP (dB/m)*	319,50(305,0;345,50)	297,50 (259,0;322,75)	0,069
Fibrose hepática (kPa)*	6,95 (5,12;8,72)	5,90 (4,40;6,75)	0,175

Os dados são descritos em média \pm DP ou medianas e IIQ. O teste de Mann Whitney* ou o teste t# foram utilizados para as variáveis numéricas de acordo com a normalidade dos dados e o teste do qui-quadrado (X²) foi utilizado para as variáveis categóricas\$. A diferença entre os grupos controle e n-3: $p \leq 0,05$. Abreviações: IIQ, intervalo interquartil; IMC, índice de massa corporal; PC, perímetro da cintura; IMG, índice de massa de gordura; IMM, índice de massa magra; GC, gordura corporal; R24h, 24h-recall; TE, eritrócitos; ALT, alanina transaminase; AST, aspartato transaminase; GGT, gama-glutamil transferase; FAL, fosfatase alcalina; HbA1c, Hemoglobina glicada; HOMA-IR, modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina; LDL, lipoproteína de baixa densidade; HDL, lipoproteína de alta densidade; COL, colesterol total; TG, triglicerídeos; PCR, proteína C reativa; CAP, parâmetro de atenuação controlada; kPa, kilopascals.

Análises do enriquecimento de ácidos graxos em eritrócitos dentro dos grupos

A **Tabela 2** mostra o percentual de enriquecimento de ácidos graxos em eritrócitos entre o baseline e após 6 meses de intervenção dos pacientes randomizados entre os grupos controle (n=19) ou n-3 (n=23). Dois pacientes (1 grupo controle e 1 grupo controle) não puderam ser analisados na cromatografia e, portanto, foram excluídos desta análise. O percentual de enriquecimento de DPA aumentou entre o início e o final do tratamento no grupo n-3 [1,66 (1,20;2,09) vs 2,90 (2,53;3,31); $p = 0,001$]. O percentual de EPA [0,41 (0,26;1,01) vs 1,26 (0,60;1,86); $p = 0,064$] aumentou no grupo n-3 após 6 meses, porém sem diferença significativa, enquanto o percentual de DHA reduziu significativamente no grupo controle [2,60 (2,13; 2,99) vs 2,14

(1,36;2,57); **p = 0,050**].

O percentual de enriquecimento em eritrócitos do AGS (ácido graxo saturado) mirístico reduziu no grupo n-3 [0,82 (0,21;1,77) vs 0,30 (0,14;0,66); **p = 0,026**] e dos AGS palmítico, esteárico, bem como o percentual total de AGS reduziram tanto no grupo controle [21,35 (18,40;23,25) vs 16,04 (8,69;18,37); **p = 0,001**, 18,88 (16,52;20,28) vs 14,89 (9,19;15,45), **p = 0,004** e 44,41 (38,47;47,28) vs 34,05 (30,60; 39,88); **p = 0,007**] quanto no grupo n-3 [21,75 (19,02;22,92) vs 17,01 (14,78;20,03); **p = 0,002**, 19,12 (17,60;20,19) vs 14,20 (12,82;16,61); **p = 0,000** e 44,24 (38,41;46,49) vs 37,13 (34,20; 43,21); **p=0,023**]. O percentual de AGPI em eritrócitos foi significativamente maior ao final de 6 meses nos grupos n3 [11,63 (9,32; 16,41) vs 20,46 (12,85; 28,88); **p=0,000**] e controle [12,75 (8,53; 23,36) vs 16,86 (13,74;22,75); **p = 0,000**].

Tabela 2. Avaliação do enriquecimento de ácidos graxos em eritrócitos de pacientes com MASLD após 6 meses da ingestão de AGPI n-3 ou óleo de oliva.

Variáveis	Grupos	Basal (n=19)		Pós tratamento (n=23)		p-valor
		Mediana	IHQ	Mediana	IHQ	
AG mirístico (%)	Controle	0,06	0,0;0,43	0,14	0,06;0,26	0,744
	n-3	0,82	0,21;1,77	0,30	0,14;0,66	0,026
AG palmítico (%)	Controle	21,35	18,40;23,25	16,04	8,69;18,37	0,001
	n-3	21,75	19,02;22,92	17,01	14,78;20,03	0,002
AG esteárico (%)	Controle	18,88	16,52;20,28	14,89	9,19;15,45	0,004
	n-3	19,12	17,60;20,19	14,20	12,82;16,61	0,000
AGS total (%)	Controle	44,41	38,47;47,28	34,05	30,60;39,88	0,007
	n-3	44,24	38,41;46,49	37,13	34,20;43,21	0,023
AGMI total (%)	Controle	42,07	34,90;44,85	44,48	30,51;51,13	0,629
	n-3	42,01	38,25;43,13	38,25	31,06;43,13	0,346
EPA (%)	Controle	0,31	0,23;1,06	0,34	0,25;1,55	0,355
	n-3	0,41	0,26;1,01	1,26	0,60;1,86	0,064
AG araquidônico (%)	Controle	0,22	0,12;0,68	0,40	0,06;0,95	0,500
	n-3	0,26	0,16;0,64	0,33	0,14;0,86	0,855
DPA (%)	Controle	1,67	1,03;2,13	1,62	1,07;2,09	0,888
	n-3	1,66	1,20;2,09	2,90	2,53;3,31	0,001
DHA (%)	Controle	2,60	2,13;2,99	2,14	1,36;2,57	0,050

	n-3	2,49	1,72;3,51	3,15	2,70;4,09	0,101
AGPI total (%)	Controle	12,75	8,53;23,36	16,86	13,74;22,75	0,000
	n-3	11,63	9,32;16,41	20,46	12,85;28,88	0,000
AGPI n-3 total (%)	Controle	5,66	4,89;8,46	8,82	4,60;18,51	0,171
	n-3	6,26	4,82;7,96	9,41	6,52;13,83	0,144
Omega indice (%)	Controle	3,10	2,61;3,88	2,54	1,21;3,41	0,212
	n-3	3,39	2,44;4,06	4,41	3,15;5,80	0,136
n-6/n-3 razão	Controle	0,61	0,29;1,67	0,56	0,23;2,27	0,936
	n-3	0,71	0,46;1,59	0,43	0,19;1,60	0,709

Os valores são medianas, intervalos interquartis (IIQ). *Diferença entre o valor basal e após 6 meses de intervenção no grupo controle e AGPI n-3: $p \leq 0,05$. O teste de Wilcoxon foi aplicado às variáveis numéricas. Abreviaturas: AG, ácidos graxos; AGS, ácidos graxos saturados; AGMI ácidos graxos monoinsaturados; EPA, eicosapentaenoico; DPA, docosapentaenóico; DHA, docosahexaenoico; AGPI, ácidos graxos poli-insaturados.

Análises de variáveis clínicas, bioquímicas e antropométricas dentro dos grupos

A comparação das medianas das variáveis clínicas, bioquímicas e antropométricas não apresentou diferença significativa entre o baseline e 6 meses após em ambos os grupos, controle e n3. A análise de Wilcoxon revelou que não houve modificação significativa do CAP, rigidez hepática e dos biomarcadores FIB4, NFS, FAST score e Steato-ELSA nos grupos controle e n-3 ao final de 6 meses. O desfecho primário do estudo, miR-122, também não se alterou entre o início e o final do tratamento com AGPI n-3 rico em EPA (**Tabela3**).

Tabela 3. Avaliação antropométrica, bioquímica e clínica de pacientes com MASLD após 6 meses da ingestão de AGPI n-3 ou óleo de oliva.

Variáveis	Grupo	Basal (n=20)		Pós tratamento (n=24)		p-valor
		Mediana	IIQ	Mediana	IIQ	
IMC (kg/m ²)	Controle	33,83	30,52;36,79	33,52	31,25;37,24	0,390
	n-3	32,55	29,69;34,70	32,30	30,17;34,12	0,915
PC (cm)	Controle	107,15	100,75;118,95	109,0	100,62;116,10	0,514
	n-3	106,0	101,57;111,50	105,0	97,75;111,25	0,383
Força muscular (kgf)	Controle	24,0	16,5;47,5	23,0	18,0;33,0	0,135
	n-3	29,0	20,0;40,0	30,0	20,0;44,0	0,237
IMG (kg/m ²)	Controle	13,36	10,95;16,61	14,15	10,16;16,85	0,494
	n-3	13,37	11,43;14,97	13,66	11,92;15,19	0,209

IMM (kg/m ²)	Controle	19,37	18,37;21,12	19,20	18,33;20,73	0,334
	n-3	19,22	17,66;21,01	18,75	17,30;20,87	0,607
GC (%)	Controle	41,30	36,80;45,71	41,74	37,79;46,64	0,227
	n-3	41,95	37,99;43,98	43,18	37,50;45,28	0,440
Fibrose hepática (kPa)	Controle	6,95	5,12;8,75	6,90	5,67;8,35	0,313
	n-3	5,90	4,40;6,75	5,75	4,60;6,67	0,558
CAP (dB/m)	Controle	319,50	305,0;345,50	326,50	280,75;349,25	0,926
	n-3	297,50	259,0;322,75	293,0	268,0;331,50	0,466
COL (mg/dL)	Controle	171,0	155,25;222,75	167,50	149,50;198,25	0,433
	n-3	187,0	142,0;223,25	190,0	143,0;231,0	0,274
TG (mg/dL)	Controle	182,0	132,0;244,0	155,5	101,0;225,25	0,232
	n-3	140,50	115,75;170,75	124,0	102,0;167,0	0,181
LDL (mg/dL)	Controle	84,0	66,75;133,75	87,0	69,0;120,25	0,943
	n-3	103,0	60,0;138,0	106,0	72,50;142,5	0,232
HDL (mg/dL)	Controle	47,50	41,25;54,50	48,0	41,75;54,25	0,494
	n-3	52,0	45,0;55,0	54,0	45,0;55,5	0,468
Glicemia de jejum (mg/dL)	Controle	102,0	95,0;142,0	99,0	73,0;111,0	0,102
	n-3	108,0	94,0;139,75	98,0	85,0;113,0	0,117
Insulina de jejum (μUI/mL)	Controle	16,90	10,20;24,37	16,40	11,17;29,15	0,161
	n-3	12,55	9,52;19,92	14,50	11,42;20,75	0,679
HOMA-IR	Controle	4,61	2,66;7,40	5,32	1,95;8,57	0,744
	n-3	3,87	2,19;7,18	3,37	2,43;6,18	0,289
HbA1C (%)	Controle	6,0	5,70;7,97	6,0	5,75;7,07	0,602
	n-3	6,40	5,70;7,90	6,0	5,70;7,25	0,983
AST (U/L)	Controle	21,0	17,0;25,75	19,0	17,0;26,0	0,231
	n-3	25,0	16,0;32,0	22,0	18,0;30,0	0,265
ALT (U/L)	Controle	24,50	15,75;33,50	21,0	18,0;30,0	0,856
	n-3	23,0	16,25;38,0	23,0	18,0;36,0	0,180
FAL (U/L)	Controle	73,0	61,25;83,0	74,50	56,25;89,0	0,455
	n-3	58,5	52,0;77,0	63,0	50,5;80,25	0,454
GGT (U/L)	Controle	32,0	24,25;41,0	30,50	22,25;44,25	0,751
	n-3	33,0	21,0;41,0	28,0	21,0;41,0	0,793
PCR (mg/dL)	Controle	3,40	1,75;4,70	2,40	1,70;3,82	0,510
	n-3	3,80	1,52;6,77	3,60	1,50;6,60	1,000
FIB4	Controle	0,95	0,80;1,55	0,95	0,73;1,71	0,794
	n-3	1,02	0,74;1,44	1,18	0,78;1,42	0,677

						74
FLI	Controle	89,0	76,50;96,75	87,0	76,50;66,50	0,672
	n-3	82,0	66,0;92,0	83,0	70,0;89,25	0,616
NFS	Controle	-0,95	-1,52; -0,18	-0,79	-1,92; -0,57	0,149
	n-3	-1,17	-2,85; -0,67	-1,01	-2,28; -0,47	0,570
FAST score	Controle	0,19	0,05;0,27	0,11	0,07;0,26	0,519
	n-3	0,11	0,05;0,24	0,13	0,07;0,30	0,313
Steato-ELSA	Controle	0,71	0,55;0,86	0,72	0,53;0,85	0,837
	n-3	0,66	0,48;0,75	0,66	0,48;0,74	0,295
miR-122	Controle	0,05	0,00;1128,26	0,15	0,03;14938,59	0,645
	n-3	0,14	0,01;8584,57	0,09	0,01;0,64	0,140

Os valores são medianas, intervalos interquartis (IIQ). *Diferença entre o valor basal e após 6 meses de intervenção no grupo controle e AGPI n-3: $p \leq 0,05$. O teste de Wilcoxon foi aplicado às variáveis numéricas. Abreviações: IMC, índice de massa corporal; PC, perímetro da cintura; IMG, índice de massa de gordura; IMM, índice de massa magra; GC, gordura corporal; CAP, parâmetro de atenuação controlada; kPa, quilopascal; COL, colesterol total; TG, triglicerídeos; LDL, lipoproteína de baixa densidade; HDL, lipoproteína de alta densidade; HOMA-IR, modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina; HbA1c, Hemoglobina glicada; AST, aspartato transaminase; ALT, alanina transaminase; FAL, fosfatase alcalina, GGT, gama-glutamil transferase; PCR, proteína C reativa; FIB4, Fibrosis-4 score; FLI, Fatty Liver Index; NFS, NAFLD Fibrosis Score; ; FAST score, FibroScan-AST score; Steato-ELSA, Steato-Estudo Longitudinal Brasileiro de Saúde do Adulto; miR-122; microRNA 122.

Análise dos deltas absolutos de enriquecimento de eritrócitos e de variáveis clínicas, bioquímicas e antropométricas entre os grupos

Observou-se, segundo o delta absoluto (Tabela 4), que o grupo n-3 apresentou redução significativamente maior do percentual de AG mirístico ($p = 0,028$) e aumento significativamente maior do DPA ($p = 0,005$) e do índice ômega ($p = 0,012$) após 6 meses de intervenção comparado ao controle. O grupo controle apresentou redução significativamente maior do enriquecimento de DHA em eritrócitos ($p = 0,017$) comparado ao grupo n-3. Por fim, o grupo n-3 apresentou aumento significativamente maior da força muscular ($p=0,050$) quando comparado ao grupo controle e não foi observada diferença significativa quanto às demais variáveis de composição corporal, bioquímica e de avaliação da fibrose e esteatose hepáticas.

Tabela 4. Análise dos deltas absolutos do enriquecimento de ácidos graxos em eritrócitos, desfechos antropométricos, bioquímicos e clínicos de pacientes com MASLD de acordo com grupos controle e AGPI n-3.

Variáveis	Grupo controle (n= 20)		Grupo AGPI n-3 (n=24)		p-valor
AG mirístico (%)	0,06	-0,38;0,50	-0,34	-1,40;0,04	0,028
AG palmítico (%)	-6,27	-15,07;-2,34	-4,57	-8,01;0,00	0,172
AG esteárico (%)	-4,37	-11,65;-0,96	-5,07	-7,11;-1,21	0,850

AGS total (%)	-10,68	-16,45;0,44	-7,49	-15,76;0,38	0,465
AGMI total (%)	-0,24	-15,46;15,91	-6,26	-16,59;10,56	0,400
EPA (%)	0,05	-0,18;0,79	0,77	-0,51;1,43	0,340
AG araquidônico (%)	0,08	-0,61;0,55	-0,01	-0,21;0,33	0,697
DPA (%)	0,00	-1,16;0,73	1,17	0,14;1,69	0,005
DHA (%)	-0,46	-1,29;-0,12	0,49	-0,71;1,30	0,017
AGPI total (%)	2,10	-10,40;10,22	8,42	-3,16;17,56	0,300
AGPI n-3 total (%)	1,88	-2,98;7,28	1,39	-2,05;8,05	0,953
Omega indice (%)	-0,58	-1,58;-0,07	0,86	-0,63;2,17	0,012
n-6/n-3 razão (%)	-0,19	-1,24;1,75	-0,14	-0,75;0,56	0,930
IMC (kg/m ²)	0,51	-1,32;1,02	-0,20	-0,89;0,91	0,500
PC (cm)*	0,76	-3,10;4,50	0,75	-2,92;4,95	0,860
Força muscular (kgf)	-4,0	-15,75;2,0	5,0	-6,50;10,0	0,050
IMG (kg/m ²)	0,24	-0,81;1,25	0,39	-0,67;1,12	0,951
IMM (kg/m ²)	-0,30	-0,54;0,39	-0,01	-0,66;0,43	0,845
GC (%)	0,55	-1,18;2,42	1,01	-1,63;1,89	0,608
Fibrose hepática (kPa)	0,45	1,02;1,72	0,10	-1,12;0,52	0,160
CAP (dB/m)	-3,0	-29,5;38,75	3,0	-16,0;22,75	0,786
COL (mg/dL)	-9,50	-23,50;17,50	12,0	-10,0;28,0	0,252
TG (mg/dL)	-7,0	-62,0;17,0	-8,0	-42,0;14,0	0,893
LDL (mg/dL)	-2,0	-15,0;29,25	14,0	-11,0;25,95	0,443
HDL (mg/dL)	-0,5	-3,0;1,0	-0,50	-4,75;9,0	0,806
Glicemia de jejum (mg/dL)	-10,50	-43,25;12,25	-5,0	-10,0;5,0	0,568
Insulina de jejum (μUI/mL)	3,50	-3,70;11,65	1,20	-4,07;4,37	0,409
HOMA-IR	-0,22	-1,92;1,52	-0,18	-1,92;1,00	0,686
HbA1C (%)	0,00	-0,62;0,30	0,00	-0,40;0,30	0,667
AST (U/L)	-1,0	-4,0;1,0	0,00	-2,0;6,50	0,152
ALT (U/L)	-2,0	-6,0;5,0	2,0	-2,0;11,0	0,215
FAL (U/L)	4,50	-9,25;10,0	-1,50	-6,0;4,50	0,241
GGT (U/L)	2,0	-9,0;10,75	0,00	-10,0;5,75	0,641
PCR (mg/dL)	-0,20	-1,5;0,90	0,25	-1,50;1,02	0,715
FIB4	-0,02	-0,08;0,15	-0,005	-1,70;0,21	0,676
FLI	-2,0	-5,75;8,75	0,00	-6,0;5,0	0,917
NFS	-0,15	-0,68;0,14	-0,03	-0,27;0,90	0,146
FAST score	-0,02	-0,08;0,07	0,00	-0,03;0,10	0,318
Steato-ELSA	0,02	-0,08;0,07	-0,02	-0,07;0,02	0,424

miR-122	-0,001	-1126;0,132	-0,02	-8584;0,03	0,435
---------	--------	-------------	-------	------------	-------

Os dados são medianas e IIQ. O teste de Mann Whitney foi utilizado para variáveis numéricas. Diferença entre o grupo controle e AGPI n-3: $p \leq 0,05$. Abreviaturas: AG, ácidos graxos; AGS, ácidos graxos saturados; AGMI, ácidos graxos monoinsaturados; EPA, eicosapentaenoico; DPA, docosapentaenoico; DHA, docosahexaenoico; AGPI, ácidos graxos poli-insaturados. IMC, índice de massa corporal; PC, perímetro da cintura; IMG, índice de massa de gordura; IMM, índice de massa magra; GC, gordura corporal; CAP, parâmetro de atenuação controlada; kPa, quilopascal; COL, colesterol total; TG, triglicerídeos; LDL, lipoproteína de baixa densidade; HDL, lipoproteína de alta densidade; HOMA-IR, modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina; HbA1c, Hemoglobina glicada; AST, aspartato transaminase; ALT, alanina transaminase; FAL, fosfatase alcalina, GGT, gama-glutamil transferase; PCR, proteína C reativa; FIB4, Fibrosis-4 score; FLI, Fatty Liver Index; NFS, NAFLD Fibrosis Score; ; FAST score, FibroScan-AST score; Steato-ELSA, Steato-Estudo Longitudinal Brasileiro de Saúde do Adulto; miR-122; microRNA 122.

