

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA-FAMED
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA E
HEPATOLOGIA

**SÍNDROME METABÓLICA E HEPATOTOXICIDADE
ASSOCIADOS À EXPOSIÇÃO A SOLVENTES**

CRISTIANO OSORIO BRAUNER

Porto Alegre, Brasil

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA-FAMED
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA E
HEPATOLOGIA

**SÍNDROME METABÓLICA E HEPATOTOXICIDADE
ASSOCIADOS À EXPOSIÇÃO A SOLVENTES**

CRISTIANO OSORIO BRAUNER

Orientadora: Profa. Dra. Dvora Joveleviths

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, Brasil

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

DEDICATÓRIA

Ao meu avô, colega e amigo Paulo Osorio (in memoriam), por ter aberto as portas da sua maravilhosa biblioteca para uma criança curiosa.

Aos meus pais, Gilmar e Flora, que me deram o dom maior da vida.

À minha esposa e colega Viviane, companheira de todas as horas, por não permitir que os meus sonhos envelheçam.

Ao Pedro, nosso sonho mais lindo.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Dvora Joveleviths, minha orientadora neste estudo, pioneira no estudo da hepatotoxicologia em nosso meio, pela paciência e conselhos na execução desta obra.

Ao Dr. Mário Reis, pelo apoio à concretização deste estudo, principalmente através da realização do exame de FibroScan.

À equipe do laboratório de Hepatologia e Gastroenterologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, especialmente nas pessoas da Dra. Norma Marroni, Dra.Sílvia Bona, Dra.Elizângela Schemitt e acadêmica Raissa Nardi, pelo apoio incondicional na realização deste projeto.

Ao Dr. Wilson Hernandez, pelo apoio incondicional a este projeto e incentivo aos pesquisadores e à ciência.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela oportunidade de desenvolver este estudo, e também ao FIPE/HCPA pelo financiamento de pesquisa.

Meus agradecimentos, pelo apoio, à Caíca e ao bibliotecário Santiago Guedes Barbosa.

Aos trabalhadores voluntários que participaram deste estudo, trabalhando dignamente sob difíceis condições de trabalho, o meu reconhecimento e profundo respeito.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 SÍNDROME METABÓLICA	17
2.1.1 Conceito	17
2.1.2 Prevalência	18
2.1.3 Implicações	19
2.1.4 Etiopatogenia	20
2.2 DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA (DHGNA).....	25
2.2.2 Prevalência e Fatores de Risco	26
2.2.2.1 Fatores Genéticos.....	28
2.2.3 Causas Secundárias	30
2.2.4 História Natural.....	32
2.2.5 DHGNA/Fisiopatologia	34
2.3 ESTRESSE OXIDATIVO.....	54
2.3.1 Conceitos e Importância	54
2.3.2 EROS e ERNS	55
2.3.3 Fisiopatologia da Geração de EROS/ERNS.....	58
2.3.4 Lipoperoxidação	63
2.3.5 Inflamação/Fibrose/Morte celular	66
2.4 SISTEMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTE	68
2.4.1 Sistema Antioxidante Não Enzimático	69
2.4.2 Sistema Antioxidante Enzimático	71
2.5 DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA ASSOCIADA À TÓXICOS (<i>TAFLD/TOXICANT ASSOCIATED FATTY LIVER DISEASE</i>) E ESTEATO-HEPATITE ASSOCIADA À TÓXICOS (<i>TASH/TOXICANT ASSOCIATED STEATOHEPATITIS</i>).....	75
2.5.1 Aspectos Gerais/Fisiopatologia Básica	75
2.5.2 Solventes Orgânicos.....	84
2.5.2.1 Solventes Orgânicos: Cirrose Hepática e Câncer	97
2.5.3 Diagnóstico Laboratorial	98
2.5.4 Elastografia Transitória Hepática (FIBROSCAN)	100
3 JUSTIFICATIVA	101

4 QUESTÃO DE PESQUISA	102
5 HIPÓTESE.....	103
6 OBJETIVOS	104
6.1 OBJETIVO GERAL.....	104
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	104
6.2.1 Estabelecer a frequência de síndrome metabólica em 2 populações (uma exposta e outra não exposta a solventes).	104
6.2.2 Analisar lesão hepatocelular através da dosagem sérica de alanina aminotransferase (ALT).	104
6.2.3 Analisar estresse oxidativo através das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) e da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e glutathione S-transferase (GST) nas duas populações.	104
6.2.4 Avaliar o grau de fibrose através da realização de elastografia transitória hepática (FibroScan) nas duas populações.	104
7 POPULAÇÃO E MÉTODOS.....	105
7.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO	105
7.2 CALCULO DE TAMANHO DE AMOSTRA.....	105
7.3 POPULAÇÃO EM ESTUDO	105
7.4 ANÁLISE CLÍNICO-LABORATORIAL	106
7.5 ELASTOGRAFIA TRANSITÓRIA HEPÁTICA (FIBROSCAN)	109
8 RESULTADOS	111
9 DISCUSSÃO	115
10 CONCLUSÃO.....	120
11 ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS.....	121
12 PERSPECTIVAS E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	143
REFERÊNCIAS	144
APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	
-CASOS	172
APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	
-CONTROLES.....	175
APÊNDICE C – FICHA DE PESQUISA	178

RESUMO

Introdução: A Síndrome

Metabólica ocasiona alterações significativas no metabolismo, sendo a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) a manifestação hepática mais frequente e o estresse oxidativo um dos principais *hits* envolvidos na evolução da doença. Produtos químicos como solventes orgânicos, que são conhecidos fatores causais de DHGNA (TASH/Toxicant Associated Steatohepatitis), podem estar envolvidos na etiopatogenia da doença. **Objetivos:** Avaliar a associação de exposição química a solventes com síndrome metabólica e estresse oxidativo. **População e Métodos:** Estudo transversal composto por 70 trabalhadores, todos do sexo masculino, sendo 30 expostos a risco químico ocupacional e 40 sem evidência de exp

O primeiro grupo foi selecionado entre trabalhadores expostos de maneira frequente a solventes orgânicos em empresas de grande porte de Porto Alegre/RS e região metropolitana durante a jornada de trabalho. O segundo grupo foi selecionado entre trabalhadores da área administrativa de diferentes empresas, sem exposição a risco químico ocupacional. Foram excluídos da amostra etilistas, drogaditos, tabagistas, usuários de medicações hepatotóxicas, portadores de hepatite B e C ou doença hepática conhecida, portadores de hemocromatose, mulheres, menores de 18 anos, maiores de 65 anos e pacientes com IMC (índice de massa corporal) >30. Foram realizados anamnese, exame físico e exames laboratoriais em todos os pacientes. Diagnóstico de Síndrome Metabólica foi realizado conforme os critérios do NCEP-ATPIII. Lipoperoxidação foi avaliada através de análise das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). Foi avaliada a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) e a atividade da enzima glutatona S-transferase (GST). Dados quantitativos foram descritos por mediana e amplitude interquartil (percentil 25-75). Dados categóricos apresentados por contagens e percentuais. As comparações de dados quantitativos foram realizadas pelo teste U de Mann-Whitney e das categóricas pelo teste do qui-quadrado da razão de verossimilhança. Elastografia transitória hepática foi realizada para avaliação de fibrose hepática, através de sonda M, utilizando o valor da mediana de aquisições de sucesso. **Resultados:** grupo exposto apresentou maiores níveis de ALT (alanina aminotransferase) do que o não exposto (33,3% x 10,5%), assim como TBARS-1,73 (1,41-1,88) x 0,22 (0,13-1,12) nmol/mg prot., SOD-7,29 (4,30-8,91) x 3,48 (2,98-5,28) USOD/mg de prot. e GST-2,57(1,80-4,78)x 1,81(1,45-2,30) µM/min/mg de prot. Síndrome metabólica foi mais frequente no grupo exposto (10,0%x 5,0%), mas não atingiu significância estatística (p:0,424). HDL<40 mg/dl foi

encontrado em 26,7% x 7,5% (p:0,029). **Conclusão:** Não houve correlação de síndrome metabólica com risco químico, mas houve níveis menores de HDL e evidência de hepatotoxicidade significativa no grupo exposto a solventes, indicando provável risco químico ambiental.

Palavras-chaves: Síndrome metabólica. Estresse oxidativo. Risco químico. Solventes.TASH.

ABSTRACT

Introduction: Metabolic Syndrome causes significant alterations in the metabolism, and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most frequent hepatic manifestation and oxidative stress one of the main hits involved in the evolution of the disease. Chemical products such as organic solvents, that are known causal factors of NAFLD (TASH/Toxicant Associated Steatohepatitis), may be involved in the etiopathogeny of the disease. **Objectives:** To evaluate the association between chemical exposure to solvents and metabolic syndrome and oxidative stress. **Methods:** Cross-sectional study composed by 70 workers, all of them male, 30 of them exposed to occupational chemical risk and 40 without evidence of exposure. The first group was selected among workers frequently exposed to organic solvents in large companies in Porto Alegre/RS and the Metropolitan Region, during the workday. The second group was selected among workers in the administrative area of different companies, without exposure to occupational chemical risk. Alcoholics, drug addicts, smokers, users of hepatotoxic medications, people with hepatitis B and C or known liver disease, hemochromatosis, women, people below the age of 18 years and over the age of 65 and patients with a BMI (Body Mass Index) >30 were excluded from the sample. A history was taken and physical examination and laboratory tests were performed in all patients. The diagnosis of metabolic syndrome was made according to the criteria of NCEP-ATPIII. Lipoperoxidation was evaluated by analysis of the substances that react with the thiobarbituric acid (TBARS). The activity of the antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD) and the activity of glutathione S transferase (GST) were evaluated. Quantitative data were described by median and interquartile range (percentile 25-75). Categorical data were presented by counts and percentages. The quantitative data were compared by the Mann-Whitney U test and the categorical ones by the Chi-square test of likelihood ratio. Fibroscan was performed to evaluate liver fibrosis using the M probe with the median value of acquisitions of success. **Results:** Exposed group had higher levels of ALT (alanine aminotransferase) than non-exposed one (33.3% x 10.5%), and also TBARS-1.73 (1.41-1.88) x 0.22 (0.13-1.12) nmol/mg prot., SOD-7.29 (4.30-8.91) x 3,48 (2.98-5.28) USOD//mg de prot and GST -2.57 (1.80-4.78) x 1.81 (1.45x2.30) μ M/min/mg de prot. Metabolic syndrome occurred most frequently in the exposed group (10.0%x5.0%), but did not attain statistical significance (p:0.424). HDL<40 mg/dl was found in 26.7% x 7.5% (p: 0.029). **Conclusion:** there was no correlation between metabolic syndrome and chemical risk, but there

was lower HDL levels and evidence of significant hepatotoxicity in the group exposed to solvents, indicating probable environmental chemical risk.

Keywords: Metabolic syndrome. Oxidative stress. Chemical risk. Solvents. TASH.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATF 6	<i>Activating transcription factor 6</i>
ATP	Trifosfato de adenosina
COVS	Componentes Orgânicos Voláteis
DAMP	<i>Damage – associated molecular pattern</i>
DHGNA	Doença Hepática Gordurosa Não Alcólica
EHNA	Esteato Hepatite Não Alcólica
ERO-1	<i>Endoplasmic reticulum oxidoreductin 1</i>
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FAD	Dinucleotídeo de flavina-adenina
GPx	Glutaciona Peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
GR	Glutaciona redutase
GST	Glutaciona S-Transferase
IL-1B	Interleucina 1-B
IL- 6	Interleucina 6
IL-18	Interleucina 18
IRE 1	<i>Inositol-requiring enzyme 1</i>
JNK	<i>c-JUN N-Terminal Kinase</i>
MDA	Malondialdeido
NAD	Dinucleotídeo de adenina nicotinamida oxidada
NADH	Dinucleotídeo de adenina nicotinamida reduzida
NAFLD	<i>Nonalcoholic Fatty Liver Disease</i>
NASH	<i>Non Alcoholic Steato Hepatitis</i>
NFKB	<i>Fator Nuclear Kappa B</i>
NQO1	NADPH quinone oxidoreductase 1
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PERK	<i>Protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase</i>
PPAR-alfa	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor alpha</i>
Prx	Peroxiredoxinas
SOD	Superóxido Dismutase
TAFLD	<i>Toxicant Associated Fatty Liver Disease</i>
TASH	<i>Toxicant Associated Steato Hepatitis</i>
TNF-alfa	Fator de necrose tumoral alfa
Trx	Tioredoxina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - História natural da DHGNA	33
Figura 2 - Modelo dos múltiplos <i>hits</i>	52
Figura 3 - Geração de EROS/Reação de Fenton e Haber-Weiss.....	57
Figura 4 - Fontes endógenas geradoras de EROS/ERNS	59
Figura 5 - Fontes exógenas geradoras de EROS/ERNS	60
Figura 6 - Mecanismo Básico da Lipoperoxidação	63
Figura 7 - Fatores que influenciam o estresse oxidativo hepático.....	66
Figura 8 - Enzimas antioxidantes e suas principais reações químicas	75
Figura 9 - Geração de estresse oxidativo por xenobióticos	83
Figura 10 - Porcentagem de elevação de ALT em expostos e não expostos.....	112
Figura 11 – Tempo de Exposição	112
Figura 12 - Avaliação de TBARS em expostos e não expostos	113
Figura 13 - Comparação da atividade de SOD em expostos e não expostos	114
Figura 14 - Comparação da atividade de GST em expostos e não expostos.....	114

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Principais Causas Secundárias de DHGNA	31
Quadro 2 - Principais espécies reativas de oxigênio e nitrogênio	55
Quadro 3 - Intensidade da exposição a solventes conforme a ocupação profissional.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Agentes químicos associados com esteatohepatite	99
Tabela 2 – Características dos pacientes	111
Tabela 3 - Tabela comparativa da síndrome metabólica e os seus componentes entre os grupos	111
Tabela 4 – Comparação de HDL e ALT entre os pacientes	113

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento urbano e industrial moderno foi acompanhado da manufatura e processamento de um grande número de matérias-primas para atender a uma crescente demanda de mercado. Entretanto, não houve um dimensionamento do impacto deste grande número de processos industriais, envolvendo muitas substâncias químicas de potencial hepatotóxico evolutivo incerto, sobre a saúde dos seres humanos. Isto significa dizer que milhões de pessoas estão expostas diariamente a produtos químicos no ambiente ocupacional e ambiental, e muitas vezes os próprios profissionais de saúde desconhecem os efeitos de sua ação tóxica, em virtude dos raros estudos existentes sobre este tema.

Sabemos que muitos xenobióticos são capazes de causar injúria hepática, incluindo formas graves de esteato-hepatite com insuficiência hepática aguda, cirrose hepática e câncer hepático e extra-hepático.