4. Discussão

No presente estudo, observou-se que nos pacientes que receberam a suplementação com AGPI n-3 em EPA houve maior enriquecimento percentual de DPA, ácido graxo ômega-3 de cadeia longa intermediário entre o EPA e o DHA na via metabólica, e aumento do índice ômega, além de redução significativa do percentual do AGS mirístico nos glóbulos vermelhos. Além disso, observou-se aumento da força muscular comparado ao grupo controle após 6 meses de tratamento. No entanto, a suplementação com AGPI n-3 rico em EPA não foi capaz de modificar a expressão relativa do miR-122 e melhorar os graus de fibrose e esteatose hepáticas em pacientes com MASLD.

O aumento no percentual de enriquecimento do AGPI n-3 DPA no grupo n-3 após 6 meses de tratamento sugere adesão ao protocolo de suplementação. O DPA é sintetizado a partir do EPA em uma reação que envolve as enzimas elongase e delta 6-desaturase e, então, convertido a DHA (43). Em linha com nosso estudo, Murali et al demonstraram que enquanto a suplementação com DHA resulta em enriquecimento predominante de DHA, o uso do EPA leva ao enriquecimento em DPA e EPA (44). Também foi previamente demonstrado que a interconversão de EPA e DPA ocorre rapidamente e a concentração desses dois AGs está associada enquanto a síntese de DHA a partir do DPA é limitada (45). O DPA é precursor de resolvinas e protectinas e, portanto, pode apresentar importante atividade biológica na resolução da inflamação (11) levando a efeitos favoráveis do DPA em desordens metabólicas, inclusive na MASLD. Nesse sentido, o aumento da concentração de DPA esteve associada à redução da esteatose hepática (46), associação inversa com a concentração plasmática de triglicerídeos e PCR (11) e, ainda, melhora de marcadores cardiometabólicos (47) e redução de mortes por doenças cardíacas coronarianas(48).

O aumento significativamente maior do índice ômega no grupo n-3 em comparação ao controle encontrado em nosso estudo reflete efeito da suplementação com AGPI n-3 rico em EPA. O índice ômega é a porcentagem de EPA + DHA na membrana de eritrócitos e é considerado um marcador da ingestão de AGPI n-3 de longo prazo e um biomarcador preditor por morte em indivíduos com doença cardíaca coronariana (49). O índice ômega foi avaliado em outros estudos de suplementação de AGPI n-3 em pacientes com DHGNA como marcador da adesão da suplementação e dos efeitos positivos desses AGPI n-3 na doença hepática como melhora do perfil lipídico, resistência à insulina, esteatose e fibrose hepáticas (23,50–52).

A redução significativa do percentual de enriquecimento em eritrócitos do AGS mirístico ao final de 6 meses de tratamento no grupo n-3, redução que foi significativamente maior no grupo intervenção comparado ao controle, demonstra efeito protetor da suplementação com AGPI n-3 rico em EPA uma vez que o AG mirístico é um AGS associado a progressão da doença hepática (53). Os AGPI n-3 presentes no óleo de peixe podem modificar a expressão hepática de genes de enzimas relacionadas ao metabolismo lipídico (elongases e dessaturases), alterando a síntese endógena e refletindo em alterações na concentração plasmática de AG (54). O AGS mirístico é um preditor da esteatohepatite não alcoólica e potencializa os efeitos lipotóxicos do ácido palmítico que participa da lipogênese *de novo*, uma das vias de acúmulo de triglicerídeos em hepatócitos, e é o ácido graxo mais citotóxico para o fígado, associado a lesão e morte celular (53,55–57).

A redução dos AGS palmítico e esteárico nos grupos n-3 e controle encontrada em nosso estudo é protetora para a progressão da doença, uma vez que maiores concentrações desses AGs foram associadas ao maior grau de fibrose hepática (9). Diferente dos nossos achados, Parker et al. não encontraram diferença significativa da concentração de AGS em eritrócitos entre o início e o final do tratamento de 12 semanas com óleo de peixe ou óleo de oliva (controle) em homens com sobrepeso, porém a dose do óleo de peixe ou placebo neste estudo (1,7g/dia, sendo 588 mg de EPA e 412 mg de DHA) foi inferior a utilizada em nosso trabalho (4g) (58). Uma vez que apenas 15% dos AG circulantes são derivados da dieta(59), nossa hipótese é que a redução dos AGS nos grupos controle e n-3 pode indicar alteração do metabolismo endógeno promovido por ambos os suplementos, com efeito favorável adicional do AGPI n-3 que também reduziu o percentual do ácido mirístico.

Em nosso estudo, a suplementação com AGPI n-3 rico em EPA aumentou

significativamente a força muscular de pacientes com MASLD comparado ao controle. Embora não tenham sido encontrados estudos que tenham avaliado o efeito do óleo de peixe sobre a força muscular em pacientes com MASLD ou DHGNA, a associação da redução da força muscular e sarcopenia com pior prognóstico, fibrose hepática significativa e aumento da mortalidade nesses pacientes já foi previamente descrito(60,61). A avaliação da força muscular em pacientes com MASLD é um dado relevante e estratégias terapêuticas que possam melhorar esse parâmetro, como demonstrado com a suplementação com AGPI n-3, podem ter efeito positivo no desfecho clínico desses indivíduos. Em linha com nosso estudo, Santo Andre et al. encontraram em metanálise publicada em 2023 que a suplementação de n-3 foi associada ao aumento da força muscular, sem alteração da massa, em indivíduos adultos e idosos (62). Alkhedhairi et al. suplementaram 4g/dia de AGPI n-3 do óleo de krill por 6 meses e encontraram aumento da força muscular pela avaliação força de preensão em indivíduos idosos(63). É possível que o efeito do n-3 se deva à sua propriedade anti-inflamatória (63,64) uma vez que o estado inflamatório de baixo grau presente em determinadas doenças e no processo de envelhecimento está associado à redução da força e da massa muscular(65). Além disso, os AGPI n-3 podem estimular a biogênese mitocondrial muscular e reduzir o conteúdo total de triglicérides musculares e intramiocelulares, modificando a fibra e melhorando a função muscular(66).

Nosso estudo não encontrou efeito do AGPI n-3 rico em EPA na fibrose e esteatose hepáticas, em contraste com outros trabalhos (23,50,51,67). O EPA e o DHA tem diferentes mecanismos de ação e o DHA parece ser mais efetivo em melhorar a resistência à insulina e reduzir a síntese hepática de lipídeos, por meio da supressão da enzima ácido graxo sintetase, prevenindo assim acúmulo de lipídeos nos hepatócitos e a progressão da doença hepática em ratos (68). Corroborando com esse achado, Depner et al. também concluíram, em animais, que o DHA foi mais efetivo que o EPA em reduzir a inflamação, estresse oxidativo, fibrose e dano hepático(69). Em humanos com DHGNA, o estudo WELCOME demonstrou associação entre a redução da esteatose hepática, avaliada por ressonância magnética, e o percentual de enriquecimento de DHA em eritrócitos, mas não de EPA (23). Em linha, Hodson et al. encontraram modificações favoráveis na sensibilidade à insulina e no metabolismo hepático de lipídeos, com aumento da oxidação hepática de lipídeos e redução da lipogênese *de novo*, em indivíduos com DHGNA e aumento do enriquecimento de DHA em eritrócitos \geq 2%(70).

Assim, nossa hipótese é que não foram encontrados resultados favoráveis na fibrose ou esteatose hepáticas de paciente com MASLD devido a composição da suplementação (rico em EPA). Estudos anteriores demonstraram que a suplementação de EPA e DHA em proporção mais equilibrada ou com maior proporção de DHA pode ser mais efetivo na melhora da doença hepática. Nesse contexto, Argo et al. suplementaram pacientes com DHGNA com 3g/dia de óleo de peixe (sendo 35% EPA e 25% DHA) por 12 meses e encontraram melhora da esteatose hepática pela ressonância magnética, sem melhora histológica (52). Capanni et al. utilizaram 1g/ dia, sendo EPA/DHA na razão 0,9/1,5, por 12 meses e Nogueira et al. suplementaram 0,945mg/dia (sendo 16% EPA e 21% DHA) por 6 meses e encontraram melhora histológica, de triglicerídeos, enzimas hepáticas, glicemia de jejum e da ecogenicidade e índice de perfusão doppler pelo ultrassom em pacientes com DHGNA (51,67). Corroborando com esses dados, Cansação et al. suplementaram 3g/dia de óleo de peixe com 80% DHA e 20% EPA por 6 meses e encontraram melhora na fibrose hepática de pacientes com DHGNA (50).

Este foi o primeiro ensaio clínico com AGPI n-3 rico em EPA que avaliou a modificação na expressão relativa do miR-122 e o segundo estudo em humanos com DHGNA que avaliou o efeito da suplementação de AGPI n-3 sob o miR-122. Nós não encontramos efeito do AGPI n-3 rico em EPA na modulação do miR-122 após 6 meses de suplementação. Em linha, Cansação et al. não encontraram modificação do miR-122 após suplementação com óleo de peixe rico em DHA em pacientes com DHGNA. Por outro lado, Baselga-Escudero encontraram redução da expressão do miR-122 após suplementação com óleo de peixe rico em DHA em ratos com obesidade e dislipidemia, no entanto, o miR-122 foi avaliado em tecido hepático (71) e, em nosso trabalho e no Cansação et al., a avaliação da expressão relativa do miR-122 foi realizada em plasma, o que pode contribuir para justificar as divergências encontradas. Em humanos, enquanto a concentração sérica do miR-122 parece estar aumentada em pacientes com DHGNA e positivamente associada à progressão da doença, a expressão desse miRNA parece estar reduzida no parênquima hepático desses pacientes em comparação a indivíduos saudáveis(15,72,73).

Nosso estudo tem pontos fortes e limitações. Como limitação, apontamos o uso da EHT (Fibroscan®) para avaliação da fibrose e esteatose hepáticas. Embora a avaliação pelo Fibroscan® seja indicada para pacientes com MASLD (74), o mesmo não é considerado padrão ouro, como biópsia (3) e a maior parte dos estudos publicados que

avaliaram melhora dos graus de esteatose e fibrose em pacientes suplementados com n-3 utilizaram biópsia ou ressonância magnética. Como ponto forte, ressalta-se que o presente estudo é o primeiro ensaio clínico brasileiro randomizado duplo cego e controlado que avaliou os efeitos do n-3 rico em EPA em indivíduos com MASLD. Até o momento, não existem medicamentos aprovados para tratar a MASLD e é importante que o paciente siga o tratamento clínico para as comorbidades metabólicas associadas. O padrão-ouro é a mudança de estilo de vida com intervenção dietética e atividade física(3). Assim, o presente estudo pode contribuir com evidências sobre opções de tratamento para MASLD, norteadas acerca da composição ideal (EPA e DHA) do óleo de peixe para um efeito positivo sobre fibrose e esteatose. Além disso, apenas um estudo piloto havia avaliado até o momento a modulação do miR-122 por n-3 rico em DHA nesses pacientes com DHGNA (50) e não foram encontrados estudos que avaliaram o efeito do suplemento rico em EPA sobre a força muscular de pacientes com MASLD.

Como conclusão, nosso estudo evidenciou que a suplementação com AGPI n-3 rico EPA pode aumentar o percentual de enriquecimento de eritrócitos de DPA e o índice ômega em comparação ao controle após 6 meses de tratamento sugerindo adesão ao uso da suplementação. Além disso, o grupo n-3 apresentou redução do percentual de AGS mirístico e aumento da força muscular. No entanto, não foi observada melhora dos graus de fibrose e esteatose hepáticos e modificação da expressão relativa de miR-122 em indivíduos com MASLD.

Referências

1. Rinella ME, Lazarus J V., Ratziu V, Francque SM, Sanyal AJ, Kanwal F, et al. A multi-society Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature. *Ann Hepatol* [Internet]. 2023 Jun;101133. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1665268123002375>
2. Bellentani S. The epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* 2017;37(October 2016):81–4.
3. Rinella ME, Neuschwander-Tetri BA, Siddiqui MS, Abdelmalek MF, Caldwell S, Barb D, et al. AASLD Practice Guidance on the clinical assessment and management of nonalcoholic fatty liver disease. Vol. 77, *Hepatology*. 2023. 1797–1835 p.
4. Kalligeros M, Vassilopoulos A, Vassilopoulos S, Victor DW, Mylonakis E, Nouredin M. Prevalence of Steatotic Liver Disease (MASLD, MetALD, and ALD) in the United States: NHANES 2017–2020. *Clin Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2023 Nov;

- Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S154235652300914X>
5. Arora U, Biswas S, Aggarwal S, Duseja A, Shalimar. MASLD screening and diagnostic algorithms are interchangeable from existing NAFLD literature. *J Hepatol* [Internet]. 2023 Nov; Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827823052327>
 6. Rinella ME, Lazarus J V., Ratziu V, Francque SM, Sanyal AJ, Kanwal F, et al. A multi-society Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature. *J Hepatol*. 2023;
 7. Aryal B, Singh AK, Rotllan N, Price N, Fernández-Hernando C. MicroRNAs and lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol* [Internet]. 2017 Jun;28(3):273–80. Available from: <https://journals.lww.com/00041433-201706000-00009>
 8. Puri P, Wiest MM, Cheung O, Mirshahi F, Sargeant C, Min H-K, et al. The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* [Internet]. 2009 Dec;50(6):1827–38. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.23229>
 9. Cansanção K, Silva Monteiro L, Carvalho Leite N, Dávalos A, Tavares do Carmo M, Arantes Ferreira Peres W. Advanced Liver Fibrosis Is Independently Associated with Palmitic Acid and Insulin Levels in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrients* [Internet]. 2018 Oct 29;10(11):1586. Available from: <http://www.mdpi.com/2072-6643/10/11/1586>
 10. Gentile CL, Frye MA, Pagliassotti MJ. Fatty acids and the endoplasmic reticulum in nonalcoholic fatty liver disease. *BioFactors* [Internet]. 2011 Jan 2;37(1):8–16. Available from: <https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/biof.135>
 11. Calder PC. Health benefits of omega-3 fatty acids. In: *Omega-3 Delivery Systems* [Internet]. Elsevier; 2021. p. 25–53. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128213919000065>
 12. Parker HM, Johnson NA, Burdon CA, Cohn JS, O'Connor HT, George J. Omega-3 supplementation and non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol*. 2012 Apr;56(4).
 13. Lee C-H, Fu Y, Yang S-J, Chi C-C. Effects of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation on Non-Alcoholic Fatty Liver: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* [Internet]. 2020 Sep 11;12(9):2769. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6643/12/9/2769>
 14. Di Minno MND, Russolillo A, Lupoli R, Ambrosino P, Di Minno A, Tarantino G.

- Omega-3 fatty acids for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2012;18(41):5839–47.
15. Afonso MB, Rodrigues PM, Simão AL, Castro RE. Circulating microRNAs as potential biomarkers in non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma. *J Clin Med.* 2016;5(3).
 16. Atic AI, Thiele M, Munk A, Dalgaard LT. Circulating miRNAs associated with nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Physiol Physiol* [Internet]. 2023 Feb 1;324(2):C588–602. Available from: <https://journals.physiology.org/doi/10.1152/ajpcell.00253.2022>
 17. DiStefano JK, Gerhard GS. Circulating microRNAs in nonalcoholic fatty liver disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2016 Feb 15;10(2):161–3. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/17474124.2016.1125290>
 18. Pasco JA, Sui SX, West EC, Anderson KB, Rufus-Membere P, Tembo MC, et al. Fatty Liver Index and Skeletal Muscle Density. *Calcif Tissue Int* [Internet]. 2022 Jun 13;110(6):649–57. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s00223-021-00939-9>
 19. Gan D, Wang L, Jia M, Ru Y, Ma Y, Zheng W, et al. Low muscle mass and low muscle strength associate with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Nutr* [Internet]. 2020 Apr;39(4):1124–30. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0261561419301992>
 20. Kim D, Wijarnprecha K, Sandhu KK, Cholankeril G, Ahmed A. Sarcopenia in nonalcoholic fatty liver disease and all-cause and cause-specific mortality in the United States. *Liver Int* [Internet]. 2021 Aug 11;41(8):1832–40. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/liv.14852>
 21. Smith GI, Jullian S, Reeds DN, Sinacore DR, Klein S, Mittendorfer B. Fish oil–derived n–3 PUFA therapy increases muscle mass and function in healthy older adults. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2015 Jul;102(1):115–22. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002916523277539>
 22. Barroso LN, Salarini J, Leite NC, Villela-Nogueira CA, Dávalos A, Carmo M das GT, et al. Effect of fish oil supplementation on the concentration of miRNA-122, FGF-21 and liver fibrosis in patients with NAFLD: Study protocol for a randomized, double-blind and placebo-controlled clinical trial. *Clin Nutr ESPEN* [Internet]. 2023 Oct;57:117–25. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405457723001766>

23. Scorletti E, Bhatia L, McCormick KG, Clough GF, Nash K, Hodson L, et al. Effects of purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in nonalcoholic fatty liver disease: Results from the WELCOME* study. *Hepatology*. 2014 Oct;60(4).
24. Broekhuysen RM. Long-term storage of erythrocytes for quantitative analyses of lipids. *Clin Chim Acta* [Internet]. 1974 Apr;52(1):53–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0009898174903878>
25. American Oil Chemists Society (AOCS). Official Method Ce 2c-11. Direct Methylation of Lipids in Foods by Acid-Alkal. *Off Methods Recomm Pract AOCS*; AOCS. 2017;
26. Assumpção RP, Mucci DB, Fonseca FCP, Marcondes H, Sardinha FLC, Citelli M, et al. Fatty acid profile of maternal and fetal erythrocytes and placental expression of fatty acid transport proteins in normal and intrauterine growth restriction pregnancies. *Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids* [Internet]. 2017 Oct;125:24–31. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0952327817300315>
27. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* [Internet]. 2001 Dec;25(4):402–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202301912629>
28. GOMEZ-DOMINGUEZ E, MENDOZA J, RUBIO S, MORENO-MONTEAGUDO JA, GARCIA-BUEY L, MORENO-OTERO R. Transient elastography: a valid alternative to biopsy in patients with chronic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet]. 2006 Aug;24(3):513–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2036.2006.02999.x>
29. de Lédinghen V, Vergniol J. Transient elastography (FibroScan). *Gastroenterol Clin Biol* [Internet]. 2008;32(6 SUPPL. 1):58–67. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0399-8320\(08\)73994-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0399-8320(08)73994-0)
30. Zhang X, Wong GLH, Wong VWS. Application of transient elastography in nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Mol Hepatol*. 2020;26(2):128–41.
31. LOHMAN TG., ROCHE AF., MARTORELL R. Anthropometric standardization reference manual. Champaign Hum Kinet Books. 1988;
32. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Geneva, Switz World Heal Organ. 2000;
33. Ben-Noun LL, Sohar E, Laor A. Neck Circumference as a Simple Screening Measure for Identifying Overweight and Obese Patients. *Obes Res* [Internet]. 2001 Aug;9(8):470–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1038/oby.2001.61>
34. Kyle UG, Bosaeus I, De Lorenzo AD, Deurenberg P, Elia M, Gómez JM, et al.

- Bioelectrical impedance analysis - Part II: Utilization in clinical practice. *Clin Nutr*. 2004;23(6):1430–53.
35. Lukaski HC, Bolonchuk WW, Hall CB, Siders WA. Validation of tetrapolar bioelectrical impedance method to assess human body composition. *J Appl Physiol* [Internet]. 1986 Apr 1;60(4):1327–32. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/jappl.1986.60.4.1327>
 36. BIODYNAMICS®. Manual de instrução: Monitor de composição corporal BIODYNAMICS, Modelo 310e, Versão 8.01 – Internacional. Biodynamics Corporation. 1994;
 37. Kyle UG, Schutz Y, Dupertuis YM, Pichard C. Body composition interpretation: Contributions of the fat-free mass index and the body fat mass index. *Nutrition*. 2003;19(7–8):597–604.
 38. Roberts HC, Denison HJ, Martin HJ, Patel HP, Syddall H, Cooper C, et al. A review of the measurement of grip strength in clinical and epidemiological studies: towards a standardised approach. *Age Ageing* [Internet]. 2011 Jul;40(4):423–9. Available from: <https://academic.oup.com/ageing/article-lookup/doi/10.1093/ageing/afr051>
 39. Moshfegh AJ, Rhodes DG, Baer DJ, Murayi T, Clemens JC, Rumpler W V., et al. The US Department of Agriculture Automated Multiple-Pass Method reduces bias in the collection of energy intakes. *Am J Clin Nutr*. 2008;88(2):324–32.
 40. Universidade de São Paulo (USP). Food Research Center (FoRC). Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TBCA). Versão 71 São Paulo, 2020.
 41. CRAIG CL, MARSHALL AL, SJOSTROM M, BAUMAN AE, BOOTH ML, AINSWORTH BE, et al. International Physical Activity Questionnaire: 12-Country Reliability and Validity. *Med Sci Sport Exerc* [Internet]. 2003 Aug;35(8):1381–95. Available from: <http://journals.lww.com/00005768-200308000-00020>
 42. Capanni M, Calella F, Biagini MR, Genise S, Raimondi L, Bedogni G, et al. Prolonged n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation ameliorates hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease: A pilot study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006;23(8):1143–51.
 43. Duan J, Song Y, Zhang X, Wang C. Effect of ω -3 Polyunsaturated Fatty Acids-Derived Bioactive Lipids on Metabolic Disorders. *Front Physiol* [Internet]. 2021 May 25;12. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2021.646491/full>
 44. Murali G, Desouza C V., Clevenger ME, Ramalingam R, Saraswathi V. Differential effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in promoting the

- differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids* [Internet]. 2014 Jan;90(1):13–21. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0952327813002093>
45. Richter CK, Skulas-Ray AC, Kris-Etherton PM. Recommended Intake of Fish and Fish Oils Worldwide. In: *Fish and Fish Oil in Health and Disease Prevention* [Internet]. Elsevier; 2016. p. 27–48. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128028445000038>
 46. Maciejewska D. Fatty acid changes help to better understand regression of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2015;21(1):301. Available from: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v21/i1/301.htm>
 47. Li K, Sinclair AJ, Zhao F, Li D. Uncommon Fatty Acids and Cardiometabolic Health. *Nutrients* [Internet]. 2018 Oct 20;10(10):1559. Available from: <http://www.mdpi.com/2072-6643/10/10/1559>
 48. Mozaffarian D, Lemaitre RN, King IB, Song X, Huang H, Sacks FM, et al. Plasma Phospholipid Long-Chain ω -3 Fatty Acids and Total and Cause-Specific Mortality in Older Adults. *Ann Intern Med* [Internet]. 2013 Apr 2;158(7):515. Available from: <http://annals.org/article.aspx?doi=10.7326/0003-4819-158-7-201304020-00003>
 49. Harris WS, von Schacky C. The Omega-3 Index: a new risk factor for death from coronary heart disease? *Prev Med (Baltim)* [Internet]. 2004 Jul;39(1):212–20. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091743504000878>
 50. Cansanção K, Citelli M, Leite NC, de las Hazas MCL, Dávalos A, Do Carmo MDGT, et al. Impact of long-term supplementation with fish oil in individuals with non-alcoholic fatty liver disease: A double blind randomized placebo controlled clinical trial. *Nutrients*. 2020;12(11):1–12.
 51. Nogueira MA, Oliveira CP, Ferreira Alves VA, Stefano JT, Rodrigues LS dos R, Torrinhas RS, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids in treating non-alcoholic steatohepatitis: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Nutr*. 2016;35(3):578–86.
 52. Argo CK, Patrie JT, Lackner C, Henry TD, de Lange EE, Weltman AL, et al. Effects of n-3 fish oil on metabolic and histological parameters in NASH: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Hepatol* [Internet]. 2015 Jan;62(1):190–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827814006242>
 53. Martínez L, Torres S, Baulies A, Alarcón-Vila C, Elena M, Fabriàs G, et al. Myristic acid potentiates palmitic acid-induced lipotoxicity and steatohepatitis associated with

- lipodystrophy by sustaining de novo ceramide synthesis. *Oncotarget* [Internet]. 2015 Dec 8;6(39):41479–96. Available from: <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.6286>
54. Weiss-Hersh K, Garcia AL, Marosvölgyi T, Szklenár M, Decsi T, Rühl R. Saturated and monounsaturated fatty acids in membranes are determined by the gene expression of their metabolizing enzymes SCD1 and ELOVL6 regulated by the intake of dietary fat. *Eur J Nutr* [Internet]. 2020 Sep 1;59(6):2759–69. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00394-019-02121-2>
55. Tomita K, Teratani T, Yokoyama H, Suzuki T, Irie R, Ebinuma H, et al. Plasma Free Myristic Acid Proportion Is a Predictor of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Dig Dis Sci* [Internet]. 2011 Oct 23;56(10):3045–52. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10620-011-1712-0>
56. Arain SQ, Talpur FN, Channa NA, Ali MS, Afridi HI. Serum lipid profile as a marker of liver impairment in hepatitis B Cirrhosis patients. *Lipids Health Dis* [Internet]. 2017 Dec 1;16(1):51. Available from: <http://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12944-017-0437-2>
57. Kawano Y, Cohen DE. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* [Internet]. 2013 Apr 9;48(4):434–41. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s00535-013-0758-5>
58. Parker HM, Cohn JS, O’connor HT, Garg ML, Caterson ID, George J, et al. Effect of fish oil supplementation on hepatic and visceral fat in overweight men: A randomized controlled trial. *Nutrients*. 2019;11(2):1–15.
59. Vergani L. Fatty Acids and Effects on In Vitro and In Vivo Models of Liver Steatosis. *Curr Med Chem* [Internet]. 2019 Sep 12;26(19):3439–56. Available from: <http://www.eurekaselect.com/152539/article>
60. Charatcharoenwitthaya P, Karaketklang K, Aekplakorn W. Muscle strength, but not body mass index, is associated with mortality in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* [Internet]. 2022 Oct 26;13(5):2393–404. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcsm.13001>
61. Zhao Q, Yin Y, Deng Y. Metabolic associated fatty liver disease and sarcopenia additively increase mortality: a real-world study. *Nutr Diabetes*. 2023;13(1):1–7.
62. Santo André HC, Esteves GP, Barreto GHC, Longhini F, Dolan E, Benatti FB. The Influence of n-3PUFA Supplementation on Muscle Strength, Mass, and Function: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Adv Nutr* [Internet]. 2023 Jan;14(1):115–27.

- Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S216183132201314X>
63. Alkhedhairi SA, Aba Alkhayl FF, Ismail AD, Rozendaal A, German M, MacLean B, et al. The effect of krill oil supplementation on skeletal muscle function and size in older adults: A randomised controlled trial. *Clin Nutr* [Internet]. 2022 Jun;41(6):1228–35. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0261561422001194>
 64. Calder PC. n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2006 Jun 1;83(6):1505S-1519S. Available from: <https://academic.oup.com/ajcn/article/83/6/1505S/4633275>
 65. Dalle S, Rossmeislova L, Koppo K. The Role of Inflammation in Age-Related Sarcopenia. *Front Physiol* [Internet]. 2017 Dec 12;8. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2017.01045/full>
 66. Vaughan RA, Garcia-Smith R, Bisoffi M, Conn CA, Trujillo KA. Conjugated linoleic acid or omega 3 fatty acids increase mitochondrial biosynthesis and metabolism in skeletal muscle cells. *Lipids Health Dis* [Internet]. 2012 Dec 30;11(1):142. Available from: <https://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-511X-11-142>
 67. CAPANNI M, CALELLA F, BIAGINI MR, GENISE S, RAIMONDI L, BEDOGNI G, et al. Prolonged n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation ameliorates hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a pilot study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006 Apr;23(8).
 68. Hong L, Zahradka P, Cordero-Monroy L, Wright B, Taylor CG. Dietary docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) operate by different mechanisms to modulate hepatic steatosis and hyperinsulemia in fa/fa Zucker rats. *Nutrients*. 2019;11(4).
 69. Depner CM, Philbrick KA, Jump DB. Docosahexaenoic Acid Attenuates Hepatic Inflammation, Oxidative Stress, and Fibrosis without Decreasing Hepatosteatosis in a Ldlr Mouse Model of Western Diet-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis. *J Nutr* [Internet]. 2013 Mar;143(3):315–23. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022316622011312>
 70. Hodson L, Bhatia L, Scorletti E, Smith DE, Jackson NC, Shojaee-Moradie F, et al. Docosahexaenoic acid enrichment in NAFLD is associated with improvements in hepatic metabolism and hepatic insulin sensitivity: A pilot study. *Eur J Clin Nutr* [Internet]. 2017;71(8):973–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ejcn.2017.9>
 71. Baselga-Escudero L, Arola-Arnal A, Pascual-Serrano A, Ribas-Latre A, Casanova E, Salvadó M-J, et al. Chronic Administration of Proanthocyanidins or Docosahexaenoic

- Acid Reverses the Increase of miR-33a and miR-122 in Dyslipidemic Obese Rats. *PLoS One*. 2013 Jul 26;8(7).
72. Cermelli S, Ruggieri A, Marrero JA, Ioannou GN, Beretta L. Circulating MicroRNAs in Patients with Chronic Hepatitis C and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. Tavis JE, editor. *PLoS One* [Internet]. 2011 Aug 23;6(8):e23937. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0023937>
 73. Baranova A, Maltseva D, Tonevitsky A. Adipose may actively delay progression of NAFLD by releasing tumor-suppressing, anti-fibrotic miR-122 into circulation. *Obes Rev*. 2019;20(1):108–18.
 74. Cardoso AC, A. Villela-Nogueira C, de Figueiredo-Mendes C, Leão Filho H, Pinto Silva RA, Valle Tovo C, et al. Brazilian Society of Hepatology and Brazilian College of Radiology practice guidance for the use of elastography in liver diseases. *Ann Hepatol*. 2021;22.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Houve adesão ao protocolo de intervenção e isso foi identificado devido ao aumento do percentual de DPA e do índice ômega no grupo que recebeu o suplemento de AGPI n-3 enquanto as concentrações desses marcadores não se modificaram no grupo controle. A suplementação com AGPI n-3 em EPA promove a melhora do perfil lipídico em eritrócitos e aumenta a força muscular de pacientes com MASLD podendo contribuir como estratégia terapêutica adjuvante para o tratamento da sarcopenia, condição que se associa a piores desfechos clínicos em pacientes com doença hepática crônica.

A suplementação com AGPI n-3 não modificou a expressão do miR-122 avaliada no plasma e não melhorou a esteatose e a fibrose hepáticas em pacientes com MASLD e, portanto, sugerimos mais estudos, com outras composições de suplemento (proporções de EPA e DHA), dose e tempo de tratamento que avaliem o efeito AGPI n-3 nos desfechos clínicos de pacientes com MASLD e, ainda, outros miRNAs como alvos terapêuticos.

REFERÊNCIAS

ABENAVOLI, L. et al. Olive oil antioxidants and non-alcoholic fatty liver disease. **Expert Review of Gastroenterology and Hepatology**, v. 13, n. 8, p. 739–749, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/17474124.2019.1634544>>.

AFONSO, M. B. et al. Circulating microRNAs as potential biomarkers in non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma. **Journal of Clinical Medicine**, v. 5, n. 3, 2016.

AKUTA, N. et al. Analysis of association between circulating miR-122 and histopathological features of nonalcoholic fatty liver disease in patients free of hepatocellular carcinoma. **BMC Gastroenterology**, v. 16, n. 1, p. 1–9, 2016a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12876-016-0557-6>>.

AKUTA, N. et al. Impact of circulating miR-122 for histological features and hepatocellular carcinoma of nonalcoholic fatty liver disease in Japan. **Hepatology International**, v. 10, n. 4, p. 647–656, 2016b.

ALBRACHT-SCHULTE, K. et al. Eicosapentaenoic acid improves hepatic metabolism and reduces inflammation independent of obesity in high-fat-fed mice and in HepG2 cells. **Nutrients**, v. 11, n. 3, 2019.

ALKHEDHAIRI, S. A. et al. The effect of krill oil supplementation on skeletal muscle function and size in older adults: A randomised controlled trial. **Clinical Nutrition**, v. 41, n. 6, p. 1228–1235, jun. 2022. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0261561422001194>>.

ALLARD, J. P. et al. Nutritional assessment and hepatic fatty acid composition in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): A cross-sectional study. **Journal of Hepatology**, v. 48, n. 2, p. 300–307, fev. 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827807005855>>.

AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 350–355, 15 set. 2004. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature02871>>.

AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY (AOCS). Official Method Ce 2c-11. Direct Methylation of Lipids in Foods by Acid-Alkal. **In Official Methods and Recommended Practices of the AOCS; AOCS**, 2017.

ANGULO, P. et al. The NAFLD fibrosis score: A noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. **Hepatology**, v. 45, n. 4, p. 846–854, 2007.

ARAIN, S. Q. et al. Serum lipid profile as a marker of liver impairment in hepatitis B Cirrhosis patients. **Lipids in Health and Disease**, v. 16, n. 1, p. 51, 1 dez. 2017. Disponível em: <<http://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12944-017-0437-2>>.

ARGO, C. K. et al. Effects of n-3 fish oil on metabolic and histological parameters in NASH: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. **Journal of Hepatology**, v. 62, n. 1, p. 190–197, jan. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827814006242>>.

ARORA, U. et al. MASLD screening and diagnostic algorithms are interchangeable from existing NAFLD literature. **Journal of Hepatology**, nov. 2023. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827823052327>>.

ARYAL, B. et al. MicroRNAs and lipid metabolism. **Current Opinion in Lipidology**, v. 28, n. 3, p. 273–280, jun. 2017. Disponível em: <<https://journals.lww.com/00041433-201706000-00009>>.

ASSUMPÇÃO, R. P. et al. Fatty acid profile of maternal and fetal erythrocytes and placental expression of fatty acid transport proteins in normal and intrauterine growth restriction pregnancies. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 125, p. 24–31, out. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0952327817300315>>.

ATIC, A. I. et al. Circulating miRNAs associated with nonalcoholic fatty liver disease. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 324, n. 2, p. C588–C602, 1 fev. 2023. Disponível em: <<https://journals.physiology.org/doi/10.1152/ajpcell.00253.2022>>.

BABOR, T. F.; HIGGINS-BIDDLE, J.C., SAUNDERS, J. B.; MONTEIRO, M. . **World Health Organization. AUDIT: The Alcohol Use Disorders Identification Test: Guidelines for Use in Primary Health Care**. [s.l.: s.n.].

BARANOVA, A.; MALTSEVA, D.; TONEVITSKY, A. Adipose may actively delay progression of NAFLD by releasing tumor-suppressing, anti-fibrotic miR-122 into circulation. **Obesity Reviews**, v. 20, n. 1, p. 108–118, 2019.

BARCELÓ-COBLIJN, G.; MURPHY, E. J. Alpha-linolenic acid and its conversion to longer

chain n-3 fatty acids: Benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels. **Progress in Lipid Research**, v. 48, n. 6, p. 355–374, nov. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163782709000307>>.

BARROSO, L. N. et al. Effect of fish oil supplementation on the concentration of miRNA-122, FGF-21 and liver fibrosis in patients with NAFLD: Study protocol for a randomized, double-blind and placebo-controlled clinical trial. **Clinical Nutrition ESPEN**, v. 57, p. 117–125, out. 2023. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405457723001766>>.

BASELGA-ESCUADERO, L. et al. Chronic Administration of Proanthocyanidins or Docosahexaenoic Acid Reverses the Increase of miR-33a and miR-122 in Dyslipidemic Obese Rats. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, 26 jul. 2013.

BECKER, P. P. et al. Performance of serum microRNAs-122,-192 and-21 as biomarkers in patients with non-Alcoholic steatohepatitis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, p. 1–16, 2015.

BEDOGNI, G. et al. The fatty liver index: A simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. **BMC Gastroenterology**, v. 6, p. 1–7, 2006a.

BEDOGNI, G. et al. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. **BMC Gastroenterology**, v. 6, n. 1, p. 33, 2 dez. 2006b. Disponível em: <<https://bmcgastroenterol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-230X-6-33>>.

BEDOSSA, P. Pathology of non-alcoholic fatty liver disease. **Liver International**, v. 37, n. October 2016, p. 85–89, 2017.

BELLENTANI, S. The epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. **Liver International**, v. 37, n. October 2016, p. 81–84, 2017.

BEN-NOUN, L. L.; SOHAR, E.; LAOR, A. Neck Circumference as a Simple Screening Measure for Identifying Overweight and Obese Patients. **Obesity Research**, v. 9, n. 8, p. 470–477, ago. 2001. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1038/oby.2001.61>>.

BERNÁ, G.; ROMERO-GOMEZ, M. The role of nutrition in non-alcoholic fatty liver disease: Pathophysiology and management. **Liver International**, v. 40, n. S1, p. 102–108, 2020.

BHANJI, R. A. et al. Sarcopenia in hiding: The risk and consequence of underestimating muscle dysfunction in nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, v. 66, n. 6, p. 2055–2065, 30 dez. 2017. Disponível em: <<https://journals.lww.com/01515467-201712000-00036>>.

BIANCO, C. et al. MAFLD vs NAFLD: Let the contest begin! **Liver International**, v. 40, n. 9, p. 2079–2081, 2020.

BIODYNAMICS®. Manual de instrução: Monitor de composição corporal BIODYNAMICS, Modelo 310e, Versão 8.01 – Internacional. Biodynamics Corporation. 1994.

BISCHOFF, S. C. et al. ESPEN practical guideline: Clinical nutrition in liver disease. **Clinical Nutrition**, v. 39, n. 12, p. 3533–3562, dez. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S026156142030457X>>.

BOUTARI, C.; MANTZOROS, C. S. Adiponectin and leptin in the diagnosis and therapy of NAFLD. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 103, p. 154028, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2019.154028>>.

BOZZETTO, L. et al. Liver fat is reduced by an isoenergetic MUFA diet in a controlled randomized study in type 2 diabetic patients. **Diabetes Care**, v. 35, n. 7, p. 1429–1435, 2012.

BRENNA, J. T. Efficiency of conversion of α -linolenic acid to long chain n-3 fatty acids in man. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 5, n. 2, p. 127–132, mar. 2002. Disponível em: <<http://journals.lww.com/00075197-200203000-00002>>.

BROEKHUYSE, R. M. Long-term storage of erythrocytes for quantitative analyses of lipids. **Clinica Chimica Acta**, v. 52, n. 1, p. 53–58, abr. 1974. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0009898174903878>>.

BUGIANESI, E.; MCCULLOUGH, A. J.; MARCHESINI, G. Insulin resistance: A metabolic pathway to chronic liver disease. **Hepatology**, v. 42, n. 5, p. 987–1000, nov. 2005. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.20920>>.

CALDER, P. C. n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, n. 6, p. 1505S-1519S, 1 jun. 2006. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ajcn/article/83/6/1505S/4633275>>.

CALDER, P. C. Fatty acids and inflammation: The cutting edge between food and pharma. **European Journal of Pharmacology**, v. 668, p. S50–S58, set. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299911007825>>.

CALDER, P. C. Very long chain omega-3 (n-3) fatty acids and human health. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 116, n. 10, p. 1280–1300, out. 2014. Disponível

em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ejlt.201400025>>.

CALDER, P. C. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1851, n. 4, p. 469–484, abr. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1388198114001656>>.

CALDER, P. C. Health benefits of omega-3 fatty acids. In: **Omega-3 Delivery Systems**. [s.l.] Elsevier, 2021. p. 25–53.

CANSANÇÃO, K. et al. Advanced Liver Fibrosis Is Independently Associated with Palmitic Acid and Insulin Levels in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Nutrients**, v. 10, n. 11, p. 1586, 29 out. 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2072-6643/10/11/1586>>.