Muitos destes tóxicos causam lesão de forma assintomática ou subclínica e os métodos comumente disponíveis para rastreamento de hepatotoxicidade costumam ser insuficientes para uma análise real de dano.

Solventes orgânicos estão entre os principais produtos químicos de uso industrial e doméstico, e a sua toxicidade não tem sido adequadamente avaliada. Além disto, existe a suspeita de que muitos produtos tóxicos, incluindo solventes, possam causar desequilíbrio endócrino e desordens metabólicas.

O presente estudo teve como objetivo estudar a associação de Síndrome Metabólica e hepatotoxicidade com o risco químico em uma população de trabalhadores da indústria de Porto Alegre e região metropolitana expostos a solventes orgânicos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 SÍNDROME METABÓLICA

2.1.1 Conceito

A Síndrome Metabólica, também denominada Síndrome X ou Síndrome de resistência à Insulina, é um distúrbio metabólico multifatorial decorrente da interação de fatores genéticos e ambientais que interagem entre si.

Embora em 1920 Kylin já tenha sugerido a associação de alterações metabólicas concomitantes, o conceito atual da Síndrome é creditado a Reaven, que em 1988 a descreveu como Síndrome X, enfatizando a associação entre fatores de risco cardiovascular tais como dislipidemia, hipertensão arterial sistêmica e hiperglicemia.¹

Esta constelação de fatores de risco comprovadamente acarreta danos potenciais à saúde, como diabetes e doenças cardiovasculares, dimensionando a relevância do estudo do seu impacto sobre o nosso organismo.

Existe uma falta de consenso em relação à definição de síndrome Metabólica na literatura. Optou-se por utilizar os critérios da NCEP-ATPIII (*National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III*) de 2001 (revisados em 2004) por serem mais flexíveis, sem a obrigatoriedade de utilizar circunferência abdominal como parâmetro fixo, como proposto pelos critérios da *International Diabetes Federation* (IDF).

Conforme a NCEP-ATPIII, o diagnóstico de Síndrome Metabólica é realizado na presença de pelo menos 3 dos seguintes:

- Circunferência abdominal > 88 cm em mulheres e > 102 em homens;
- Glicemia de Jejum \geq a 100 mg/dl ou tratamento para DM;

- Triglicérides \geq a 150 mg/ dl ou tratamento antilipemiante;
- Pressão arterial \geq 130/85 mm Hg ou tratamento para Hipertensão Arterial;
- Colesterol HDL $<$ 40 mg/dl em homens e $<$ 50 mg/ dl em mulheres.²

2.1.2 Prevalência

A Síndrome Metabólica está diretamente relacionada com o aumento global da prevalência de obesidade³, mas dados preliminares sugerem que 20% da população geral obesa está livre de desordens metabólicas, sugerindo que biomarcadores específicos poderiam auxiliar a identificar indivíduos obesos de maior risco.⁴

A obesidade está alcançando proporções epidêmicas, com estimativa atual de 1,4 bilhão de pessoas obesas ao redor do mundo.⁵ Mais de 2/3 dos adultos americanos apresentam sobrepeso ou obesidade.⁶

No Brasil, a análise de tendência secular indica que a obesidade entre adultos está em expansão e segundo dados da Pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL), de 2006-2016 o excesso de peso na população brasileira cresceu de 42,6% para 53,8% e a prevalência de obesidade passou de 11,8% para 18,9% .⁷

Em relação a Síndrome Metabólica, dependendo dos critérios utilizados e das características da população estudada, as taxas variam de 12,4% a 28,5% em homens e de 10,7% a 40,5% em mulheres.^{8,9,10,11}

Esta ampla variação é decorrente de múltiplas variáveis, como idade, sexo, raça, etnia, escolaridade, hábitos de vida e critérios diagnósticos utilizados.

A estimativa da International Diabetes Federation (IDF) é de que aproximadamente 25% da população mundial tenha síndrome metabólica.¹²

No Brasil, um estudo transversal na cidade de São Paulo demonstrou prevalência de Síndrome Metabólica de 30,3% em adultos e uma revisão sistemática indicou prevalência de Síndrome Metabólica de 29,6% (14,9%-65,3%) na população brasileira.^{13,14}

Nos Estados Unidos, a prevalência de Síndrome Metabólica relatada foi de 23,7%, conforme dados do pioneiro estudo NHANES III.¹⁵ Dados mais recentes, entretanto, estimam que cerca de 1/3 da população americana possua Síndrome Metabólica.¹⁶

A síndrome metabólica torna-se mais prevalente com o avanço da idade (10 % entre indivíduos de 20-29 anos, 20% entre 40-49 anos e 45% entre 60-69 anos).¹⁵

A distribuição nos Estados Unidos variou de acordo com a raça/etnia, tendo sido de 31,9% entre americanos de ascendência hispânica, 23,8% nos brancos não hispânicos e 21,6% em afrodescendentes.¹⁵

Em relação ao sexo, a distribuição variou de 8%-43% no sexo masculino e de 7-56% no sexo feminino; entretanto, após a menopausa, alguns estudos relataram alta incidência no sexo feminino (32,6-41,5%).¹⁷

2.1.3 Implicações

A Síndrome Metabólica é significativa porque está relacionada não somente ao desenvolvimento de cada fator de risco individualmente, mas também ao agravamento e potencialização destes fatores de risco.

O estudo Decode demonstrou aumento da mortalidade de todas as causas, assim como por doenças cardiovasculares, em pacientes não diabéticos com Síndrome Metabólica.¹⁸

Uma meta-análise publicada por Ford em 2005 mostrou que o risco relativo para diabetes mellitus era de 2,99 (1,96-4,57) em pacientes com diagnóstico de síndrome metabólica.¹⁹

Outra metanálise de Motillo e col. de 2010 associou a síndrome com um aumento de 2 vezes no risco de eventos cardiovasculares e 1,5 vezes na mortalidade por todas as causas.²⁰

O risco de acidente vascular encefálico é 2-4 vezes maior nestes pacientes.²¹

A American Cancer Society estima que 20% dos novos casos de câncer de todos os tipos estejam relacionados a obesidade, um fator de risco comum a maioria dos casos de síndrome metabólica.²²

Hipertensão arterial sistêmica é um componente central da síndrome metabólica, geralmente relacionada à resistência insulínica e obesidade.

Insuficiência renal e microalbuminúria, por consequência, também podem acompanhar a síndrome.

2.1.4 Etiopatogenia

Fatores genéticos tem sido implicados nesta desordem, tendo sido identificados vários polimorfismos e variantes gênicas associados à Síndrome Metabólica; entretanto, uma base genética unificada explicando a co-ocorrência de seus componentes não foi estabelecida até o momento.²³

Lemieux e colaboradores tem destacado a importância da obesidade visceral como um componente central da síndrome.²⁴

Evidências indicam que a síndrome Metabólica inicia com o excesso de adiposidade intra-abdominal, como parte de um fenótipo que inclui expansão disfuncional do tecido adiposo subcutâneo e armazenamento ectópico de triglicerídeos, estando esta condição intimamente relacionada com risco cardiovascular.²⁵

Idade, sexo, genética e etnia estão entre os fatores que podem contribuir para a variação de distribuição da gordura visceral; mecanismos específicos envolvem hormônios sexuais,

hormônio de crescimento, síntese local de cortisol no tecido adiposo abdominal, endocanabinóides e dieta rica em frutose.²⁵

A maior atividade metabólica do tecido abdominal visceral, com atividade lipolítica exacerbada na síndrome metabólica, contribuem para liberação de grande quantidade de ácidos graxos.