CANSANÇÃO, K. et al. Impact of long-term supplementation with fish oil in individuals with non-alcoholic fatty liver disease: A double blind randomized placebo controlled clinical trial. **Nutrients**, v. 12, n. 11, p. 1–12, 2020.

CAPANNI, M. et al. Prolonged n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation ameliorates hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a pilot study. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 23, n. 8, abr. 2006.

CARDOSO, A. C. et al. Brazilian Society of Hepatology and Brazilian College of Radiology practice guidance for the use of elastography in liver diseases. **Annals of Hepatology**, v. 22, 2021.

CARDOSO, A. C. et al. Validation and Performance of FibroScan®-AST (FAST) Score on a Brazilian Population with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 67, n. 11, p. 5272–5279, 29 nov. 2022. Disponível em: <<https://link.springer.com/10.1007/s10620-021-07363-x>>.

CERMELLI, S. et al. Circulating MicroRNAs in Patients with Chronic Hepatitis C and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. e23937, 23 ago. 2011. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0023937>>.

CHALASANI, N. et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. **Hepatology**, v. 67, n. 1, p. 328–357, 2018.

CHARATCHAROENWITTHAYA, P.; KARAKETKLANG, K.; AEKPLAKORN, W. Muscle strength, but not body mass index, is associated with mortality in patients with non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 13, n. 5, p. 2393–2404, 26 out. 2022. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcsm.13001>>.

CHEN, X. et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. **Cell Research**, v. 18, n. 10, p. 997–1006, 2 out. 2008. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/cr2008282>>.

CHEN, Z. et al. Erythrocyte membrane n-3 polyunsaturated fatty acids are inversely associated with the presence and progression of nonalcoholic fatty liver disease in Chinese adults: a prospective study. **European Journal of Nutrition**, v. 59, n. 3, p. 941–951, 1 abr. 2020. Disponível em: <<https://link.springer.com/10.1007/s00394-019-01953-2>>.

CIONE, E. et al. Quercetin, Epigallocatechin Gallate, Curcumin, and Resveratrol: From Dietary Sources to Human MicroRNA Modulation. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 63, 23 dez. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/25/1/63>>.

COLAK, Y. et al. A Potential Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease with SIRT1 Activators. **Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases**, v. 23, n. 3, p. 311–319, 1 set. 2014. Disponível em: <<https://www.jgld.ro/jgld/index.php/jgld/article/view/1336>>.

CONLON, B. A. et al. Nutritional management of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Nutrients**, v. 5, n. 10, p. 4093–4114, 2013.

CORTEZ-PINTO, HELENA; DE MOURA, MIGUEL CARNEIRO; DAY, C. P. Non-alcoholic steatohepatitis: From cell biology to clinical practice. **Journal of Hepatology**, v. 44, n. 1, 2006.

CRAIG, C. L. et al. International Physical Activity Questionnaire: 12-Country Reliability and Validity. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 35, n. 8, p. 1381–1395, ago. 2003. Disponível em: <<http://journals.lww.com/00005768-200308000-00020>>.

DALLE, S.; ROSSMEISLOVA, L.; KOPPO, K. The Role of Inflammation in Age-Related Sarcopenia. **Frontiers in Physiology**, v. 8, 12 dez. 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2017.01045/full>>.

DAY, C. P.; JAMES, O. F. W. Steatohepatitis: A tale of two “Hits”? **Gastroenterology**, v. 114,

n. 4 I, p. 842–845, 1998.

DE LÉDINGHEN, V.; VERGNIOL, J. Transient elastography (FibroScan). **Gastroenterologie Clinique et Biologique**, v. 32, n. 6 SUPPL. 1, p. 58–67, 2008. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0399-8320\(08\)73994-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0399-8320(08)73994-0)>.

DE ROOS, B.; MAVROMMATIS, Y.; BROUWER, I. A. Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids: new insights into mechanisms relating to inflammation and coronary heart disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 158, n. 2, p. 413–428, set. 2009. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1476-5381.2009.00189.x>>.

DENG, X. et al. Docosahexaenoic acid inhibits proteolytic processing of sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) via activation of AMP-activated kinase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1851, n. 12, p. 1521–1529, dez. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1388198115001614>>.

DEPNER, C. M.; PHILBRICK, K. A.; JUMP, D. B. Docosahexaenoic Acid Attenuates Hepatic Inflammation, Oxidative Stress, and Fibrosis without Decreasing Hepatosteatosis in a Ldlr Mouse Model of Western Diet-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis. **The Journal of Nutrition**, v. 143, n. 3, p. 315–323, mar. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022316622011312>>.

DI MINNO, M. N. D. et al. Omega-3 fatty acids for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 41, p. 5839–5847, 2012.

DISTEFANO, J. K.; GERHARD, G. S. Circulating microRNAs in nonalcoholic fatty liver disease. **Expert Review of Gastroenterology & Hepatology**, v. 10, n. 2, p. 161–163, 15 fev. 2016. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/17474124.2016.1125290>>.

DU PLESSIS, J. et al. Association of Adipose Tissue Inflammation With Histologic Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Gastroenterology**, v. 149, n. 3, p. 635–648.e14, set. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508515007714>>.

DUAN, J. et al. Effect of ω -3 Polyunsaturated Fatty Acids-Derived Bioactive Lipids on Metabolic Disorders. **Frontiers in Physiology**, v. 12, 25 maio 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2021.646491/full>>.

EDDOWES, P. J. et al. Accuracy of FibroScan Controlled Attenuation Parameter and Liver Stiffness Measurement in Assessing Steatosis and Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Gastroenterology**, v. 156, n. 6, p. 1717–1730, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.01.042>>.

ESAU, C. et al. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. **Cell Metabolism**, v. 3, n. 2, p. 87–98, fev. 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413106000295>>.

FIORINO, S. et al. Possible role of tocopherols in the modulation of host microRNA with potential antiviral activity in patients with hepatitis B virus-related persistent infection: a systematic review. **British Journal of Nutrition**, v. 112, n. 11, p. 1751–1768, 14 dez. 2014. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0007114514002839/type/journal_article>.

FOUAD, Y. et al. What's in a name? Renaming 'NAFLD' to 'MAFLD'. **Liver International**, v. 40, n. 6, p. 1254–1261, 2020.

GALLO, A. et al. The Majority of MicroRNAs Detectable in Serum and Saliva Is Concentrated in Exosomes. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. e30679, 9 mar. 2012. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0030679>>.

GAN, D. et al. Low muscle mass and low muscle strength associate with nonalcoholic fatty liver disease. **Clinical Nutrition**, v. 39, n. 4, p. 1124–1130, abr. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0261561419301992>>.

GARIANI, K.; JORNAYVAZ, F. R. Pathophysiology of nash in endocrine diseases. **Endocrine Connections**, v. 10, n. 2, p. R52–R65, 2021.

GENTILE, C. L.; FRYE, M. A.; PAGLIASSOTTI, M. J. Fatty acids and the endoplasmic reticulum in nonalcoholic fatty liver disease. **BioFactors**, v. 37, n. 1, p. 8–16, 2 jan. 2011. Disponível em: <<https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/biof.135>>.

GOMEZ-DOMINGUEZ, E. et al. Transient elastography: a valid alternative to biopsy in patients with chronic liver disease. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 24, n. 3, p. 513–518, ago. 2006. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2036.2006.02999.x>>.

GUO, X.-F. et al. Concentrated fish oil ameliorates non-alcoholic fatty liver disease by regulating fibroblast growth factor 21–adiponectin axis. **Nutrition**, v. 99–100, p. 111659, jul. 2022. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0899900722000727>>.

HARRING, M. et al. Sarcopenia Among Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Is Associated With Advanced Fibrosis. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 21, n. 11, p. 2876–2888.e5, out. 2023. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1542356523001556>>.

HARRIS, W. S.; VON SCHACKY, C. The Omega-3 Index: a new risk factor for death from coronary heart disease? **Preventive Medicine**, v. 39, n. 1, p. 212–220, jul. 2004. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091743504000878>>.

HARRISON, S. A. et al. A blood-based biomarker panel (NIS4) for non-invasive diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis and liver fibrosis: a prospective derivation and global validation study. **The Lancet Gastroenterology & Hepatology**, v. 5, n. 11, p. 970–985, nov. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2468125320302521>>.

HARRISON, S. A.; NEUSCHWANDER-TETRI, B. A. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. **Clinics in Liver Disease**, v. 8, n. 4, p. 861–879, nov. 2004. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1089326104000807>>.

HODSON, L. et al. Docosahexaenoic acid enrichment in NAFLD is associated with improvements in hepatic metabolism and hepatic insulin sensitivity: A pilot study. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 8, p. 973–979, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ejcn.2017.9>>.

HONG, L. et al. Dietary docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) operate by different mechanisms to modulate hepatic steatosis and hyperinsulemia in fa/fa Zucker rats. **Nutrients**, v. 11, n. 4, 2019.

HU, Y. et al. The miR-122 inhibition alleviates lipid accumulation and inflammation in NAFLD cell model. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 127, n. 5, p. 385–389, 3 set. 2021. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13813455.2019.1640744>>.

JENSEN, T. et al. Fructose and sugar: A major mediator of non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of Hepatology**, v. 68, n. 5, maio 2018.

JEYAPAL, S. et al. Substitution of linoleic acid with α -linolenic acid or long chain n-3 polyunsaturated fatty acid prevents Western diet induced nonalcoholic steatohepatitis. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-29222-y>>.

KALLIGEROS, M. et al. Prevalence of Steatotic Liver Disease (MASLD, MetALD, and ALD) in the United States: NHANES 2017–2020. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, nov. 2023. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S154235652300914X>>.

KALOPITAS, G. et al. Impact of Silymarin in individuals with nonalcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. **Nutrition**, v. 83, p. 111092, mar. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0899900720303750>>.

KARLAS, T. et al. Individual patient data meta-analysis of controlled attenuation parameter (CAP) technology for assessing steatosis. **Journal of Hepatology**, v. 66, n. 5, p. 1022–1030, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2016.12.022>>.

KAWANO, Y.; COHEN, D. E. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of Gastroenterology**, v. 48, n. 4, p. 434–441, 9 abr. 2013. Disponível em: <<https://link.springer.com/10.1007/s00535-013-0758-5>>.

KIM, D. et al. Sarcopenia in nonalcoholic fatty liver disease and all-cause and cause-specific mortality in the United States. **Liver International**, v. 41, n. 8, p. 1832–1840, 11 ago. 2021. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/liv.14852>>.

KONTOGIANNI, M. D. et al. Adherence to the Mediterranean diet is associated with the severity of non-alcoholic fatty liver disease. **Clinical Nutrition**, v. 33, n. 4, p. 678–683, 2014.

KRÜTZFELDT, J. et al. Silencing of microRNAs in vivo with ‘antagomirs’. **Nature**, v. 438, n. 7068, p. 685–689, 30 dez. 2005. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature04303>>.

KYLE, U. G. et al. Body composition interpretation: Contributions of the fat-free mass index and the body fat mass index. **Nutrition**, v. 19, n. 7–8, p. 597–604, 2003.

KYLE, U. G. et al. Bioelectrical impedance analysis - Part II: Utilization in clinical practice. **Clinical Nutrition**, v. 23, n. 6, p. 1430–1453, 2004.

LEE, C.-H. et al. Effects of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation on Non-

Alcoholic Fatty Liver: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Nutrients**, v. 12, n. 9, p. 2769, 11 set. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2072-6643/12/9/2769>>.

LI, K. et al. Uncommon Fatty Acids and Cardiometabolic Health. **Nutrients**, v. 10, n. 10, p. 1559, 20 out. 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2072-6643/10/10/1559>>.

LIU, X. L.; CAO, H. X.; FAN, J. G. MicroRNAs as biomarkers and regulators of nonalcoholic fatty liver disease. **Journal of Digestive Diseases**, v. 17, n. 11, p. 708–715, 2016.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202301912629>>.

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

LONARDO, A. et al. History of nonalcoholic fatty liver disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 16, p. 1–38, 2020.

LONG, J. K. et al. MiR-122 promotes hepatic lipogenesis via inhibiting the LKB1/AMPK pathway by targeting Sirt1 in non-alcoholic fatty liver disease. **Molecular Medicine**, v. 25, n. 1, p. 1–13, 2019.

LUKASKI, H. C. et al. Validation of tetrapolar bioelectrical impedance method to assess human body composition. **Journal of Applied Physiology**, v. 60, n. 4, p. 1327–1332, 1 abr. 1986. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/10.1152/jappl.1986.60.4.1327>>.

MACIEJEWSKA, D. Fatty acid changes help to better understand regression of nonalcoholic fatty liver disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 1, p. 301, 2015. Disponível em: <<http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v21/i1/301.htm>>.

MARCHESINI, G. et al. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the Management of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Obesity Facts**, v. 9, n. 2, p. 65–90, 2016.

MARCHISELLO, S. et al. Pathophysiological, molecular and therapeutic issues of nonalcoholic fatty liver disease: An overview. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 8, 2019.

MARTÍNEZ, L. et al. Myristic acid potentiates palmitic acid-induced lipotoxicity and

steatohepatitis associated with lipodystrophy by sustaining de novo ceramide synthesis. **Oncotarget**, v. 6, n. 39, p. 41479–41496, 8 dez. 2015. Disponível em: <<https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.6286>>.

MIKOLASEVIC, I. et al. Transient elastography (FibroScan®) with controlled attenuation parameter in the assessment of liver steatosis and fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease - Where do we stand? **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 32, p. 7236–7251, 2016.

MITCHELL, P. S. et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 30, p. 10513–10518, 29 jul. 2008. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0804549105>>.

MOREIRA, R. O. et al. Brazilian evidence-based guideline for screening, diagnosis, treatment, and follow-up of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) in adult individuals with overweight or obesity: A joint position statement from the Brazilian Societ. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 67, n. 6, 7 dez. 2023. Disponível em: <<https://www.aem-sbem.com/article/brazilian-evidence-based-guideline-for-screening-diagnosis-treatment-and-follow-up-of-metabolic-dysfunction-associated-steatotic-liver-disease-masld-in-adult-individuals-with-overweight-or-obesit/>>.

MOSHFEGH, A. J. et al. The US Department of Agriculture Automated Multiple-Pass Method reduces bias in the collection of energy intakes. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, n. 2, p. 324–332, 2008.

MOZAFFARIAN, D. et al. Plasma Phospholipid Long-Chain ω -3 Fatty Acids and Total and Cause-Specific Mortality in Older Adults. **Annals of Internal Medicine**, v. 158, n. 7, p. 515, 2 abr. 2013. Disponível em: <<http://annals.org/article.aspx?doi=10.7326/0003-4819-158-7-201304020-00003>>.

MURALI, G. et al. Differential effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in promoting the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 90, n. 1, p. 13–21, jan. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0952327813002093>>.

NEWSOME, P. N. et al. FibroScan-AST (FAST) score for the non-invasive identification of patients with non-alcoholic steatohepatitis with significant activity and fibrosis: a prospective

derivation and global validation study. **The Lancet Gastroenterology & Hepatology**, v. 5, n. 4, p. 362–373, abr. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2468125319303838>>.

NOGUEIRA, M. A. et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids in treating non-alcoholic steatohepatitis: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Clinical Nutrition**, v. 35, n. 3, p. 578–586, 2016.

PARENTE, D. B. et al. Higher cut-off values of non-invasive methods might be needed to detect moderate-to-severe steatosis in morbid obese patients: a pilot study. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-71723-2>>.

PARKER, H. M. et al. Omega-3 supplementation and non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Hepatology**, v. 56, n. 4, abr. 2012.

PARKER, H. M. et al. Effect of fish oil supplementation on hepatic and visceral fat in overweight men: A randomized controlled trial. **Nutrients**, v. 11, n. 2, p. 1–15, 2019.

PARTHASARATHY, G.; REVELO, X.; MALHI, H. Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis: An Overview. **Hepatology Communications**, v. 4, n. 4, p. 478–492, 2020.

PASCO, J. A. et al. Fatty Liver Index and Skeletal Muscle Density. **Calcified Tissue International**, v. 110, n. 6, p. 649–657, 13 jun. 2022. Disponível em: <<https://link.springer.com/10.1007/s00223-021-00939-9>>.

PERAZZO, H. et al. Prediction of Liver Steatosis Applying a New Score in Subjects from the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 54, n. 1, p. e1–e10, 2020.

PINHEIRO; ABV. **Tabela para avaliação do consumo alimentar em medidas caseiras**. [s.l.: s.n.]

PIROLA, C. J. et al. Circulating microRNA signature in non-alcoholic fatty liver disease: from serum non-coding RNAs to liver histology and disease pathogenesis. **Gut**, v. 64, n. 5, p. 800–812, maio 2015. Disponível em: <<https://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2014-306996>>.

PURI, P. et al. The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, v. 50, n. 6, p. 1827–1838, dez. 2009. Disponível em:

<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.23229>>.

QIN, Y. et al. Fish oil supplements lower serum lipids and glucose in correlation with a reduction in plasma fibroblast growth factor 21 and prostaglandin E2 in nonalcoholic fatty liver disease associated with hyperlipidemia: A randomized clinical trial. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–13, 2015.

RAITOHARJU, E. et al. Blood hsa-miR-122-5p and hsa-miR-885-5p levels associate with fatty liver and related lipoprotein metabolism—The Young Finns Study. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 38262, 5 dez. 2016. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/srep38262>>.

REZAEI, S. et al. Olive oil lessened fatty liver severity independent of cardiometabolic correction in patients with non-alcoholic fatty liver disease: A randomized clinical trial. **Nutrition**, v. 57, p. 154–161, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.nut.2018.02.021>>.

RICHTER, C. K.; SKULAS-RAY, A. C.; KRIS-ETHERTON, P. M. Recommended Intake of Fish and Fish Oils Worldwide. In: **Fish and Fish Oil in Health and Disease Prevention**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 27–48.

RINELLA, M. E. et al. A multi-society Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature. **Journal of Hepatology**, 2023a.

RINELLA, M. E. et al. **AASLD Practice Guidance on the clinical assessment and management of nonalcoholic fatty liver disease**. [s.l.: s.n.]v. 77

RINELLA, M. E. et al. A multi-society Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature. **Annals of Hepatology**, p. 101133, jun. 2023c. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1665268123002375>>.

ROBERTS, H. C. et al. A review of the measurement of grip strength in clinical and epidemiological studies: towards a standardised approach. **Age and Ageing**, v. 40, n. 4, p. 423–429, jul. 2011. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ageing/article-lookup/doi/10.1093/ageing/afr051>>.

RYAN, M. C. et al. The Mediterranean diet improves hepatic steatosis and insulin sensitivity in individuals with non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of Hepatology**, v. 59, n. 1, p. 138–143, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2013.02.012>>.

SALEM, N. et al. Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. **Lipids**, v. 36, n. 9, p. 945–959, set. 2001. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1007/s11745-001-0805-6>>.

SALVOZA, N. C. et al. Association of circulating serum MIR-34a and MIR-122 with dyslipidemia among patients with non-alcoholic fatty liver disease. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, p. 1–12, 2016.

SANTO ANDRÉ, H. C. et al. The Influence of n-3PUFA Supplementation on Muscle Strength, Mass, and Function: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Advances in Nutrition**, v. 14, n. 1, p. 115–127, jan. 2023. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S216183132201314X>>.

SANYAL, A. J. et al. Endpoints and Clinical Trial Design for. **Hepatology**, v. 54, n. 1, p. 344–353, 2014.

SCORLETTI, E. et al. Design and rationale of the WELCOME trial: A randomised, placebo controlled study to test the efficacy of purified long chain omega-3 fatty treatment in non-alcoholic fatty liver disease. **Contemporary Clinical Trials**, v. 37, n. 2, mar. 2014a.

SCORLETTI, E. et al. Effects of purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in nonalcoholic fatty liver disease: Results from the WELCOME* study. **Hepatology**, v. 60, n. 4, out. 2014b.

SCORLETTI, E.; BYRNE, C. D. Omega-3 Fatty Acids, Hepatic Lipid Metabolism, and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Annual Review of Nutrition**, v. 33, n. 1, p. 231–248, 17 jul. 2013. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-nutr-071812-161230>>.

SHIDFAR, F. et al. The Effects of Extra Virgin Olive Oil on Alanine Aminotransferase, Aspartate Aminotransferase, and Ultrasonographic Indices of Hepatic Steatosis in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Patients Undergoing Low Calorie Diet. **Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 2018, 2018.

SINGH, S. et al. Fibrosis Progression in Nonalcoholic Fatty Liver vs Nonalcoholic Steatohepatitis: A Systematic Review and Meta-analysis of Paired-Biopsy Studies. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 13, n. 4, p. 643–654.e9, abr. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1542356514006028>>.

SMITH, G. I. et al. Fish oil-derived n-3 PUFA therapy increases muscle mass and function in healthy older adults. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 102, n. 1, p. 115–122, jul. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002916523277539>>.

SOFI, F. et al. Effects of a 1-year dietary intervention with n-3 polyunsaturated fatty acid-enriched olive oil on non-alcoholic fatty liver disease patients: A preliminary study. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 61, n. 8, p. 792–802, 2010.

SPADARO, L. et al. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. **Digestive and Liver Disease**, v. 40, n. 3, mar. 2008.

SUN, Y. et al. MicroRNAs as Biomarkers and Therapeutic Targets for Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Narrative Review. **Clinical Therapeutics**, v. 45, n. 3, p. 234–247, mar. 2023. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149291823000371>>.

TAKAMURA, T. et al. Fatty liver as a consequence and cause of insulin resistance. **Endocrine Journal**, v. 59, n. 9, p. 745–763, 2012.

TAKEUCHI, Y. et al. Polyunsaturated Fatty Acids Selectively Suppress Sterol Regulatory Element-binding Protein-1 through Proteolytic Processing and Autoloop Regulatory Circuit. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 15, p. 11681–11691, abr. 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925819406169>>.

TANAKA, N. et al. Highly Purified Eicosapentaenoic Acid Treatment Improves Nonalcoholic Steatohepatitis. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 42, n. 4, abr. 2008.

THAN, N. N.; NEWSOME, P. N. A concise review of non-alcoholic fatty liver disease. **Atherosclerosis**, v. 239, n. 1, p. 192–202, mar. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021915015000301>>.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: The multiple parallel hits hypothesis. **Hepatology**, v. 52, n. 5, p. 1836–1846, 2010.

TOMITA, K. et al. Plasma Free Myristic Acid Proportion Is a Predictor of Nonalcoholic Steatohepatitis. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 56, n. 10, p. 3045–3052, 23 out. 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10620-011-1712-0>>.

TOVO, C. V. et al. Transient hepatic elastography has the best performance to evaluate liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Annals of Hepatology**, v. 18, n. 3, p.

445–449, maio 2019. Disponível

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1665268119300225>>.

TUCKER, B. et al. Fibroblast growth factor 21 in non-alcoholic fatty liver disease. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 101, p. 153994, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2019.153994>>.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (USP). FOOD RESEARCH CENTER (FORC). Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TBCA). **Versão 7.1. São Paulo, 2020.**, [s.d.]

VALLET-PICHARD, A. et al. FIB-4: An inexpensive and accurate marker of fibrosis in HCV infection. comparison with liver biopsy and fibrotest. **Hepatology**, v. 46, n. 1, p. 32–36, jul. 2007. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.21669>>.

VAUGHAN, R. A. et al. Conjugated linoleic acid or omega 3 fatty acids increase mitochondrial biosynthesis and metabolism in skeletal muscle cells. **Lipids in Health and Disease**, v. 11, n. 1, p. 142, 30 dez. 2012. Disponível em: <<https://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-511X-11-142>>.

VERGANI, L. Fatty Acids and Effects on In Vitro and In Vivo Models of Liver Steatosis. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 19, p. 3439–3456, 12 set. 2019. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/152539/article>>.

WANG, H. et al. Fish oil feeding modulates the expression of hepatic MicroRNAs in a western-style diet-induced nonalcoholic fatty liver disease rat model. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.

WEBER, J. A. et al. The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. **Clinical Chemistry**, v. 56, n. 11, p. 1733–1741, 1 nov. 2010. Disponível em: <<https://academic.oup.com/clinchem/article/56/11/1733/5622259>>.

WEISS-HERSH, K. et al. Saturated and monounsaturated fatty acids in membranes are determined by the gene expression of their metabolizing enzymes SCD1 and ELOVL6 regulated by the intake of dietary fat. **European Journal of Nutrition**, v. 59, n. 6, p. 2759–2769, 1 set. 2020. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00394-019-02121-2>>.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. **World Health Organ Tech Rep Ser**, n.

854, p. 1–452, 1995.

WONG, V. W.-S. et al. Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 51, n. 2, p. 454–462, fev. 2010. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.23312>>.

WONG, V. W.-S. et al. Liver Stiffness Measurement Using XL Probe in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **American Journal of Gastroenterology**, v. 107, n. 12, p. 1862–1871, dez. 2012. Disponível em: <<https://journals.lww.com/00000434-201212000-00018>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Obesity: preventing and managing the global epidemic. **Geneva, Switzerland: World Health Organization**, 2000.

YAMADA, H. et al. Associations between circulating microRNAs (miR-21, miR-34a, miR-122 and miR-451) and non-alcoholic fatty liver. **Clinica Chimica Acta**, v. 424, p. 99–103, set. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898113002258>>.

YAN, J. H. et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation and non-alcoholic fatty liver disease: A meta-analysis of randomized controlled trials. **Medicine (United States)**, v. 97, n. 37, p. 1–10, 2018.

YANG, F. et al. Long noncoding RNA high expression in hepatocellular carcinoma facilitates tumor growth through enhancer of zeste homolog 2 in humans. **Hepatology**, v. 54, n. 5, p. 1679–1689, nov. 2011. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.24563>>.

YANG, L. et al. Silibinin improves nonalcoholic fatty liver by regulating the expression of miR-122: An in vitro and in vivo study. **Molecular Medicine Reports**, v. 23, n. 5, p. 1–12, 2021.

YOUNOSSI, Z. M. et al. Diagnostic modalities for nonalcoholic fatty liver disease, nonalcoholic steatohepatitis, and associated fibrosis. **Hepatology**, v. 68, n. 1, p. 349–360, jul. 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.29721>>.

YOUNOSSI, Z. M. Non-alcoholic fatty liver disease – A global public health perspective. **Journal of Hepatology**, v. 70, n. 3, p. 531–544, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.10.033>>.

ZHANG, J. et al. Letter to the editor: NAFLD and sarcopenia: Association or causation? **Hepatology**, v. 76, n. 6, p. E119–E120, 30 dez. 2022. Disponível em: <<https://journals.lww.com/10.1002/hep.32681>>.

ZHANG, X.; WONG, G. L. H.; WONG, V. W. S. Application of transient elastography in nonalcoholic fatty liver disease. **Clinical and Molecular Hepatology**, v. 26, n. 2, p. 128–141, 2020.

ZHANG, Y. et al. Liver fat imaging—a clinical overview of ultrasound, CT, and M R imaging. **British Journal of Radiology**, v. 91, n. 1089, 2018.

ZHANG, Y. Y. et al. Efficacy of omega-3 polyunsaturated fatty acids supplementation in managing overweight and obesity: A meta-analysis of randomized clinical trials. **Journal of Nutrition, Health and Aging**, v. 21, n. 2, p. 187–192, 2017.

ZHAO, Q.; YIN, Y.; DENG, Y. Metabolic associated fatty liver disease and sarcopenia additively increase mortality: a real-world study. **Nutrition and Diabetes**, v. 13, n. 1, p. 1–7, 2023.

ZHOU, J. H. et al. Noninvasive evaluation of nonalcoholic fatty liver disease: Current evidence and practice. **World Journal of Gastroenterology**, v. 25, n. 11, p. 1307–1326, 2019.

ANEXO 1

FICHA DE COLETA DE DADOS

IDENTIFICAÇÃO			
Nº prontuário		Data da entrevista (/ /)	
VARIÁVEIS DO PACIENTE			
SÓCIO DEMOGRÁFICAS			
Nome do paciente:			
Idade:		Data de Nascimento (/ /)	
Sexo 1. () F 2. () M		Numeração na pesquisa:	
Ocupação: <input type="checkbox"/> 1. Empregado <input type="checkbox"/> 2. Autônomo <input type="checkbox"/> 3. Desempregado <input type="checkbox"/> 4. Aposentado <input type="checkbox"/> 5. Pensionista <input type="checkbox"/> 6. Do lar <input type="checkbox"/> 7. Dependente		Escolaridade (anos de estudo concluídos): <input type="checkbox"/> 1. nenhum <input type="checkbox"/> 2. 1 a 3 <input type="checkbox"/> 3. 4 a 7 <input type="checkbox"/> 4. 8 a 11 <input type="checkbox"/> 5. 12 e + <input type="checkbox"/> 9. Ignorado	
		Renda familiar (salários mínimos): <input type="checkbox"/> 1. < 1 <input type="checkbox"/> 2. 1 a 3 <input type="checkbox"/> 3. 4 a 6 <input type="checkbox"/> 4. 7 e +	
DADOS ANTROPOMÉTRICOS E COMPOSIÇÃO CORPORAL			
Avaliação Nutricional	Tempo 0	Avaliação Nutricional	Tempo 1
1. Peso (Kg):		1. Peso (Kg):	
2. Altura (cm):		2. Altura (cm):	
3. IMC (Kg/m ²):		3. IMC (Kg/m ²):	
4. Perímetro de cintura (cm):		4. Perímetro de cintura (cm):	
5. Perímetro do quadril (cm):		5. Perímetro do quadril (cm):	
6. Perímetro do pescoço (cm):		6. Perímetro do pescoço (cm):	
7. Perímetro da panturrilha (cm):		7. Perímetro da panturrilha (cm):	
8. Relação cintura/estatura:		8. Relação cintura/estatura:	
9. Relação cintura/quadril:		9. Relação cintura/quadril:	
10. Índice de adiposidade corporal:		10. Índice de adiposidade corporal:	
11. Dinamometria:		11. Dinamometria:	
12. Calorimetria (GER):		12. Calorimetria (GER):	

13. % Pred Harris-Benedict:		13. % Pred Harris-Benedict:	
14. Bioimpedância (TMB):		14. Bioimpedância (TMB):	
15. Massa gorda total:		15. Massa gorda total:	
16. Resistência:		16. Resistência:	
17. Reactância:		17. Reactância:	
18. Massa magra total:		18. Massa magra total:	
19. Ângulo de fase:		19. Ângulo de fase:	
20. Nível de atividade física:		20. Nível de atividade física:	
EXAMES LABORATORIAIS			
Exame bioquímicos	Tempo 0	Exame bioquímicos	Tempo 1
Triglicerídeos		Triglicerídeos	
Colesterol total		Colesterol total	
LDL-colesterol		LDL-colesterol	
HDL-colesterol		HDL-colesterol	
Aspartato aminotransferase (AST/TGO)		Aspartato aminotransferase (AST/TGO)	
Alanina aminotransferase (ALT/TGP)		Alanina aminotransferase (ALT/TGP)	
Relação AST/ALT		Relação AST/ALT	
Fosfatase alcalina		Fosfatase alcalina	
Gama glutamiltransferase (GGT)		Gama glutamiltransferase (GGT)	
Glicose		Glicose	
Insulina de jejum		Insulina de jejum	
HOMA-IR		HOMA-IR	
Albumina		Albumina	
Proteínas totais		Proteínas totais	
Plaquetas		Plaquetas	
RESULTADO ULTRASSONOGRAFIA			
Esteatose leve () Esteatose moderada () Esteatose grave ()			
RESULTADO FIBROSCAN™ E CAP			
Fibroscan™ Tempo 0 Sonda M () XL () Resultado (kPa): Taxa de sucesso: IQR:		Fibroscan™ Tempo 1 Sonda M () XL () Resultado (kPa): Taxa de sucesso: IQR:	
CAP Resultado (dB/m): IQR:		CAP Resultado (dB/m): IQR:	

USO DE MEDICAÇÕES (INCLUIR MEDICAMENTOS SOB PRESCRIÇÃO, SEM PRESCRIÇÃO E FITOTERÁPICOS)		
Medicação	Dose	Frequência

DOENÇAS PREEXISTENTES:	

ANEXO 2

RECORDATÓRIO DE 24H:

	Alimentação / Preparação	Medidas Caseiras	Quantidade (g)
Desjejum			
Hora :			
Local :			
Colação			
Hora :			
Local:			
Almoço			
Hora :			
Local :			
Lanche :			
Hora :			
Local :			
Jantar :			
Hora :			
Local :			
Ceia :			
Hora :			
Local :			
Observações:			

ANEXO 3

AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE ATIVIDADE FÍSICA (IPAQ VERSÃO CURTA)

Para responder as questões lembre que: atividades físicas VIGOROSAS são aquelas que precisam de um grande esforço físico e que fazem respirar MUITO mais forte que o normal e atividades físicas MODERADAS são aquelas que precisam de algum esforço físico e que fazem respirar UM POUCO mais forte que o normal.

Para responder as perguntas pense somente nas atividades que você realiza por pelo menos 10 minutos contínuos de cada vez.

1a. Em quantos dias da última semana você CAMINHOU por pelo menos 10 minutos contínuos em casa ou no trabalho, como forma de transporte para ir de um lugar para outro, por lazer, por prazer ou como forma de exercício?

Dias _____ por SEMANA () Nenhum

1b. Nos dias em que você caminhou por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou caminhando por dia?

Horas: _____ Minutos: _____

2a. Em quantos dias da última semana, você realizou atividades MODERADAS por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo pedalar leve na bicicleta, nadar, dançar, fazer ginástica aeróbica leve, jogar vôlei recreativo, carregar pesos leves, fazer serviços domésticos na casa, no quintal ou no jardim como varrer, aspirar, cuidar do jardim, ou qualquer atividade que fez aumentar moderadamente sua respiração ou batimentos do coração (POR FAVOR NÃO INCLUA CAMINHADA)

Dias _____ por SEMANA () Nenhum

2b. Nos dias em que você fez essas atividades moderadas por pelo menos 10 minutos contínuos, quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades por dia?

Horas: _____ Minutos: _____

3a. Em quantos dias da última semana, você realizou atividades VIGOROSAS por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo correr, fazer ginástica aeróbica, jogar futebol, pedalar rápido na bicicleta, jogar basquete, fazer serviços domésticos pesados em casa, no quintal ou cavoucar no jardim, carregar pesos elevados ou qualquer atividade que fez aumentar MUITO sua respiração ou batimentos do coração.

Dias _____ por SEMANA () Nenhum

3b. Nos dias em que você fez essas atividades vigorosas por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades por dia?

Horas: _____ Minutos: _____

Estas últimas questões são sobre o tempo que você permanece sentado todo dia, no trabalho, na escola ou faculdade, em casa e durante seu tempo livre. Isto inclui o tempo sentado estudando, sentado enquanto descansa, fazendo lição de casa visitando um amigo, lendo, sentado ou deitado assistindo TV. Não inclua o tempo gasto sentando-se durante o transporte em ônibus, trem, metrô ou carro.

4a. Quanto tempo no total você gasta sentado durante um dia de semana?

Horas: _____ Minutos: _____

4b. Quanto tempo no total você gasta sentado durante em um dia de final de semana?

Horas: _____ Minutos: _____

ANEXO 4

Questionário AUDIT

1. Com que frequência consome bebidas que contêm álcool? [Escreva o número que melhor corresponde à sua situação.]

- 0 = nunca
- 1 = uma vez por mês ou menos
- 2 = duas a quatro vezes por mês
- 3 = duas a três vezes por semanas
- 4 = quatro ou mais vezes por semana

2. Quando bebe, quantas bebidas contendo álcool consome num dia normal?

- 0 = uma ou duas
- 1 = três ou quatro
- 2 = cinco ou seis
- 3 = de sete a nove
- 4 = dez ou mais

3. Com que frequência consome seis bebidas ou mais numa única ocasião?

- 0 = nunca
- 1 = menos de um vez por mês
- 2 = pelo menos uma vez por mês
- 3 = pelo menos uma vez por semana
- 4 = diariamente ou quase diariamente

4. Nos últimos 12 meses, com que frequência se apercebeu de que não conseguia parar de beber depois de começar?

- 0 = nunca
- 1 = menos de um vez por mês
- 2 = pelo menos uma vez por mês
- 3 = pelo menos uma vez por semana
- 4 = diariamente ou quase diariamente

5. Nos últimos 12 meses, com que frequência não conseguiu cumprir as tarefas que habitualmente lhe exigem por ter bebido?

- 0 = nunca
- 1 = menos de um vez por mês
- 2 = pelo menos uma vez por mês
- 3 = pelo menos uma vez por semana
- 4 = diariamente ou quase diariamente

6. Nos últimos 12 meses, com que frequência precisou de beber logo de manhã para "curar" uma ressaca?

- 0 = nunca
- 1 = menos de um vez por mês
- 2 = pelo menos uma vez por mês
- 3 = pelo menos uma vez por semana
- 4 = diariamente ou quase diariamente

7. Nos últimos 12 meses, com que frequência teve sentimentos de culpa ou de remorsos por ter bebido?

- 0 = nunca
- 1 = menos de um vez por mês
- 2 = pelo menos uma vez por mês
- 3 = pelo menos uma vez por semana
- 4 = diariamente ou quase diariamente

8. Nos últimos 12 meses, com que frequência não se lembrou do que aconteceu na noite anterior por causa de ter bebido?

- 0 = nunca
- 1 = menos de um vez por mês
- 2 = pelo menos uma vez por mês
- 3 = pelo menos uma vez por semana
- 4 = diariamente ou quase diariamente

9. Já alguma vez ficou ferido ou ficou alguém ferido por você ter bebido?

- 0 = não
- 1 = sim, mas não nos últimos 12 meses
- 2 = sim, aconteceu nos últimos 12 meses

10. Já alguma vez um familiar, amigo, médico ou profissional de saúde manifestou preocupação pelo seu consumo de álcool ou sugeriu que deixasse de beber?

- 0 = não
- 1 = sim, mas não nos últimos 12 meses
- 2 = sim, aconteceu nos últimos 12 meses

ANEXO 5

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Modulação epigenética por ácidos graxos poli-insaturados n-3 na doença hepática gordurosa não alcoólica.
2021 / 2022

Termo de esclarecimento:

- Os participantes serão abordados no ambulatório de fígado do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho e, após consulta com os médicos, serão informados sobre o que acontecerá no estudo, os benefícios, riscos e procedimentos que serão realizados no estudo.
- Você está sendo convidado a participar voluntariamente do projeto de pesquisa: “Efeito da suplementação com ácidos graxos N-3 em miRNAs circulantes, biomarcadores hepáticos e desfechos clínicos em pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica, com sem polimorfismo PNPLA3: ensaio clínico randomizado”. O estudo tem como objetivo saber se a ingestão do óleo de peixe rico em gorduras poli-insaturadas, ou seja, o ômega 3, ajuda na melhora do colesterol, dos triglicerídeos; da glicose; e de exames que avaliam a inflamação no seu corpo; a quantidade de outras gorduras como a quantidade de ômega 3 no seu sangue; e outros exames que vão avaliar se o suplemento que você consumiu vai causar melhora na gordura do fígado. Também será avaliado o consumo alimentar, ou seja, o que você costuma comer e serão feitas medidas de peso, altura, quadril, cintura, pescoço, composição corporal e gasto de energia. Estas informações podem ser muito importantes para seu acompanhamento.