O tecido adiposo é capaz de responder de forma rápida e dinâmica quando submetido a excesso de nutrientes, através de hipertrofia (aumento de tamanho) e hiperplasia (aumento do número) dos adipócitos; estas alterações podem reduzir o suprimento sanguíneo dos adipócitos e induzir hipóxia, a qual tem sido considerada o gatilho para as alterações inflamatórias e a disfunção dos adipócitos, as quais também contribuem para o surgimento de resistência insulínica.¹⁴

Hipóxia tem sido proposta como iniciadora da infiltração de macrófagos e necrose do tecido adiposo e da produção de mediadores inflamatórios como fator de necrose tumoral alfa (TNF alfa) e interleucina6 (IL-6).¹⁴ Além disto, a inflamação contribui para o surgimento de resistência insulínica, seja pela desregulação de adipocinas do hepatócito causada pelo ambiente inflamatório, seja pela ação quimiotática de mediadores, como o TNF alfa.²⁶ Muitos destes marcadores inflamatórios são gerados em macrófagos residentes do tecido adiposo.

Gordura intra-abdominal é reconhecida agora como um órgão endócrino ativo, secretando uma variedade de citocinas (adipocinas) inflamatórias, incluindo leptina, resistina, interleucinas e fator de necrose tumoral, mas também anti-inflamatórias (como adiponectina), os quais são importantes fatores de regulação energética.²⁷ Substâncias pró-trombóticas também estão aumentadas nestes pacientes.

Podemos considerar a Síndrome Metabólica, portanto, um estado pró-inflamatório e pró-trombótico.²⁸

A adiponectina é uma citocina anti-inflamatória produzida exclusivamente pelos adipócitos, que aumenta a sensibilidade da insulina e inibe muitos passos do processo inflamatório (antagonizando por exemplo o Fator de Necrose Tumoral alfa/TNF-alfa). TNF alfa e IL-6 secretados pelos macrófagos no tecido adiposo causam supressão da síntese de adiponectina.²⁹ Em ratos, a diminuição da concentração circulante de adiponectina mostrou-se importante na reprodução de alterações do metabolismo consistentes com a Síndrome Metabólica.³⁰

Existe uma relação inversa entre adiponectina e tecido adiposo, especialmente visceral.

A adiponectina também mostrou, no fígado, ser capaz de inibir a gliconeogênese hepática, estando também implicada na patogênese da doença hepática gordurosa não alcoólica, o que será melhor discutido juntamente com DHGNA.

Leptina, uma proteína expressa principalmente no tecido adiposo e relacionada com a saciedade e metabolismo energético, possui a maioria dos receptores no hipotálamo e no tronco cerebral; os níveis de leptina aumentam no plasma durante o desenvolvimento de obesidade sem suprimir o apetite, significando resistência à leptina.¹⁴

Resistência à leptina tem sido correlacionada com o aumento de triglicérides em órgãos não adiposos (como músculo e fígado), sendo o seu aumento na circulação uma evidência alternativa de Síndrome Metabólica.³¹ O aumento dos níveis plasmáticos de leptina correlaciona-se com maior síntese de citocinas inflamatórias, estresse oxidativo e resistência insulínica.

Resistina é também uma adipocina secretada pelos adipócitos, células mononucleares no sangue periférico (macrófagos e monócitos) e células estreladas do fígado, e promove ambos inflamação e resistência insulínica em modelos animais; níveis circulantes de resistina estão aumentados em ratos obesos e se correlacionam com resistência insulínica.³²

Outras adipocinas inflamatórias e anti-inflamatórias tem sido estudadas, como visfatina, chemerina, RBP-4(*retinol-binding protein 4*), adiposina, obestatina, omentina e vaspina ou serpina12 (*VAT-derived serine protease inhibitor*); entretanto o seu papel na síndrome metabólica (principalmente na DHGNA) ainda precisa ser melhor compreendido. O acúmulo de gordura visceral leva a uma desregulação, em última análise, do adipócito, que passa a sintetizar produtos biologicamente ativos de forma desorganizada.³²

Como mencionado, expansão, inflamação e desregulação endócrina do tecido adiposo podem desencadear resistência insulínica, a qual é considerada elemento-chave na fisiopatologia da síndrome, a ponto de ser chamada de síndrome da resistência insulínica.³³

Resistência insulínica é definida como uma condição fisiopatológica na qual uma concentração normal de insulina não produz uma resposta normal de captação de glicose em tecidos alvo, como tecido adiposo, muscular e hepático.¹⁴

Evidências sugerem que os ácidos graxos e seus metabólitos, como ceramidas e diacilglicerol, podem prejudicar a sinalização de insulina através de vias de sinalização como PKC (*protein kinase C*), MAPK (*Mitogen -Activated-Protein -Kinase*), JNK (*c-Jun N- terminal kinase*) e o inibidor do fator nuclear kB kinase.³² Estresse oxidativo também pode colaborar para o estabelecimento de resistência insulínica nos tecidos periféricos (adiposo e musculoesquelético) através de alterações nas vias de sinalização da insulina, resultando em diminuição da expressão da proteína transportadora de glicose (GLUT4/glucose transporter 4) nas membranas plasmáticas; GLUT 4 é o principal responsável pela captação de glicose pelas células a partir do sangue.³⁴

Insulina desempenha um papel importante no metabolismo lipídico, já que a combinação com o seu receptor promove a esterificação de ácidos graxos, o armazenamento dos ácidos graxos em gotículas lipídicas e também inibe a lipólise.²⁶

Uma vez instalada, a resistência insulínica é seguida de hiperinsulinemia, acarretando diminuição da utilização periférica da glicose e estímulo à gliconeogênese hepática. Promove também a degradação de moléculas de triglicerídeos (como geralmente estão acumulados os ácidos graxos) do tecido adiposo através das lipases do tecido adiposo, além de estimular a lipogênese de novo (síntese hepática de ácidos graxos), aumentando a oferta total de ácidos graxos e realimentando assim o ciclo.³

Os receptores nucleares PPAR (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*), presentes tanto no tecido adiposo quanto nas células hepáticas, funcionam como sensores lipídicos que regulam o metabolismo dos lipídeos e da glicose, contrapondo a resistência insulínica; sua atividade é altamente influenciada pelo estado nutricional e pela oferta de ácidos graxos.³²

Os receptores nucleares PPAR são uma única superfamília subdividida em três subtipos:

- a) PPAR alfa, expresso predominantemente no fígado (envolvido no catabolismo de ácidos graxos);
- b) PPAR beta, expresso principalmente no tecido musculoesquelético;
- c) PPAR gama, expresso principalmente no tecido adiposo.³⁵

O PPAR gama, frequentemente encontrado no tecido adiposo, é considerado o regulador máster da adipogênese e diferenciação celular do tecido adiposo; promove, principalmente quando exposto a grandes quantidades de ácidos graxos e glicose (ligantes), respostas biológicas como: modulação da transcrição de genes envolvidos no metabolismo da glicose e dos lipídios, captação celular de glicose (através de expressão de GLUT 4), captação e armazenamento de ácidos graxos, expressão e secreção de adiponectina, entre outros.³⁵

A adipogênese permite que novos pequenos adipócitos insulino-sensíveis sejam formados através de fatores de transcrição (já que os hipertrofiados tendem a ser mais resistentes à ação da insulina).³⁵

Estas respostas atuam benéficamente na sensibilização da insulina, contrapondo a resistência insulínica determinante da síndrome metabólica.³⁶

2.1.5 Síndrome Metabólica e Risco Químico

Existe atualmente uma evidência substancial que a desregulação endócrina decorrente de exposição química contribui para o risco de câncer, diabetes e possivelmente também de obesidade e síndrome metabólica.³⁷

O grupo de moléculas identificadas como capazes de causar desregulação endócrina é altamente heterogêneo e inclui químicos sintéticos utilizados como solventes/ lubrificantes, componentes plásticos, agentes farmacêuticos, pesticidas e metais pesados como cádmio e chumbo.³⁷

Além disto, de acordo com uma revisão de Alonso-Magdalena, um amplo espectro de compostos, tais como dioxina, pesticidas e bisfenol mostraram-se capazes de causar resistência insulínica e alteração no funcionamento das células beta pancreáticas em modelos animais, gerando estados metabólicos caracterizados por resistência insulínica e hiperinsulinemia.³⁷

Agentes tóxicos podem interferir com a síntese, secreção, transporte, ativação e eliminação de hormônios; podem alterar a sinalização de receptores nucleares (como receptores da tireóide, do estrogênio e da progesterona), modificar atividade de enzimas e fatores de transcrição e agir sobre genes.³⁸

Além disto, alguns tóxicos podem ter como alvo PPAR gama, regulador da adipogênese e uma importante rota para o desenvolvimento de obesidade.³⁸

2.2 DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA (DHGNA)

2.2.1 Conceitos:

Doença hepática gordurosa não alcoólica (também conhecida como NAFLD/*Non Alcoholic Fatty Liver Disease*), é definida pela presença de esteatose hepática (identificada por exames de imagem ou histologia) após exclusão de outras causas secundárias de acúmulo de gordura hepática, como consumo abusivo de álcool.³⁹

Esteatose hepática é definida como a presença de \geq 5% de infiltração de gordura nos hepatócitos, sem evidência de injúria hepatocelular na forma de balonização dos hepatócitos.³⁹

Esteatohepatite não alcoólica (EHNA), também conhecida como NASH (*Nonalcoholic steatohepatitis*) caracteriza-se pela presença de esteatose hepática, inflamação e injúria hepatocelular (balonização), com ou sem fibrose.³⁹

2.2.2 Prevalência e Fatores de Risco

Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA), está fortemente associada à Síndrome Metabólica, sendo considerada comumente a manifestação hepática da síndrome.⁴⁰

Entretanto, é importante salientar que apesar de a Síndrome Metabólica ser o principal fator de risco para DHGNA, nem todos os pacientes com DHGNA apresentam obesidade ou Síndrome Metabólica.⁴¹

DHGNA é considerada atualmente a doença hepática crônica mais prevalente no mundo e uma das principais causas de cirrose hepática e carcinoma hepatocelular.⁴¹ É também a causa mais frequente de aumento isolado de transaminases, quando se exclui outras causas como uso de álcool e hepatites⁴².

A prevalência de DHGNA é maior em populações com condições metabólicas preexistentes, como obesidade, dislipidemia e diabetes mellitus.⁴³

DHGNA afeta cerca de 25% da população global.⁴⁴ A prevalência é de 80-90% entre obesos.⁴⁵ Em pacientes com obesidade mórbida, este valor pode atingir 85-98%.⁴⁶

Obesidade central é fator de risco para DHGNA, mesmo com índice de massa corporal (IMC) normal.⁴⁷

Condições associadas à obesidade, como Síndrome da Apnéia Obstrutiva do Sono (SAOS), também aumentam o risco de NAFLD; outras doenças como hipotireoidismo, hipogonadismo e mesmo fatores dietéticos como ingestão excessiva de frutose e carboidratos refinados tem sido evocados na gênese da doença.⁴¹

Diabetes mellitus também é considerado um fator de risco maior para o desenvolvimento de DHGNA, havendo uma variação de prevalência de 29,6-87,1% em diferentes estudos; uma metanálise recente relatou 59,67% de prevalência de DHGNA em pacientes diabéticos.⁴⁸

Cabe lembrar que ambos (DHGNA e DM) apresentam resistência insulínica como um fator patogênico comum e que obesidade oferece um risco adicional para o estabelecimento de DHGNA.

A associação de Diabetes Mellitus e obesidade oferece risco adicional: entre os diabéticos severamente obesos o risco de DHGNA em algumas séries atingiu 100% e o de EHNA 50%.⁴⁹

Além disto, DHGNA é um fator preditor para diabetes tipo II, já que ambos estão linkados por mecanismos patogênicos comuns, como resistência insulínica, hiperinsulinemia, inflamação, desordem do metabolismo lipídico e estresse oxidativo.⁵⁰ Evidências também sugerem que pacientes diabéticos possuam alto risco para NASH, com diferentes graus de

fibrose hepática; em adição a isto, história familiar de diabetes também aumenta o risco de NASH em pacientes não diabéticos.⁵⁰

Dislipidemia também possui relação estreita com DHGNA, já que por definição a homeostasia dos lipídios está desordenada nestes pacientes.

A prevalência de DHGNA em pacientes com dislipidemia tem sido estimada em 50%.³⁹

Níveis de HDL (*High Density Lipoprotein*) abaixo do normal praticamente dobram o risco de DHGNA, enquanto na hipertrigliceridemia ele triplica.⁵¹

Sexo, idade e raça também tem sido implicados como fatores de risco para DHGNA. Numerosos estudos tem apontado que DHGNA e EHNA são mais comuns em homens (2x mais que em mulheres); em mulheres tornam-se mais frequentes com o avançar da idade, provavelmente por alterações hormonais pós-menopausa, refletindo a perda do efeito protetivo do estrogênio contra a doença.⁵²

A prevalência de DHGNA é maior entre indivíduos hispânicos (45%), seguidos por não hispânicos (33%) e afrodescendentes (24%).⁵³

A prevalência de DHGNA parece aumentar com a idade. Um estudo realizado no Japão encontrou um pico de prevalência entre 40-49 anos de idade, enquanto outro estudo chinês encontrou um pico entre adultos a partir de 65 anos.⁵⁴

2.2.2.1 Fatores Genéticos

Quanto aos fatores genéticos, alguns estudos estimam predisposição genética de DHGNA na ordem de 35-40%, mesmo após ajustar idade, sexo, raça e IMC.⁵⁵ Vários genes que modulam passos cruciais do metabolismo da glicose e dos lipídios, inflamação e fibrogênese estariam implicados no desenvolvimento da doença.

Polimorfismo dos genes TM6SF2 (*transmembrane 6 superfamily member 2*) e PNPLA 3 (*patatin-like phospholipase-3*) está relacionado com o surgimento de DHGNA e pode haver efeito aditivo entre eles (aumento na síntese de triglicerídeos).⁵⁶ Polimorfismo de PNPLA3 está linkado com todos os estágios de DHGNA, enquanto o de TM6SF2 parece aumentar o risco de progressão para EHNA.⁴¹

Estudos demonstraram que PNPLA3 está associado com o desenvolvimento de esteatose (indivíduos homozigotos GG apresentaram 73% mais depósito de gordura comparados com homozigotos CC) e progressão para fibrose (homozigotos GG tem um risco 3,2 vezes maior que homozigotos CC).⁵⁷

PNPLA-3 codifica adiponutrina, uma lipase que regula o metabolismo dos triglicerídeos, e certos polimorfismos, como o I148-M são fortemente associados com estato-hepatite, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular.⁵⁸ Aumento da expressão da variante I148M em ratos aumenta a síntese de ácidos graxos e prejudica a hidrólise de triglicerídeos, com conseqüente acúmulo de triglicerídeos.⁵⁹ TM6SF2 também codifica uma proteína que regula o conteúdo lipídico do hepatócito (proteína transportadora de lipídeos); polimorfismos em que há diminuição na síntese de lipoproteínas e apolipoproteína B reduzem a síntese de VLDL e estão relacionados com EHNA e fibrose.^{58,59}

Alterações epigenéticas consistem em alterações a nível transcricional que afetam a expressão de genes; metilação aberrante de DNA (a principal), modificações na histona e alterações no RNA (todos eles influenciados por dieta e metabólitos) estão relacionados com o desenvolvimento e progressão de EHNA.⁵⁹

A prevalência de EHNA é de 2-5% na população geral.⁶⁰

Em pacientes obesos, a prevalência de EHNA é de 19%, e entre obesos mórbidos é de 50%.⁴¹

Em diabéticos, a presença de fibrose variou de 22%-60% em diferentes estudos.⁵⁰

2.2.3 Causas Secundárias

As causas primárias de DHGNA, como já discutido, são portanto diabetes, obesidade e dislipidemia.