Procedimentos:

- Após sua assinatura ao TCLE o pesquisador responsável e pesquisador colaborador do estudo irão consultar seu prontuário para completar uma ficha com os resultados dos seus exames que você realizar a pedido do seu médico no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho como a ultrassonografia e o FibroScan™;
- Você receberá um papel com a marcação para coletar sangue, fazer o exame FibroScan™ e ser atendido pela equipe de nutrição da pesquisa. Tudo será realizado, se possível, no mesmo dia, em dois momentos diferentes, um inicial e outro após 6 meses.
- Nos dias marcados você deve ir Hospital Universitário Clementino Fraga Filho na parte da manhã e precisa ficar 12 horas sem comer nenhum alimento antes de tirar o sangue, mantendo-se em jejum para demais avaliações. Será coletado 15 ml do seu sangue que é mais ou menos 2 colheres de sopa. Nesse mesmo dia serão feitas as medidas de peso, altura, cintura, quadril, panturrilha e do pescoço e avaliação por meio da bioimpedância, da calorimetria indireta e do dinamômetro, para isso você precisa estar com roupas leves como blusa e calça ou bermuda.
- O seu sangue será armazenado em freezer à -80°C somente durante o período da pesquisa para as avaliações discutidas com você e para repetir algum exame caso seja necessário, depois desse período ele será descartado, ou seja, vai para o lixo;
- Você responderá perguntas sobre sua alimentação, consumo de álcool, se realiza exercícios

físicos e se é fumante;

-Depois dessas avaliações ainda no mesmo dia você será sorteado para entrar em um dos grupos que receberão os suplementos, ou seja, cápsulas. Serão dois grupos: o grupo 1 receberá óleo de peixe (cápsulas de ômega 3 contendo mais óleo de peixe), os componentes do óleo de peixe ajudam a melhorar a inflamação e a diminuir a gordura no seu fígado; e o grupo 2 receberá o placebo com óleo de oliva, para avaliar se o componente do óleo de peixe ajuda no tratamento da doença. Todos os grupos deverão tomar 4 cápsulas todos os dias nos horários que for orientado pelo pesquisador durante 6 meses. As cápsulas serão entregues a cada 2 meses, aproximadamente, pela equipe da pesquisa. Durante este período, serão feitos contatos semanais para acompanhar a ingestão das cápsulas e possíveis efeitos indesejáveis. A escolha do grupo não será feita por você nem pelo pesquisador, você não saberá em que grupo está somente quando a pesquisa acabar é que você terá essa informação;

-As cápsulas dos suplementos alimentares deverão ser mantidas longe da luz e no frasco que foi entregue. Esclarecemos que os dois suplementos não possuem em sua composição nenhuma substância tóxica e será feito segundo as normas de higiene e segurança alimentar, sendo fornecido por uma empresa responsável e não oferece nenhum risco a sua saúde;

-Para o estudo você terá que disponibilizar 2 dias no Ambulatório de Hepatologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho;

Riscos/Desconfortos:

-A cápsula de óleo de peixe é um suplemento alimentar regulamentado e vendido em farmácias e drogarias e não apresenta efeitos colaterais. A dose do óleo de peixe utilizada nesta pesquisa já foi testada e aprovada em outros estudos e será fornecida para nossa pesquisa direto do fabricante farmacêutico, colaborador da pesquisa, sem custo nenhum para o participante da pesquisa. As medidas de peso, altura, medida da cintura, da panturrilha, do pescoço e do quadril, bioimpedância, calorimetria indireta, dinamometria e a avaliação dos alimentos que você consume não oferecem riscos. Os equipamentos de bioimpedância, calorimetria indireta e dinamometria são simples, não invasivos, ou seja, não apresentam risco, não causam dor ou agressão. Os participantes da pesquisa serão submetidos à coleta de sangue para realizar exames laboratoriais incluídos no estudo, com riscos de dor e hematoma no local da coleta. O FibroScan™ exame realizado para avaliar a quantidade de gordura no seu fígado é indolor, rápida e não oferece exposição à radiação.

Despesas, compensações e benefícios:

-Você não terá que pagar nada para participar do estudo e não terá gastos com a sua participação. Você não terá que pagar nada para o laboratório responsável pelos exames. Você tem direito, em qualquer momento, de pedir ao pesquisador responsável uma cópia do resultado de seus exames.

-**Ocorrer ressarcimento**, ou seja, cobertura em compensação exclusiva de despesas decorrentes da participação do participante da pesquisa no projeto. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa;

-Em caso de qualquer complicação clínica decorrente dos procedimentos realizados durante a pesquisa você tem direito a tratamento que será fornecido pelo pesquisador principal e pelo Instituto de Nutrição Josué de Castro-UFRJ, bem como, às indenizações legalmente estabelecidas. Isso quer dizer que, caso você tenha algum problema, direto ou indireto, você deverá avisar ao pesquisador ou a alguém da equipe para que possa receber assistência integral de saúde pelo tempo que for necessário sem nenhum custo a você;

-Você receberá os resultados dos exames que realizar durante o estudo e poderá tirar todas as dúvidas com os pesquisadores do estudo; Além disso, todos os participantes independente do grupo ao final do estudo, terão acesso gratuito e por tempo indeterminado por parte do patrocinador, aos melhores métodos terapêuticos que se demonstraram eficazes nesse estudo, caso seja necessário de acordo com os resultados e a pedido do médico do estudo ou do seu médico pessoal (assistente);

Alternativas e informações:

-É garantida a liberdade de querer não participar do projeto de pesquisa ou de retirar o consentimento a qualquer momento, no caso da aceitação, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição; Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso ao profissional responsável: Wilza Arantes Ferreira Peres e demais pesquisadores: Lygia Nestal Barroso e Jéssica Silva Salarini que poderão ser encontrados através do(s) telefone(s): (21) 98899-1472 e (21) 99719-8323. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/HUCFF/UFRJ. O Comitê de Ética em Pesquisa é um órgão que controla as questões éticas das pesquisas na instituição (UFRJ) e tem como uma das principais funções proteger os participantes da pesquisa de qualquer problema. Seu endereço é na Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco, n.º 255 – Cidade Universitária/Ilha do Fundão - Sala 01D-46/1º andar - pelo telefone 3938-2480, de segunda a sexta-feira, das 8 às 16 horas, ou através do e-mail: cep@hucff.ufrj.br.

Privacidade e a confidencialidade:

-A privacidade deriva da autonomia e engloba a intimidade da vida privada, a honra das pessoas, significando que a pessoa tem direito de limitar a exposição de seu corpo, sua imagem, dados de prontuário, julgamentos expressos em questionários, etc. A confidencialidade se refere à responsabilidade sobre as informações recebidas ou obtidas em exames e observações pelo pesquisador em relação a dados pessoais do participante da pesquisa. Ambas devem estar asseguradas explicitamente no protocolo de pesquisa e no TCLE (Res. CNS 466/12) e deve ser assegurado ao participante da pesquisa que os dados pessoais oriundos da participação na pesquisa serão utilizados apenas para os fins propostos no protocolo (Res. CNS 466/12).

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

CONSENTIMENTO

Eu acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações sobre o estudo acima citado que li ou que foram lidas para mim.

Eu discuti com a pesquisadora LygiaNestal Barroso e/ou Jéssica Silva Salarini sobre a minha

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

Nome do Participante da Pesquisa _____ Assinatura do Participante da Pesquisa _____
Data: ____/____/____

Nome do Pesquisador Responsável _____ Assinatura do Pesquisador Responsável _____
Data: ____/____/____

ANEXO 6

PUBLICAÇÃO DO PROTOCOLO DO ESTUDO

Clinical Nutrition ESPEN 57 (2023) 117–125



Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Nutrition ESPEN

journal homepage: <http://www.clinicalnutritionespen.com>

Protocol

Effect of fish oil supplementation on the concentration of miRNA-122, FGF-21 and liver fibrosis in patients with NAFLD: Study protocol for a randomized, double-blind and placebo-controlled clinical trial



Lygia N. Barroso ^{a, b}, Jessica Salarini ^{a, b}, Nathalie Carvalho Leite ^b,
Cristiane A. Villela-Nogueira ^b, Alberto Dávalos ^c, Maria das Graças Tavares Carmo ^a,
Wilza Arantes Ferreira Peres ^{a, *}

^a Josué de Castro Nutrition Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Carlos Chagas Filho Avenue, 367/CCS - Block J2, University City—Ilha Do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b School of Medicine, Clementino Fraga Filho University Hospital, Federal University of Rio de Janeiro, Prof. Rodolpho Paulo Rocco Street, 255 - University City—Ilha Do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^c Laboratory of Epigenetics of Lipid Metabolism, Madrid Institute for Advanced Studies (IMDEA), Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 February 2023

Accepted 25 June 2023

Keywords:

Hepatic steatosis

Non-alcoholic fatty liver disease

Omega 3

N-3 polyunsaturated fatty acids

Transient hepatic elastography

miRNAs

SUMMARY

Background & aims: To date, no specific drugs are available for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), though the effect of fish oil supplementation on improving fibrosis in patients with NAFLD has been evaluated. N-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA) may modulate the concentration of microRNAs (miRNAs) and fibroblast growth factor (FGF)-21, which have been identified as non-invasive markers of liver fibrosis. The present study aims to evaluate whether n-3 PUFA supplementation can modulate miRNA-122 and FGF-21 and improve liver fibrosis and steatosis, measured by transient hepatic elastography (THE), in individuals with NAFLD.

Methods: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial will be conducted to evaluate the effect of 4 g/day supplementation of fish oil (2100 mg EPA and 924 mg DHA) in patients with NAFLD over a 6-month period. Fifty-two patients aged >19 years will be randomly assigned to either a placebo (olive oil) or treatment (fish oil) group. Anthropometric data, food intake, physical activity, body composition, resting energy expenditure (evaluated using indirect calorimetry), liver enzymes, platelets, lipids and glucose profile, inflammatory markers (such as C-reactive protein, neutrophil/lymphocyte, platelet/lymphocyte, and monocyte/lymphocyte ratios), miRNA-122 and FGF-21 concentration, and incorporation of fatty acids into the erythrocyte membrane (analyzed using gas chromatography) as well as the degree of liver fibrosis and steatosis assessed using THE (Fibroscan® Touch 502, Paris, France) and liver biomarkers Steato-Brazilian Longitudinal Study of Adult Health, Fatty Liver Index, NAFLD Fibrosis Score, Fibrosis-4 score, and FibroScan-AST score will be evaluated at the beginning and end of the treatment. Continuous variables with normal distribution will be compared between placebo and intervention groups using Student's T test for independent samples; continuous non-parametric variables will be compared using Dunn or Mann–Whitney test. Associations between categorical variables will be analyzed using the chi-square test, and within-group differences will be evaluated using the Wilcoxon signed-ranks test. The criterion for determining significance will be set at 5%.

Conclusion: The present study protocol will investigate the supplementation of EPA-rich fish oil as an alternative treatment for NAFLD and its feasibility in affecting the concentration of miRNA-122 and FGF-21 markers. Its findings will offer valuable contributions to the literature.

Registration: ReBEC number RBR-8dp876.

© 2023 European Society for Clinical Nutrition and Metabolism. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author. Nutrition and Dietetic Department, Josué de Castro Nutrition Institute, Federal University of Rio de Janeiro, 367, CCS, Block J2, University City, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil.

E-mail address: wilza@nutricao.ufrj.br (W.A. Ferreira Peres).

<https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2023.06.027>

2405-4577/© 2023 European Society for Clinical Nutrition and Metabolism. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is defined by the presence of 5% hepatic steatosis in individuals lacking secondary causes of fat accumulation in hepatocytes. It has an evolutionary character and may progress to steatohepatitis with fat accumulation accompanied by inflammation with or without liver fibrosis followed by cirrhosis and hepatocellular carcinoma [1]. NAFLD has increased rapidly in prevalence, impacting approximately 25% worldwide and 30.45% in South America. It is considered the hepatic manifestation of metabolic syndrome and presents common risk factors such as visceral obesity, dyslipidemia, and insulin resistance [2]. Diagnosis may be performed using non-invasive tests, which do not reflect liver histology. Liver biopsy remains the gold standard but has limited application owing to its invasive nature. No specific drugs are approved to treat NAFLD; therefore, the main recommendation is lifestyle modification [1,3–5].

N-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs) include eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acids, which seem to have positive effects in patients with NAFLD, although no recommendations exist regarding dose, treatment duration, and EPA–DHA ratio. However, these lipids have anti-inflammatory effects, improve insulin signaling, appear to increase resting energy expenditure (REE), and reduce visceral fat accumulation [6–8]. In patients with NAFLD, studies with supplementation have shown an association with reduced liver enzymes, triglycerides, and cholesterol; increased high-density lipoprotein; improved hepatic steatosis and fibrosis; and body mass index (BMI) (Supplementary material 1) [9–17].

MicroRNAs (miRNAs) and fibroblast growth factor 21 (FGF-21) are noninvasive biomarkers of liver disease. miR-122 corresponds to 70% of the total miRNAs expressed in the liver, and its main function is to regulate hepatic lipid metabolism [18–20]. FGF-21 is mainly secreted by the liver and has metabolic actions associated with insulin sensitivity and lipid and carbohydrate metabolism [21]. In humans, the concentrations of miR-122 and FGF-21 are positively correlated with histological changes characterized by fat accumulation in hepatocytes, lobular inflammation, and hepatic fibrosis [21–26]. The dietary modulation of miRNAs and FGF-21 as potential therapeutic targets has been a research goal [27–30].

Although research has identified the possibility of modulating miRNAs and FGF-21 through EPA and DHA supplementation [30,31], few studies have explored this topic in association with hepatic steatosis and fibrosis, and none have evaluated the effect of EPA-rich fish oil on miR-122 from humans with NAFLD. Greater clarity is needed regarding n-3 PUFA composition, dose, and treatment time for improving NAFLD. In the present study, the effect of 4 g/day supplementation of fish oil (2100 mg EPA and 924 mg DHA) in patients with NAFLD over a 6-month period will be evaluated.

1.1. Study objectives

This study protocol aims to evaluate whether EPA-rich fish oil can reduce miR-122 concentration in patients with NAFLD and to identify the effect of EPA-rich fish oil supplementation in improving the degree of hepatic fibrosis and steatosis and reducing FGF-21 concentration. The exploratory objectives are to evaluate the effects on hepatic enzyme reduction, lipid and glucose profile improvement, inflammatory parameters, body composition, anthropometry, and REE.

2. Materials and methods

2.1. Design

The present article is a double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial protocol that involves selecting patients aged 20 years or older, of both sexes, diagnosed with NAFLD. This research takes place at the Clementino Fraga Filho University Hospital and Bonsucesso Federal Hospital in Rio de Janeiro, Brazil. The patients will be recruited from the hepatology outpatient clinics of both hospitals. A total of 52 patients will be recruited; 26 will be allocated to each group during a 6-month period, an intervention time supported by previous studies for incorporating n-3 PUFA into the erythrocyte membrane and effect. Outcomes will be evaluated at the end of this period, as shown in Fig. 1, according to the Standard Protocol Items: Recommendations for Intervention Trials [12,32,33]. Fig. 2 presents a flowchart of the study participants. **Registration:** ReBEC number RBR-8dp876.

2.2. Eligibility criteria

Eligible participants will be men and women aged 20 years or older with a previous NAFLD diagnosis established by abdominal ultrasound and/or liver biopsy after excluding other causes of liver steatosis. Patients who present conditions that could influence the outcomes or interpretation of results, such as: 1) liver cirrhosis; 2) viral hepatitis; 3) fever or present infection; 4) cancer with or without chemotherapy and radiotherapy; 5) autoimmune diseases and/or those with greater inflammatory potential, such as inflammatory bowel diseases, stage IV and V chronic kidney disease, and systemic lupus erythematosus; 6) transplantation, trauma, surgery, or hospitalization in the last 30 days; 7) current use of steroids, non-steroidal anti-inflammatory drugs, or immunomodulatory agents; 8) use of n-3 PUFA supplement or other medications that influence liver enzymes, like silymarin, in the last 3 months prior to the study; 9) pregnancy and lactation; and 10) Alcohol Use Disorders Identification Test score [34] greater than or equal to 8 will not be eligible.

2.3. Recruitment

Patients are selected for recruitment by consulting the ultrasound and/or liver biopsy abdominal exams, used to establish the diagnosis, as well as the other eligibility criteria in the patient's medical record in the outpatient clinic. Patients identified as eligible will be approached in the waiting room for medical consultation, informed about the research, and invited to participate. Telephone contact information will be recorded to schedule a return on a specific day to continue the research. Seven days before the date set for data collection, telephone contact will be made to provide information about the conditions for carrying out the exams. All participants will provide written informed consent, and the local Ethics Committee has approved the study protocol.

2.4. Randomization and blinding

Randomization will be performed by the research coordinator using a system available at <http://www.random.org> and sent to the pharmacist responsible for blinding the supplements. All others, including patients, collaborators (nursing and medical technicians), and researchers, will be blinded to the treatment provided.

TIMEPOINT	STUDY PERIOD							
	Enrolment	Allocation	Post-allocation					Close-out
		Baseline	Month 1	Month 2	Month 3	Month 4	Month 5	Month 6
Eligibility screen	X							
Informed consent		X						
AUDIT application	X							X
Allocation		X						
INTERVENTION:								
4.0g/day of fish oil			←————→					
4.0g/day of olive oil			←————→					
ASSESSMENTS:								
Primary outcome:		X						X
miR-122								
Secondary outcome:		X						X
Liver stiffness								
Liver steatosis								
FGF-21								
Hepatic Biomarkers (Steato-ELSA, FLI, NFS, FIB-4, FAST score)								
Exploratory Outcomes:		X						X
Laboratory tests (glycidic and lipid metabolism, hepatic and inflammatory markers)								
Anthropometry								
Body composition								
Resting energy expenditure								
Physical activity								
Food intake								
Adherence assessment			X	X	X	X	X	X

Fig. 1. Recommendations for intervention studies (SPIRIT): schematic diagram on the participants' timeline. Abbreviations. AUDIT, Alcohol Use Disorders Identification Test; miR-122, MicroRNA122; FGF-21, Fibroblast growth factor 2; Steato-ELSA, Steato-Brazilian Longitudinal Study of Adult Health FLI, Fatty Liver Index; NFS, NAFLD Fibrosis Score; FIB-4, Fibrosis-4 score; FAST score, FibroScan-AST.

In the present parallel-type randomized clinical trial protocol, patients will be randomized in equal proportions into two groups (1:1). Group I – Intervention (fish oil) will contain 26 patients who will receive four capsules per day containing 1 g of fish oil, totaling approximately 2100 mg of EPA and 924 mg of DHA per day. Group II – Placebo (olive oil) will contain 26 patients who will receive four capsules containing 1 g of refined olive oil each, totaling approximately 2800 mg of oleic acid per day. The groups will receive these supplements for a 6-month period. Both capsules are soft and yellowish in color without any coding, and the

fish oil capsules are deodorized, thus maintaining double blinding.