Outras condições clínicas menos frequentes devem ser consideradas em pacientes que apresentam DHGNA, mas não apresentam fatores de risco tradicionais, sendo consideradas causas secundárias de DHGNA. O Quadro 1 resume as principais causas secundárias de DHGNA.⁴⁹

Quadro 1 – Principais Causas Secundárias de DHGNA

NUTRICIONAL	METABÓLICO OU GENÉTICO	DROGAS	HEPATOTOXINAS AMBIENTAIS	OUTROS
Desnutrição	Lipodistrofia	Corticóides	Solventes Orgânicos	Supercrescimento Bacteriano
Nutrição Parenteral	Disbetalipoproteinemia	Estrogênios Sintéticos	Produtos Petroquímicos	Hepatite C
Perda de Peso Abrupta	Esteatose Hepática Aguda da Gestação	Aspirina	Fósforo	
Cirurgia Bariátrica	Doença de Wolman (Deficiência de Lipase Ácida Lisossomal)	Tamoxifeno		
	Doença de Weber-Christian	Amiodarona		
	Doença de Wilson	Metotrexate		
		Bloqueadores dos Canais de Ca		
		Tetraciclina		
		Ácido Valpróico		
		Antiretrovirais		
		Cocaína		

Fonte: Adaptado de Paul Ângulo (2002)⁴⁹

Perda rápida de peso e *by-pass* jejuno-ileal são fatores de risco para DHGNA; aproximadamente 2,2%-6% dos pacientes com perda abrupta de peso apresentam anormalidades hepáticas durante os primeiros 18 meses.⁶¹

Nutrição parenteral pode causar depleção de carnitina, um componente necessário para transferir os ácidos graxos hepáticos do citoplasma para a mitocôndria, a fim de sofrerem B-oxidação.⁵³

As medicações mais implicadas como fatores causais de DHGNA são amiodarona, tetraciclina, glicocorticoides e zidovudina.⁶¹

O papel das hepatotoxinas, especialmente solventes orgânicos, no surgimento da DHGNA, é um assunto de interesse crescente, já que solventes são amplamente utilizados no ambiente industrial (conforme detalhado no item 2.5).

2.2.4 História Natural

DHGNA apresenta um amplo espectro de manifestações que variam desde pacientes assintomáticos com função hepática normal até aqueles com esteatohepatite e cirrose com complicações como falência de órgãos e carcinoma hepatocelular.⁶²

Aproximadamente 10-20% dos pacientes com esteatose desenvolvem EHNA.⁶³

Obesidade, diabetes e presença de fibrose precoce são determinantes maiores de pior prognóstico.⁶²

Hipertensão arterial e dislipidemia também estão associados à progressão da doença, a primeira estabelecendo um provável *link* entre o sistema renina-angiotensina e fibrose.⁶⁴

Idade >60 anos está associada a progressão e pior prognóstico; EHNA parece progredir mais lentamente e de forma menos severa que a esteato-hepatite causada por álcool, com surgimento de cirrose hepática tardia.⁶⁵ A progressão da fibrose na EHNA é de 7 anos para cada estágio de fibrose, em média, e 14 anos em pacientes com esteatose simples na ausência de fibrose.⁶⁶ Fibrose pode ser revertida na EHNA, especialmente nos estágios iniciais.

20% dos pacientes com EHNA podem desenvolver cirrose hepática após 20 anos e 8 % podem morrer de causas hepáticas; EHNA é atualmente a segunda causa de transplante hepático e a segunda causa mais frequente de carcinoma hepatocelular.⁶⁷

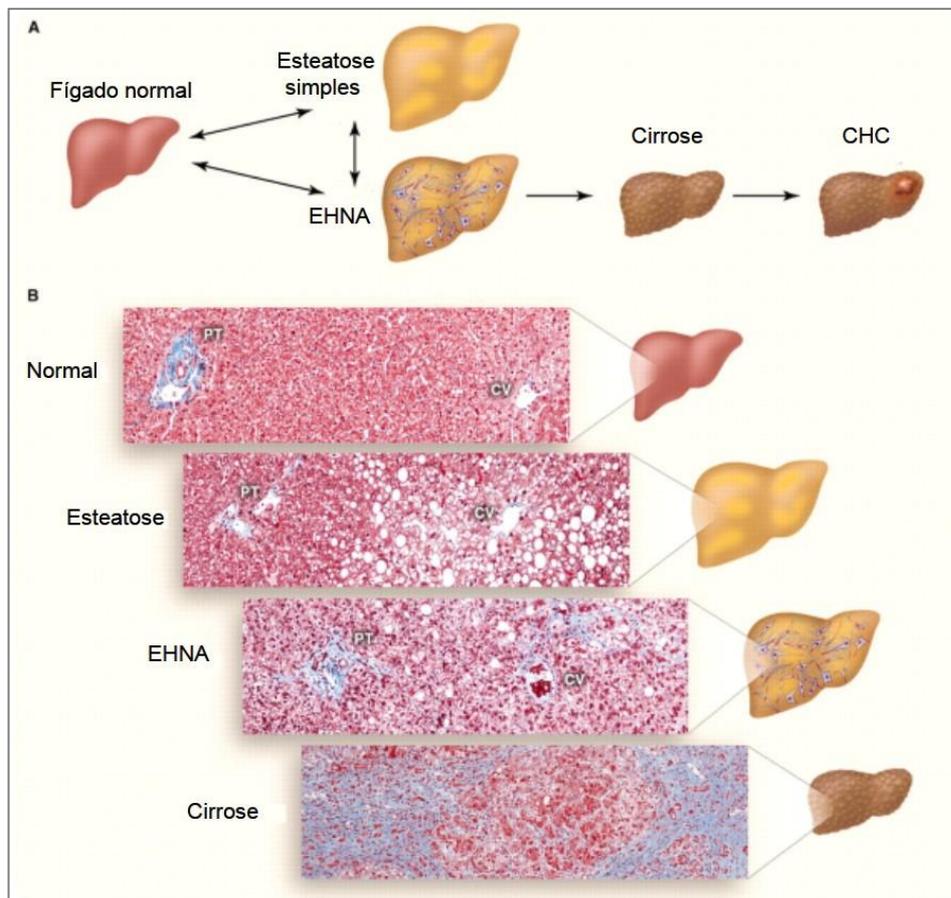
Em contraste, menos de 1-4% dos pacientes com esteatose simples progridem para fibrose avançada.⁵¹

A incidência de carcinoma hepatocelular na EHNA é de 1-2%.⁶¹

Pacientes com carcinoma hepatocelular apresentam idade mais avançada, baixa sobrevida e a doença pode não ser precedida de cirrose hepática.³⁹

Doença cardiovascular e tumores malignos não hepáticos são as principais causas de mortalidade em pacientes com DHGNA.⁶⁴ A figura 1 demonstra a história natural da DHGNA

Figura 1 - História natural da DHGNA



Fonte: Cohen et al.(2011) ⁶⁸

2.2.5 DHGNA/Fisiopatologia

Os mecanismos pelos quais determinados pacientes apresentam evolução benigna de DHGNA na forma de esteatose simples e outros evoluem para quadros de inflamação e fibrose muitas vezes progressivos (NASH) ainda não estão totalmente estabelecidos.

Sabe-se que a DHGNA é uma doença poligênica e multifatorial, sendo atualmente mais aceita a teoria dos múltiplos *hits*. ⁶⁹

Enquanto esteatose hepática simples associada à resistência insulínica é considerada o primeiro *hit* (a elevação do conteúdo lipídico/geração de intermediários tóxicos torna o hepatócito vulnerável a outros *hits*), múltiplos *hits* tem sido propostos como responsáveis pela evolução para EHNA. ⁶⁹

O fato da inflamação poder preceder a esteatose em certas instâncias, tem aumentado a suspeita de que muitos destes *hits* cursem paralelamente. ⁶⁹

Além disto, a cascata de eventos que culmina com inflamação e fibrose origina-se geralmente à distância do fígado, no tecido adiposo e/ou no intestino.

Os múltiplos *hits* incluem diferenças genéticas, resistência insulínica, disbiose e endotoxinas, secreção de adipocinas inflamatórias e inibição de adipocinas anti-inflamatórias, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e do retículo endoplasmático e fatores ambientais como obesidade, fatores dietéticos, acúmulo de gordura visceral e exposição química. ⁷⁰

A seguir, serão abordados os principais *hits* intra e extra-hepáticos relacionados com a evolução de esteatose para formas mais graves da doença:

a) *Hits* extra-hepáticos:

a-1) Expansão do tecido adiposo/resistência insulínica:

Um estudo japonês demonstrou que a severidade da DHGNA se correlaciona com acúmulo de gordura abdominal e resistência insulínica em ambos obesos e não obesos.⁷¹

Resistência insulínica é um fator maior para o desenvolvimento de EHNA.⁷²

Entretanto, nem todos os pacientes com EHNA exibem resistência insulínica, e EHNA pode ser encontrada em pacientes magros e sem fatores de risco identificáveis.⁷³

Ainda que outros fatores, como inflamação, desregulação de adipocinas e estresse do retículo endoplasmático também contribuam para a instalação de resistência insulínica, o papel dos ácidos graxos continua sendo primordial.⁷⁴

Resistência insulínica hepática, entretanto, não é diretamente proporcional à resistência insulínica em outros tecidos, estando mais relacionada com o conteúdo lipídico intra-hepático.

74

Os ácidos graxo hepáticos que contribuem para o surgimento de resistência insulínica originam-se na maioria das vezes de ácidos graxos circulantes no sangue (59%), 26% são oriundos da lipogênese hepática e 15% são provenientes da dieta.⁵⁰

Como já citado, os ácidos graxos circulantes estão aumentados na Síndrome Metabólica, em decorrência do papel lipolítico da resistência insulínica no tecido adiposo, liberando uma maior quantidade de ácidos graxos para os tecidos muscular e hepático.

Lipogênese hepática (de novo) é um importante mecanismo de síntese de ácidos graxos, e decorre principalmente da hiperinsulinemia resultante da resistência insulínica.⁷⁵

Lipogênese de novo está 3 vezes aumentada na DHGNA, através da ativação de vias transcricionais; hiperinsulinemia é capaz de ativar a via transcricional SREBP1 (*sterol regulatory element binding protein 1C*) e hiperglicemia a via transcricional ChREBP (*carbohydrate response element binding protein*), ambos envolvidos na ativação de genes lipogênicos.⁷⁶

Resistência insulínica no músculo esquelético também desempenha um relevante papel na fisiopatogenia da doença, uma vez que a glicose, impedida de ser armazenada na célula muscular como glicogênio, é dirigida ao fígado para servir de substrato para a lipogênese de novo e o armazenamento hepático de lipídeos.⁷⁷

O aporte aumentado de ácidos graxos para o fígado, contudo, só resultará em esteatose se o fígado não for capaz de removê-los do organismo.

Esteatose hepática resulta do desequilíbrio entre o aporte/síntese de ácidos graxos no fígado e a capacidade deste em oxidá-los ou exportá-los.⁶¹

Lipídeos são exportados do fígado na forma de VLDL (*very low density lipoprotein*), e hiperinsulinemia prejudica a síntese de apolipoproteína B (um dos componentes do VLDL) e a secreção de VLDL em pacientes com EHNA.⁵⁰

Hiperinsulinemia também inibe a oxidação de ácidos graxos na mitocôndria, contribuindo para o surgimento de esteatose.⁷⁶

Ácidos graxos não oxidados ou não exportados no fígado tendem a ser convertidos em triglicerídeos por reesterificação.

a-2) Fatores dietéticos:

Fatores dietéticos influenciam a expansão do tecido adiposo e também a lipotoxicidade.

Alguns nutrientes específicos podem estar relacionados com o desenvolvimento de inflamação hepática.

Alimentos e bebidas com alto teor de frutose (como refrigerantes, energéticos e outras bebidas adoçadas do milho) tem sido propostos como fator de risco para obesidade e DHGNA; frutose, em adição à promoção da lipogênese 'de novo', é um fator pró-inflamatório que pode estar relacionado com a regulação de genes na DHGNA.⁷⁷

Em ratos, alta ingestão de frutose tem sido associada com esteatose hepática, balonização dos hepatócitos, inflamação e fibrose.⁷⁷

Sapp et al. (2014) demonstrou em *zebrafish* que frutose (e não glicose) induz EHNA associada à disfunção mitocondrial e estresse do retículo endoplasmático.⁷⁸ Estresse oxidativo e disbiose também tem sido relacionados à ingestão de frutose.⁷⁹

Ao contrário da glicose, cuja entrada na célula e introdução na via da lipogênese é altamente regulada, frutose no fígado é fosforilada e participa da lipogênese praticamente sem regulação.⁸⁰

Ingestão de ácidos graxos saturados induz lipogênese de novo, lipotoxicidade, estresse oxidativo e do retículo endoplasmático.⁷⁷

Resistência insulínica e lesões hepáticas *NASH-like* tem sido observados em camundongos alimentados com ácidos graxos-trans.⁸¹

Dieta rica em colesterol também é fator de risco para EHNA; biópsias hepáticas de pacientes com NASH apresentaram maiores níveis de colesterol livre do que os controles (inclusive nas células de Kupfer e nas células estreladas), ativando inflamação e fibrogênese.⁷⁷

Toxicidade hepatocelular induzida pelo aumento de ácidos graxos poliinsaturados ômega-6 (n-6) e os seus metabólitos, bem como redução nos níveis de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 (n-3), tem sido descrita em pacientes com EHNA; estudos tem demonstrado que uma alta razão de ácidos graxos ômega 6/ômega3 nos hepatócitos e na circulação correlaciona-se com a severidade da EHNA.⁸²

a-3) Micronutrientes:

Metais como ferro e cobre tem tido sua participação evocada na patogênese da EHNA. Distúrbios na homeostasia do ferro e do cobre foram observados em um terço dos pacientes com DHGNA; sobrecarga hepática de ferro induz reação de Fenton e estresse oxidativo,

enquanto concentração baixa de cobre está relacionada com elevação do conteúdo intracelular de triglicerídeos e colesterol, assim como modificação na composição das lipoproteínas.⁷⁷ Ambos estão relacionados com esteatose mais pronunciada e injúria hepatocelular.