2.5. Intervention

In the first visit for data collection, participants will receive and sign a free and informed consent form before engaging in the following procedures: anthropometry, electrical bioimpedance, indirect calorimetry, blood collection by a trained professional, performance of transient hepatic elastography (THE; Fibroscan),

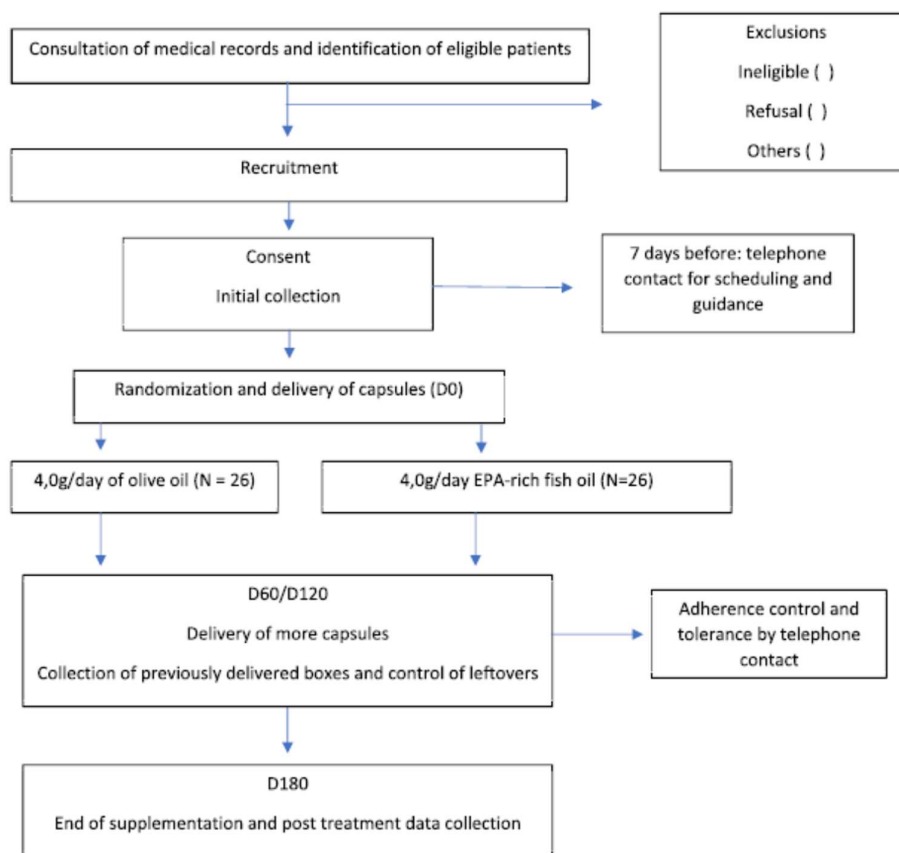


Fig. 2. Flowchart of study participants.

and collection of the results of recent biochemical tests (last 3 months) by consulting the medical records. The first 24-h recall (R24h) will be applied for dietary assessment, and physical activity level will be performed using the International Physical Activity Questionnaire.

After these procedures, two boxes containing the capsules will be provided with guidelines for use and storage. N-3 PUFA supplements contain small amounts of vitamin E to prevent oxidation of n-3 PUFA double bonds. Each capsule contains 525 mg of EPA and 231 mg of DHA. Refined olive oil containing 750 mg of oleic acid is used as the placebo. Each bottle contains 120 capsules. Tolerance and adherence to supplementation will be monitored through telephone contact by message and, when necessary, by call every fortnight to assess supplementation intake and count the capsules supplied and leftovers. In addition, patients will be instructed to return 2 months later to fetch another 2 bottles and deliver the previous bottles for leftover control and adherence monitoring.

Patients will be instructed to store the capsules under refrigeration and take them at specific times so they do not forget and consume them separately from bulky meals to minimize the risk of side effects and aftertaste. Participants will not receive nutritional counseling, will be instructed to maintain their usual lifestyle, and will be encouraged to contact the study staff with any questions throughout the intervention. After 6 months of follow-up, patients will repeat all analyses performed at the beginning of the study.

2.6. Outcomes

2.6.1. Primary outcome

The primary outcome will be the ability of EPA-rich fish oil, compared to placebo, to reduce miR-122 concentration in NAFLD patients after 6 months. We will evaluate the miRNA in patient plasma samples before and after supplementation.

2.6.2. Secondary outcome

The secondary outcome will be the ability of EPA-rich fish oil, compared with placebo, to reduce the concentration of FGF-21 and improve the degrees of hepatic fibrosis and steatosis estimated using THE (Fibroscan®) and liver biomarkers. The following markers will be used to estimate liver fibrosis: NAFLD Fibrosis Score, Fibrosis-4 score, and FibroScan-AST score. The Steato-Brazilian Longitudinal Study of Adult Health and Fatty Liver Index will be used for steatosis. All these markers will be evaluated at the beginning and end of treatment (baseline and at the end of the 6th month).

2.6.3. Exploratory variables

The ability of EPA-rich fish oil supplementation, compared with placebo, to produce effects on anthropometry (BMI and visceral adiposity markers such as waist [WC], hip [HC], and neck [NC] circumferences and body adiposity index [BAI]), body composition (total body fat content and muscle mass), REE, inflammatory

markers (C-reactive protein and neutrophil/lymphocyte, platelet/lymphocyte, and monocyte/lymphocyte ratios), and biochemical assessment (lipemia, metabolism of carbohydrates, liver enzymes, albumin, and platelets) will be evaluated in the initial collection and at the end of the 6th month of intervention. For control purposes, the level of physical activity and food intake (calories and macronutrients) as well as alcohol intake will also be monitored. All the aforementioned variables will be evaluated as described in the following section.

2.7. Data collection and management

2.7.1. Blood collection

The participants will undergo peripheral blood collection by a properly trained professional, using two separate Vacutainer® tubes, one containing ethylenediaminetetraacetic acid and the other without anticoagulant, after an overnight fast for 12 h. These tubes will be placed in a centrifuge for 15 min at 3000 revolutions per minute (rpm) to separate plasma, erythrocytes, and serum and stored at -80°C for further analysis [35].

2.7.2. Quantification of miRNA expression

Total RNA will be extracted from plasma samples using the miRNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions. The TaqMan® Advanced miRNA Assay Kit (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) will be used to obtain cDNA. Real-time quantitative will be performed using the TaqMan® Fast Master Mix [2×] and the specific primer for the analyzed miRNA, in addition to the miRNA used as a normalizer, in triplicate. Quantitative reverse transcription PCR will be performed using the StepOnePlus system [36]. The relative expression of miR-122 will be calculated using a calibration control sample. The results will be analyzed using the delta Cycle Threshold ($\Delta\Delta\text{CT}$) method as previously described by Livak et al. [37].

2.7.3. Quantification of FGF-21 concentration

The serum concentration of FGF-21 will be evaluated using an enzyme-linked immunosorbent assay kit (ELABSCIENCE, USA). All measurements will be performed in a private laboratory (LEAC LAC, São Paulo, Brazil) according to the manufacturer's recommendations.

2.7.4. Determination of fatty acid profile in erythrocytes

Red blood cell samples will be subjected to lipid extraction, saponification, and direct alkaline methylation using an adaptation of the method proposed by the American Oil Chemists' Society AOCs 2b-11 [38]. Four milligrams of the internal standard C13:0 (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA), 100 mg of erythrocytes, and

5 mL of sodium hydroxide in 0.5 M of methanol will be added to the tube. The tubes will be manually poured and placed in a water bath for 15 min at 100°C with agitation (4 rpm). After cooling, 5 mL of BF₃–CH₃OH (Sigma–Aldrich, Saint Louis, MO, USA) will be added, and the mixture will be placed in a water bath at 100°C and stirred for 2 min.

Subsequently, the tubes will be cooled again, and 5 mL of hexane and 3 mL of saturated sodium chloride will be added. The samples will be maintained at room temperature for approximately 2 h for transesterification. Following the chromatographic conditions described above [39], fatty acids will be quantified on a GC 7890 A Chromatograph equipped with a hydrogen flame ionization detector and EZChrom Elite Software CDS (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) using an SP 2560 capillary column (bisulopropyl polysiloxane, 100 m × 0.25 mm ID, 0.20 μm thickness; Supelco, Bellefonte, PA, USA). The methyl esters of fatty acids will be identified by retention time relative to standards (Reference Standard GLC 463, Nu–Chek Prep, Inc., Elysian, MN, USA), which are expressed as percentages in this study. The omega 3 index will be calculated by adding the % EPA and % DHA in erythrocytes; it considered good patient adherence to supplementation when the index is greater than 80%.

2.7.5. Assessment of laboratory markers

Data will be obtained by consulting the medical records and considering 1) liver parameters: alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), AST/ALT ratio, alkaline phosphatase, gamma-glutamyl transferase, platelets, total protein, albumin, international normalized ratio, and activity time of prothrombin; 2) metabolic parameters: fasting blood glucose, fasting insulin, glycated hemoglobin, triglycerides, total cholesterol, low-density lipoprotein, and high-density lipoprotein; and 3) inflammatory/hematological parameters: C-reactive protein and neutrophil/lymphocyte, platelet/lymphocyte, and monocyte/lymphocyte ratios over the past 3 months [40].

2.7.6. Assessment of hepatic steatosis and fibrosis

Steatosis and fibrosis will be evaluated using the biomarkers described in Tables 1 and 2. Biomarkers will be calculated using the Hepatic-app and HepCalc available for download for Apple and Android systems [41–47].

Hepatic steatosis and fibrosis will also be evaluated using THE with FibroScan® Touch 502 (Echosens, Paris), operated by an experienced professional, using model M or XL probes, after overnight fasting. The degree of hepatic fat accumulation will be measured by controlled attenuation parameter (CAP), expressed in dB/m and ranging from 100 to 400 dB/m. Liver stiffness will be

Table 1
Presentation of biomarker formulas used to estimate liver steatosis.

Steato-ELSA	$[2.71828 \{ (0.0823 \times \text{BMI}) + (0.0337 \times \text{WC}) + (0.0596 \times \text{HOMA-IR}) + (0.0036 \times \text{TG}) + (0.0173 \times \text{ALT}) - (0.0124 \times \text{AST}) - 6.6434 \} /$
FLI	$1 + 2.71828 \{ (0.0823 \times \text{BMI}) + (0.0337 \times \text{WC}) + (0.0596 \times \text{HOMA-IR}) + (0.0036 \times \text{TG}) + (0.0173 \times \text{ALT}) - (0.0124 \times \text{AST}) - 6.6434 \} /$ $[e^{(0.9533 \times \log(\text{TC}) + 0.1373 \times \text{BMI} + 0.7183 \times \log(\text{GGT}) + 0.0533 \times \text{WC} - 15.745)} / [1 + (e^{(0.9533 \times \log(\text{TC}) + 0.1373 \times \text{BMI} + 0.7183 \times \log(\text{GGT}) + 0.0533 \times \log(\text{WC}) - 15.745)}]$

Abbreviations: BMI, body mass index; WC, waist circumference; IR, insulin resistance; TG, triglycerides; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; e, exponential, log, logarithm; GGT, gamma glutamyltransferase; Steato-ELSA, Steato-Brazilian Longitudinal Study of Adult Health; FLI, Fatty Liver Index.

Table 2
Presentation of biomarker formulas used to estimate liver fibrosis.

NFS	$[1.675 + 0.037 \times \text{age (years)} + 0.094 \times \text{BMI} + 1.13 \times \text{diabetes (yes = 1/no = 0)} + 0.99 \times \text{AST/ALT ratio} - 0.013 \times \text{platelets (x10}^9\text{/L)} - 0.66 \times \text{albumin}$
FIB-4	$(\text{age (years)} \times \text{AST}) / (\text{platelets} / 1000) \times \text{square root of ALT}$
FAST score	$e^{(-1.65 + 1.07 \times \ln(\text{kPa}) + 2.66 \times 10^{-8} \times \text{CAP}^3 - 63.3 \times \text{AST}^4)} / [1 + e^{(-1.65 + 1.07 \times \ln(\text{kPa}) + 2.66 \times 10^{-8} \times \text{CAP}^3 - 63.3 \times \text{AST}^4)}]$

Abbreviations: BMI, body mass index; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; e, exponential, log, logarithm; GGT, gamma glutamyltransferase; CAP, controlled attenuation parameter; kPa, kilopascals; NFS, NAFLD Fibrosis Score; FIB, Fibrosis-4 score; FAST score, FibroScan-AST score.

expressed in kilopascals (kPa), ranging from 1.5 to 75 kPa, with a precision of 0.5 kPa. The examination will be performed with the patient in the supine position with the right arm in maximum abduction, and hepatic stiffness will be measured between the sixth and seventh intercostal spaces in the midaxillary line. The evaluation results will be expressed as the median of 10 valid CAP measurements for steatosis and liver stiffness for fibrosis, considering a success percentage greater than 60% and an interquartile range (IQR) below 30% of the median CAP and liver stiffness values [48–50]. The cut-off points for the stages of fibrosis and steatosis are presented in Table 3 [51–53].

2.7.7. Anthropometry and body composition

The participants will be instructed to wear light clothing that allows for adequate collection of anthropometric measurements. All variables will be measured twice. The current weight will be obtained using a calibrated mechanical scale (Fillizola®), and height will be measured using a platform-type stadiometer with the patient positioned vertically with arms extended along the body, shoulders relaxed, heels together, and head positioned in the Frankfurt plane.

With regard to adiposity markers, WC, HC, and NC will be measured using a flexible and inelastic tape. WC will be measured at the midpoint between the last rib and iliac crest [54]. HC will be measured with the patient standing at the most prominent point between the waist and thigh, at the level of maximum glute extension. NC will be measured at the height of the cricothyroid cartilage and below the laryngeal prominence in men. Additionally, BAI will be calculated using the formula $BAI = [Hip / (height \times \sqrt{height})] - 18$ [55].

Body composition will be assessed using a portable tetrapolar Biodynamics® device, model 450 (TBW, São Paulo, Brazil), consisting of two sets of two aluminum foil electrodes, which will be subdivided into four terminals. The electrodes will be positioned on the foot and right hand of the patient lying in the supine position, without shoes, watches, or other metals, with the arms relaxed along the body and legs stretched and apart. In the foot, the distal electrode is located at the base of the middle toe and the proximal electrode just above the ankle between the medial and lateral malleolus. In the right hand, the distal electrode is located at the base of the middle finger, and the distal electrode is just above the wrist joint line, coinciding with the styloid process [56–58]. Using this device, it is possible to obtain the fat mass (% and kg) and fat-free mass (% and kg). Patients will be instructed to fast, avoid alcohol and caffeine intake (coffee, tea, chocolate), and not perform physical activity in the last 8 h prior to the test. Owing to the presence of electrical current, patients with a pacemaker and metallic prosthesis will be excluded from the bioimpedance assessment [56].

Table 3
Cut-off points for steatosis and liver stiffness by Fibroscan®.

Stages	Cut-off Points	
Hepatic steatosis [51]		
>S0	248 dB/m	
>S1	268 dB/m	
>S2	280 dB/m	
Liver stiffness [52,53]		
	M probe	XL probe
F2	7,0 kPa	6,2 kPa
F3	8,7 kPa	7,2 kPa
F4	10,3 kPa	7,9 kPa

Legend: >S0, mild steatosis; >S1 moderate steatosis; >S2, severe steatosis; F2, significant fibrosis; F3, advanced fibrosis; F4, cirrhosis.

2.7.8. Physical activity level

To assess the level of physical activity before and after the intervention, the short version of the International Physical Activity Questionnaire validated for the Brazilian population will be used [59].

2.7.9. Resting energy expenditure

The REE will be assessed using the Fitmate® portable calorimeter (Cosmed, Italy) previously validated in other studies [60,61]. For evaluation, the patient must rest for 10–20 min prior to and throughout the measurement period. A minimum of 5 h of fasting; abstinence from alcohol; no physical activity; and abstinence from nicotine, caffeine, and other stimulants are recommended [62,63].

According to the manufacturer's instructions in previous training, the mask will be attached to the patient's face, covering the mouth and nose, and adjusted by means of elastic straps until it is firm, comfortable, and hermetically closed, eliminating possible air inlets or leaks. The reading will last 15 min, and the first five tests will be discarded. Finally, the result will be printed, and the REE of the evaluated patient will be provided [64].

2.7.10. Dietary assessment

Dietary intake will be analyzed by applying a 24-h recall (R24h) before and after the intervention on two typical days in person and on one day considered atypical by telephone. For greater quality in the collection of these data, the application of the R24h is based on the Multiple Pass Method of the U.S. Department of Agriculture [65]. Household measures will be converted into units of mass and volume using the Table for the Evaluation of Food Consumption in Household Measures, and average energy intake and macronutrients will be analyzed based on the Brazilian Table of Food Composition [66,67].

2.7.11. Feasibility and safety

The feasibility of the intervention will be evaluated based on the ability of EPA-rich fish oil supplementation, compared to placebo, to produce effects on miR-122 and FGF-21 concentrations, hepatic steatosis and fibrosis, anthropometry, body composition, energy expenditure of rest, hepatic biomarkers, biochemical evaluation of the lipid profile, carbohydrate metabolism, and inflammatory markers. The use of these clinical results allows the assessment of the potential effectiveness of the intervention and provides information for future research and evidence for the treatment of NAFLD.

Safety will be monitored through telephone contact (call and/or message) and questions about symptoms of treatment intolerance. The use of capsules should be discontinued if it is impossible to use the gastrointestinal tract and in case of diarrhea (three or more liquid bowel movements per day) or any other sign of intolerance and reintroduced after improvement of the clinical picture within 7 days. If the patient continues to have symptoms that make it impossible to return to treatment, the patient must be excluded from the research.

We have ensured that both supplements are provided by responsible companies and do not pose any risk to the health of the participants. They are regulated and sold in pharmacies. The dose of fish oil used in this research has already been tested in other studies [12,68] and is provided for our research directly from the pharmaceutical manufacturer and research contributor.

2.8. Data management

All data will be collected in standardized forms developed specifically for the present study. They will then be entered electronically into spreadsheets and stored securely and will only be

accessible by authorized members of the team, guaranteeing the confidentiality of the participants' information. The original study forms will be kept on a file and stored for a period of three years after completion of the study.

2.9. Data quality

To guarantee the quality of the data collected, the following measures will be adopted: training of researchers for a total duration of 48 h and elaboration of a standard operating procedure with instructions for the collection and preparation of biological samples in addition to the collection instruments used in the research. After data collection, the forms will be reviewed immediately by the person who applied them and later by a second reviewer to minimize possible completion errors. In addition, the research coordinators will actively participate in data collection work, supervising the progress of the processes on several occasions.

2.10. Sample size

The sample size will be calculated based on the study by Capanni et al. which assessed the effect of n-3 PUFAs in patients with NAFLD [13]. That study found no benefits in individuals from the control group and biochemical and ultrasonographic improvements in 64% of patients from the treatment group. Therefore, the following parameters were considered: significance level $\alpha = 5\%$ (bilateral), power of the $1-\beta$ test = 80%, and expected difference in the absolute delta of biochemical parameters between the relatively "large" groups (effect size > 1.0). According to GPower 3.1.9.2 for Wilcoxon-Mann-Whitney two independent groups test option, the minimum number was 18 cases per group. Assuming a dropout rate of up to 25%, 52 patients will be included in the study [13].

2.11. Statistical methods

Statistical analyses will be performed using the SPSS statistical package for Windows version 22.0. The Kolmogorov-Smirnov test will be performed to assess adherence to the normal curve to assess the symmetry of the distribution curve of the variables. Categorical variables will be expressed as absolute or relative frequencies; continuous variables with normal distribution by mean and standard deviation; and non-parametric variables as median, minimum, and maximum or IQR, as appropriate.

For the evaluation of the dependent variables between the placebo and intervention groups, the means between two groups of continuous variables will be compared using the Student's T test for independent samples, and the medians will be compared using the Dunn or Mann-Whitney test if they follow normal or non-normal distribution, respectively. Associations between categorical variables will be analyzed using a chi-square or Fisher's exact test. The contingency coefficient (C) will be used to measure the degree of association between the variables. Parametric correlations will be tested using Pearson's correlation coefficient, and non-parametric correlations will be tested using Spearman's coefficient. Differences in changes according to the allocation group will be compared using the Wilcoxon signed-rank test. The significance determination criterion will be set at 5%.

3. Discussion

The present study is the first Brazilian randomized placebo-controlled clinical trial to evaluate the effects of EPA-rich n-3 PUFA supplementation in individuals with NAFLD, evaluating several parameters associated with the disease. A systematic

review with meta-analysis published in 2020 highlighted the need for further studies to assess the dose-response of PUFA n-3 in NAFLD [12]. Thus, as a strength, it is intended to contribute evidence about the dose and time of treatment necessary for an effect on fibrosis and steatosis and to elucidate whether there is a reduction in miR-122 and FGF-21 concentrations with fish oil supplementation. Only one pilot study evaluated the modulation of miR-122 by DHA-rich n-3 PUFA in these patients [36], and only two studies evaluated FGF-21 in humans with NAFLD [30,69]. Neither of the studies that evaluated the effect of fish oil supplementation on the concentration of FGF-21 related the findings with imaging tests or biomarkers for the evaluation of liver fibrosis and steatosis.

To date, there are no approved drugs to treat NAFLD. It is important that the patient follows clinical treatment for the associated metabolic comorbidities. According to the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD), the gold standard is lifestyle change with dietary intervention and physical activity aiming to reduce body weight and improve histological parameters [1]. Thus, additional therapies, such as AGPI n-3, have been researched for the treatment of this disease [1,70,71].

Owing to its recognized effect in the treatment of hypertriglyceridemia, the AASLD recommends the use of fish oil specifically in NAFLD patients with hypertriglyceridemia [1]. The European Society for Clinical Nutrition and Metabolism consensus recognizes that, although there is a trend towards improvement in hepatic steatosis with fish oil at a dose of 4 g/day, further studies are still needed to recommend its use [70]. Considering their metabolic effects, n-3 PUFAs show potentially promising results in NAFLD by improving fibrosis, hepatic steatosis, and risk factors for disease progression [9,72–75]. MiR-122 and FGF-21 modulation are also possible pathways by which n-3 PUFAs can exert their actions in liver disease [27,30,76] although the necessary dose and duration of treatment are not clearly established.

Finally, considering the growing prevalence of NAFLD as well as its evolutionary potential for cirrhosis, the main cause of liver transplantation [77], as well as the absence of specific therapies aimed at its treatment, which is based on whether lifestyle modification has low long-term adherence, the present work can help guide guidelines on treatment options for NAFLD.

Progress of the research

Data collection is in progress until the calculated sample size is reached.

Authors contribution

Peres, WAF, Carmo MGT and Dávalos A conceptualized the study and all authors were involved in the design of the study. Peres, WAF is responsible for the oversight and leadership of research planning and execution. Salarini J and Barroso LN conduct data collection and experiments. Leite, NC and Villela-Nogueira CA contribute to the research process and data collection. All authors have read and approved the final manuscript.

Financing

This study was funded by FAPERJ - Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro [E-26/010100978/2018; E-26203.250/2017] and by the National Council for Scientific and Technological Development - CNPq [312,399/2020-0]. Vital Atman® and Ultrafarma® pharmacies facilitated the acquisition of fish oil and olive oil supplements, respectively. Funders have no association with the design, collection and interpretation of data in this study.

Availability of data and materials

Data sharing does not apply.

Ethical aspects

The protocol for this study was approved by the Research Ethics Committee of the HUCFF, nº 2.193.438, on July 31, 2017. All participants are informed about the informed consent form and sign in 2 copies, one delivered to the volunteer and the other stored in our file.

Declaration of conflict of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Acknowledgment

We would first like to thank our voluntary participants involved in the research and the scientific initiation students for their participation and help. Thanks to our technician responsible for collecting blood from patients, Regina. Thanks also to Vital Atman® and Ultrafarma® for facilitating the purchase of fish oil and olive oil supplements.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2023.06.027>.

Abbreviations

AASLD	American Association for the Study of Liver Disease
ALT	Alanine aminotransferase
AST	Aspartate aminotransferase
BAI	Body adiposity index
BMI	Body mass index
CAP	Controlled attenuation parameter
DHA	Docosahexaenoic acid
e	Exponential
EPA	Eicosapentaenoic acid
FGF-21	Fibroblast growth factor 21
HC	Hip circumference
IQR	Interquartile range
Kpa	Kilopascals
miRNAs	MicroRNAs
n-3 PUFA	n-3 Polyunsaturated fatty acids
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NC	Neck circumference
R24H	24-h recall
REE	Resting energy expenditure
RPM	Rotations per minute
THE	Transient hepatic elastography
WC	Waist circumference

References

- Chalasan N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 2018;67(1):328–57.
- Bellentani S. The epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2017;37:81–4.
- Hashimoto E, Taniai M, Tokushige K. Characteristics and diagnosis of NAFLD/ NASH. *J Gastroenterol Hepatol* 2013;28(54):64–70.
- Poynard T, Munteanu M, Charlotte F, Perazzo H, Ngo Y, Deckmyn O, et al. Impact of steatosis and inflammation definitions on the performance of NASH tests. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2018;30(4):384–91.
- Ando Y, Jou JH. Nonalcoholic fatty liver disease and recent guideline updates. *Clin Liver Dis* 2021;17(1):23–8.
- Couet C, Delarue J, Ritz P, Antoine JM, Lamisse F. Effect of dietary fish oil on body fat mass and basal fat oxidation in healthy adults. *Int J Obes* 1997;21(8):637–43.
- Logan SL, Spriet LL. Omega-3 fatty acid supplementation for 12 weeks increases resting and exercise metabolic rate in healthy community-dwelling older females. *PLoS One* 2015;10(12):1–18.
- Zhang YY, Liu W, Zhao TY, Tian HM. Efficacy of omega-3 polyunsaturated fatty acids supplementation in managing overweight and obesity: a meta-analysis of randomized clinical trials. *J Nutr Health Aging* 2017;21(2):187–92.
- Parker HM, Johnson NA, Burdon CA, Cohn JS, O'Connor HT, George J. Omega-3 supplementation and non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* 2012 Apr;56(4).
- Li YH, Yang L, Sha KH, Liu TG, Zhang LG, Liu XX. Efficacy of poly-unsaturated fatty acid therapy on patients with nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 2015;21(22):7008–13.
- Nogueira MA, Oliveira CP, Alves VAF, Stefano JT, Rodrigues ISR, Torrinas RS, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids in treating non-alcoholic steatohepatitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Nutr* 2016 Jun;35(3):578–86.
- Lee C-H, Fu Y, Yang S-J, Chi C-C. Effects of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on non-alcoholic fatty liver: a systematic review and meta-analysis. *Nutrients* [Internet] 2020 Sep 11;12(9):2769.
- Capanni M, Calella F, Biagini MR, Genise S, Raimondi L, Bedogni G, et al. Prolonged n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation ameliorates hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a pilot study. *Aliment Pharmacol Ther* 2006 Apr;20(8).
- Spadaro L, Magliocco O, Spampinato D, Piro S, Oliveri C, Alagona C, et al. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Liver Dis* 2008 Mar;40(3).
- Tanaka N, Sano K, Horiuchi A, Tanaka E, Kiyosawa K, Aoyama T. Highly purified eicosapentaenoic acid treatment improves nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol* 2008 Apr;42(4).
- Argo CK, Patrie JT, Lackner C, Henry TD, de Lange EE, Weltman AL, et al. Effects of n-3 fish oil on metabolic and histological parameters in NASH: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Hepatol* [Internet] 2015 Jan;62(1):190–7.
- Scorletti E, Bhatia L, McCormick KG, Clough GF, Nash K, Hodson L, et al. Effects of purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in nonalcoholic fatty liver disease: results from the WELCOME* study. *Hepatology* 2014 Oct;60(4).
- Afonso MB, Rodrigues PM, Simão AL, Castro RE. Circulating microRNAs as potential biomarkers in non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma. *J Clin Med* 2016;5(3).
- Dongiovanni P, Meroni M, Longo M, Fargion S, Fracanzani AL. miRNA signature in NAFLD: a turning point for a non-invasive diagnosis. *Int J Mol Sci* 2018;19(12).
- Iravani F, Hosseini N, Mojarrad M. Role of MicroRNAs in pathophysiology of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Middle East J Dig Dis* 2018;10(4):213–9.
- Tucker B, Li H, Long X, Rye KA, Ong KL. Fibroblast growth factor 21 in non-alcoholic fatty liver disease. *Metabolism* [Internet] 2019;101:153994.
- Cermelli S, Ruggieri A, Marrero JA, Ioannou GN, Beretta L. Circulating MicroRNAs in patients with chronic hepatitis C and non-alcoholic fatty liver disease Tavis JE, editor. *PLoS One* 2011 Aug 23;6(8):e23937 [Internet].
- Yamada H, Suzuki K, Ichino N, Ando Y, Sawada A, Osakabe K, et al. Associations between circulating microRNAs (miR-21, miR-34a, miR-122 and miR-451) and non-alcoholic fatty liver. *Clin Chim Acta* [Internet] 2013 Sep;424:99–103.
- Becker PP, Rau M, Schmitt J, Malsch C, Hammer C, Bantel H, et al. Performance of serum microRNAs-122, -192 and -21 as biomarkers in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *PLoS One* 2015;10(11):1–16.
- Akuta N, Kawamura Y, Suzuki F, Saitoh S, Arase Y, Kunimoto H, et al. Impact of circulating miR-122 for histological features and hepatocellular carcinoma of nonalcoholic fatty liver disease in Japan. *Hepatol Int* 2016;10(4):647–56.
- Liu XL, Pan Q, Zhang RN, Shen F, Yan SY, Sun C, et al. Disease-specific miR-34a as diagnostic marker of nonalcoholic steatohepatitis in a Chinese population. *World J Gastroenterol* 2016;22(44):9844–52.
- Baselga-Escudero L, Arola-Arnal A, Pascual-Serrano A, Ribas-Latre A, Casanova E, Salvadó M-J, et al. Chronic administration of proanthocyanidins or docosahexaenoic acid reverse the increase of miR-33a and miR-122 in dyslipidemic obese rats. *PLoS One* 2013 Jul 26;8(7).
- Fiorino S, Bacchi-Reggiani L, Sabbatani S, Grizzi F, di Tommaso L, Masetti M, et al. Possible role of tocopherols in the modulation of host microRNA with potential antiviral activity in patients with hepatitis B virus-related persistent infection: a systematic review. *Br J Nutr* [Internet] 2014 Dec 14;112(11):1751–68.
- Cione E, La Torre C, Cannataro R, Caroleo MC, Plastina P, Gallelli L. Quercetin, epigallocatechin gallate, curcumin, and resveratrol: from dietary sources to human MicroRNA modulation. *Molecules* [Internet] 2019 Dec 23;25(1):63.

- [30] Qin Y, Zhou Y, Chen SH, Zhao XL, Ran L, Zeng XL, et al. Fish oil supplements lower serum lipids and glucose in correlation with a reduction in plasma fibroblast growth factor 21 and prostaglandin E2 in nonalcoholic fatty liver disease associated with hyperlipidemia: a randomized clinical trial. *PLoS One* 2015;10(7):1–13.
- [31] Yu L, Yuan M, Wang L. The effect of omega-3 unsaturated fatty acids on non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis of RCTs. *Pakistan J Med Sci* 2017;33(4):1022–8.
- [32] Chan AW, Tetzlaff JM, Gøtzsche PC, Altman DG, Mann H, Berlin JA, et al. SPIRIT 2013 explanation and elaboration: guidance for protocols of clinical trials. *BMJ* 2013;346:1–42.
- [33] Chan AW, Tetzlaff JM, Altman DG, Laupacis A, Gøtzsche PC, Krleža-Jerić K, et al. SPIRIT 2013 statement: defining standard protocol items for clinical trials. *Jpn Pharmacol Ther* 2017;45(12):1895–904.
- [34] Babor TF, Higgins-Biddle JC, Saunders JB, Monteiro M, World Health Organization. AUDIT: the alcohol use disorders identification test: guidelines for use in primary health care. 2001.
- [35] Broekhuysen RM. Long-term storage of erythrocytes for quantitative analyses of lipids. *Clin Chim Acta* [Internet] 1974 Apr;52(1):53–8.
- [36] Cansanção K, Citelli M, Leite NC, de las Hazas MCL, Dávalos A, Do Carmo MDGT, et al. Impact of long-term supplementation with fish oil in individuals with non-alcoholic fatty liver disease: a double blind randomized placebo controlled clinical trial. *Nutrients* 2020;12(11):1–12.
- [37] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods* [Internet] 2001 Dec;25(4):402–8.
- [38] American Oil Chemists Society (AOCS). Official method Ce 2c-11. Direct methylation of lipids in foods by acid-alkal. *Off methods recompract AOCS*. AOCS; 2017.
- [39] Assumpção RP, Mucci DB, Fonseca FCP, Marcondes H, Sardinha FLC, Citelli M, et al. Fatty acid profile of maternal and fetal erythrocytes and placental expression of fatty acid transport proteins in normal and intrauterine growth restriction pregnancies. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2017 Oct;125:24–31 [Internet].
- [40] Jin X, Gao J, Zheng R, Yu M, Ren Y, Yan T, et al. Antagonizing circRNA_002581-miR-122-CPEB1 axis alleviates NASH through restoring PTEN-AMPK-mTOR pathway regulated autophagy. *Cell Death Dis* [Internet] 2020 Feb 13;11(2):123.
- [41] Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, Masutti F, Passalacqua M, Castiglione A, et al. The fatty liver index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol* 2006;6:1–7.
- [42] Angulo P, Hui JM, Marchesini G, Bugianesi E, George J, Farrell GC, et al. The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology* 2007;45(4):846–54.
- [43] Perazzo H, Benseñor I, Mill JG, Pacheco AG, Da Fonseca MDJM, Griep RH, et al. Prediction of liver steatosis applying a new score in subjects from the Brazilian longitudinal study of Adult health. *J Clin Gastroenterol* 2020;54(1):e1–10.
- [44] Newsome PN, Sasso M, Deeks JJ, Paredes A, Boursier J, Chan W, et al. Articles FibroScan-AST (FAST) score for the non-invasive identification of patients with non-alcoholic steatohepatitis with significant activity and fibrosis: a prospective derivation and global validation study. vol. 1253; 2020. p. 1–12 (19).
- [45] Cardoso AC, Villela-Nogueira C A, de Figueiredo-Mendes C, Leão Filho H, Pinto Silva RA, Valle Tovo C, et al. Brazilian Society of Hepatology and Brazilian College of Radiology practice guidance for the use of elastography in liver diseases. *Ann Hepatol* 2021;22.
- [46] Mallet V, Nalpas B, Verkarre V, Nalpas A, Pol S. FIB-4: an inexpensive and accurate marker of fibrosis in HCV infection. Comparison with liver biopsy and FibroTest.
- [47] Vilar-gomez E, Chalasani N. Review Non-invasive assessment of non-alcoholic fatty liver disease: clinical prediction rules and blood-based biomarkers. *J Hepatol* [Internet]; 2017xxx.
- [48] Gomez-Dominguez E, Mendoza J, Rubio S, Moreno-Montegudo JA, Garcia-Buey L, Moreno-Otero R. Transient elastography: a valid alternative to biopsy in patients with chronic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet] 2006 Aug;24(3):513–8.
- [49] De Lédinghen V, Vergniol J. Transient elastography (FibroScan). *Gastroenterol Clin Biol* [Internet] 2008;32(6 SUPPL 1):58–67.
- [50] Zhang X, Wong GLH, Wong VWS. Application of transient elastography in nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Mol Hepatol* 2020;26(2):128–41.
- [51] Karlas T, Petroff D, Sasso M, Fan JG, Mi YQ, Lédinghen V, et al. Individual patient data meta-analysis of controlled attenuation parameter (CAP) technology for assessing steatosis. *J Hepatol* 2017 May;66(5):1022–30.
- [52] Wong VWS, Vergniol J, Wong GLH, Foucher J, Chan HLY, Bail BL, et al. Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010 Feb;51(2):454–62.
- [53] Wong VWS, Vergniol J, Wong GLH, Foucher J, Chan AWH, Chermak F, et al. Liver stiffness measurement using XL probe in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Gastroenterol* 2012 Dec;107(12):1862–71.
- [54] Lohman TG, Roche AF, Martorell R. Anthropometric standardization reference manual. Champaign Hum Kinet Books; 1988.
- [55] Bergman RN, Stefanovski D, Buchanan TA, Sumner AE, Reynolds JC, Sebring NG, et al. A better index of body adiposity. *Obesity* [Internet] 2011 May;19(5):1083–9.
- [56] Kyle UG, Bosaeus I, De Lorenzo AD, Deurenberg P, Elia M, Gómez JM, et al. Bioelectrical impedance analysis - Part II: utilization in clinical practice. *Clin Nutr* 2004;23(6):1430–53.
- [57] Lukaski HC, Bolonchuk WW, Hall CB, Siders WA. Validation of tetrapolar bioelectrical impedance method to assess human body composition. *J Appl Physiol* [Internet] 1986 Apr 1;60(4):1327–32.
- [58] BIODYNAMICS®. Manual de instrução: monitor de composição corporal BIODYNAMICS, Modelo 310c, Versão 8.01 – internacional. Biodynamics Corporation; 1994.
- [59] Craig CL, Marshall AL, Sjöström M, Bauman AE, Booth ML, Ainsworth BE, et al. International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. *Med Sci Sport Exerc* [Internet] 2003 Aug;35(8):1381–95.
- [60] Nieman DC, Austin MD, Benezra L, Pearce S, McInnis T, Unick J, et al. Validation of cosmed's FitMate™ in measuring oxygen consumption and estimating resting metabolic rate. *Res Sports Med* 2006;14(2):89–96.
- [61] Lupinsky L, Singer P, Theilla M, Grinev M, Hirsh R, Lev S, et al. Comparison between two metabolic monitors in the measurement of resting energy expenditure and oxygen consumption in diabetic and non-diabetic ambulatory and hospitalized patients. *Nutrition* [Internet] 2015;31(1):176–9.
- [62] Compher C, Frankenfield D, Keim N, Roth-Yousey L. Best practice methods to apply to measurement of resting metabolic rate in adults: a systematic review. *J Am Diet Assoc* 2006;106(6):881–903.
- [63] Haugen HA, Chan L-N, Li F. Invited review indirect calorimetry: a practical guide for clinicians determining energy expenditure. *Nutr Clin Pract* 2007;(22):377–88.
- [64] COSMED®. Manual de Utilizador fitmate. edição xii; 2010.
- [65] Moshfegh AJ, Rhodes DG, Baer DJ, Murray T, Clemens JC, Rumlper WV, et al. The US Department of Agriculture Automated Multiple-Pass Method reduces bias in the collection of energy intakes. *Am J Clin Nutr* 2008;88(2):324–32.
- [66] Universidade de São Paulo (USP). Food research center (FoRC). Tabela brasileira de Composição de Alimentos (TBCA). Versão 71 São Paulo; 2020.
- [67] Pinheiro, ABV. Tabela para avaliação do consumo alimentar em medidas caseiras.
- [68] Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet] 2003 Feb;23(2):151–2.
- [69] Guo X-F, Wang C, Yang T, Ma W-J, Zhai J, Zhao T, et al. Concentrated fish oil ameliorates non-alcoholic fatty liver disease by regulating fibroblast growth factor 21–adiponectin axis. *Nutrition* 2022 Jul;99–100:111659.
- [70] Bischoff SC, Bernal W, Dasarthy S, Merli M, Plank LD, Schütz T, et al. ESPEN practical guideline: clinical nutrition in liver disease. *Clin Nutr* [Internet] 2020 Dec;39(12):3533–62.
- [71] Marchesini G, Day CP, Dufour JF, Canbay A, Nobili V, Ratziu V, et al. EASL-EASD-EASO clinical practice guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Obes Facts* 2016;9(2):65–90.
- [72] Calder PC. Fatty acids and inflammation: the cutting edge between food and pharma. *Eur J Pharmacol* [Internet] 2011 Sep;668:S50–8.
- [73] du Plessis J, van Pelt J, Korf H, Mathieu C, van der Schueren B, Lannoo M, et al. Association of adipose tissue inflammation with histologic severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* [Internet] 2015 Sep;149(3):635–48. e14.
- [74] Scorletti E, Byrne CD. Omega-3 fatty acids, hepatic lipid metabolism, and nonalcoholic fatty liver disease. *Annu Rev Nutr* [Internet] 2013 Jul 17;33(1):231–48.
- [75] Di Minno MND, Russolillo A, Lupoli R, Ambrosino P, Di Minno A, Tarantino G. Omega-3 fatty acids for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2012;18(41):5839–47.
- [76] Wang H, Shao Y, Yuan F, Feng H, Li N, Zhang H, et al. Fish oil feeding modulates the expression of hepatic microRNAs in a western-style diet-induced nonalcoholic fatty liver disease rat model. *BioMed Res Int* 2017;2017.
- [77] Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 2016;64(1):73–84.