O papel da hipovitaminose D na DHGNA tem sido evocado; uma metanálise de estudos observacionais demonstrou que, comparado aos controles, pacientes com DHGNA foram mais sujeitos à deficiência de vitamina D.⁷⁹ Porém, estudos complementares são necessários para definir o real papel da vitamina D na fisiopatogênese da doença.

a-4) Desregulação de adipocinas:

As adipocinas, desreguladas na síndrome metabólica, possuem funções específicas no tecido hepático.

Os níveis encontrados de adiponectina estão reduzidos em pacientes com DHGNA e muito reduzidos em EHNA.⁸³ Um subtipo de adiponectina de alto peso molecular é a forma mais ativa da proteína e tem forte associação com resistência insulínica e doença cardiovascular.⁸⁴

No fígado adiponectina é considerada ter efeitos anti-inflamatórios, antifibrogênicos e de sensibilização de insulina, por ação nas células de Kupfer, células estreladas e hepatócitos, respectivamente.⁸⁵ Adiponectina também estimula a oxidação de gorduras no fígado e no músculo.

Os efeitos antiinflamatórios são obtidos através do bloqueio da ativação do fator nuclear kB (NFkB), pela secreção de citocinas anti-inflamatórias como interleucina 10 (IL-10) e pela supressão da liberação de citocinas inflamatórias como TNF alfa e interleucina 6(IL-6).⁸⁶

Os efeitos da adiponectina no metabolismo da glicose são mediados por dois receptores: AdipoR1 (*adiponectin receptor 1*), mais presente no músculo esquelético e AdipoR2 (*adiponectin receptor 2*), sendo AdipoR2 abundantemente expresso no fígado.⁸⁷

Ligação de adiponectina com receptor AdipoR1 ativa a via AMPK (*adenosine monophosphate activated protein kinase*), inibindo a gliconeogênese e a lipogênese de novo (diminui a expressão de genes envolvidos na codificação de enzimas e moléculas que participam destes processos); beta oxidação de ácidos graxos e captação de glicose também podem ser estimuladas pela via AMPK.⁸⁸

Ligação de adiponectina com receptores AdipoR2 aumenta a expressão de genes envolvidos com a beta oxidação de ácidos graxos e o consumo de glicose através da ativação de PPAR alfa, resultando em redução do conteúdo lipídico das células hepáticas e também da glicemia.⁸⁸ No fígado, PPAR alfa está envolvido no metabolismo de ácidos graxos através da regulação transcricional de numerosos genes.

Adiponectina desempenha, portanto, um papel relevante na resistência insulínica hepática. Pode aumentar a sensibilização da insulina através de várias ações, como diminuição da gliconeogênese e glicogenólise e redução do conteúdo lipídico das células hepáticas e musculares, facilitando a ação da insulina⁸⁹

Leptina também apresenta papel relevante no fígado, agindo através de seu receptor LEPRb (*leptin receptor type b*), e seu sinal é transmitido pela via JAK-STAT, regulando a expressão de SREBP-1 e em consequência o metabolismo lipídico e da glicose.⁸⁹

Estudos em modelos animais demonstraram que resistência à leptina é associada com prejuízo no transporte da leptina através da barreira hemato-encefálica e/ou alterações nas vias de sinalização em que está envolvida, como diminuição da sinalização via JAK-STAT (*janus kinase signal transducer and activator of transcription*)⁸⁷.

Resistência à ação da leptina no hipotálamo está associada com acúmulo de triglicerídeos no tecido adiposo, fígado, músculo e pâncreas, resultando em prejuízo na secreção e sensibilidade da insulina.⁸⁶ Leptina também exerce efeito direto sobre a sensibilidade da

insulina regulando as proteínas IRS (*insulin receptor substrate* 1 e 2) e efeito modulador nas células beta pancreáticas.⁸⁷

Além disso, leptina possui ações pró-inflamatórias e pró-fibrogênicas.⁹⁰

Estudos *in vitro* mostram que leptina exerce um efeito modulador na ativação, proliferação, maturação e produção de mediadores inflamatórios em diversas células imunes, incluindo linfócitos, monócitos/ macrófagos e neutrófilos.⁹⁰

Em humanos, a ação imune da leptina parece ser regulada pelo TNF alfa secretado pelos monócitos.⁹¹

Uma metanálise em humanos demonstrou uma relação entre níveis séricos elevados de leptina com esteatose e Nash; concentrações elevadas de leptina foram associadas com aumento da severidade da doença.⁸⁶

Resistina tem o fígado como seu maior alvo; seu aumento está associado com aumento na secreção de glicose, resistência insulínica e aumento na síntese de citocinas inflamatórias, como TNF alfa, IL-1B, IL6 e IL-12.⁸⁷

Entretanto, os estudos relacionando DHGNA e resistina são contraditórios; um estudo envolvendo um número significativo de pacientes com DHGNA comprovada por biópsia mostrou que os níveis de resistina foram similares entre pacientes com EHNA.⁹²

Outras adipocinas tem sido estudadas na DHGNA, sendo requeridos estudos adicionais para definir o seu papel na doença.

a-5) Microbiota intestinal/Disbiose:

Um fator de risco adicional que tem sido elencado para o desenvolvimento de EHNA é o desequilíbrio patológico da microbiota intestinal (disbiose).

Disbiose pode desencadear inflamação intestinal e prejuízo na integridade da barreira epitelial intestinal, propiciando que produtos bacteriano alcancem o fígado e induzam inflamação hepática e progressão para EHNA.⁹³

A modificação na microbiota intestinal pode estar relacionada com fatores genéticos, dietéticos, obesidade, uso de antibióticos em animais de consumo, prescrição indiscriminada de antibióticos em seres humanos, patologias do trato digestivo, entre outros.⁸⁰

Estas alterações na microbiota podem ser qualitativas (alteração na composição da microbiota) e/ou quantitativas (alteração na concentração de bactérias).

Embora não haja até o momento consenso sobre uma conformação de microbiota típica de EHNA, alguns estudos demonstraram predominância de certos grupos de bactérias, como Bacteróides, enquanto abundância de Ruminococcus foi associada com fibrose ($F > 2$); por outro lado as proporções de Prevotella (competidor com Bacteróides) foram menores em pacientes com EHNA.⁹³

Fatores dietéticos podem estar relacionados com esta distribuição, uma vez que dieta rica em gordura, proteína animal e açúcar favorece o crescimento do gênero Bacteróides, enquanto dieta rica em fibras promove abundância do gênero Prevotella.⁹⁴

Bactérias gram negativas (ricas em endotoxinas como lipopolissacarídeos) tem sido implicadas na patogênese da DHGNA; Escherichia coli e outras bactérias produtoras de etanol tem demonstrado aumentar a permeabilidade intestinal (o álcool produzido por estas bactérias compromete a integridade da barreira intestinal).⁹⁵

Supercrescimento bacteriano no intestino delgado e aumento na circulação de lipopolissacarídeos tem sido encontrados em vários estágios de pacientes com DHGNA.⁹⁵

Tem sido demonstrado experimentalmente que dietas ricas em gorduras administradas ao longo de somente três dias são suficientes para aumentar os níveis de lipopolissacarídeos circulantes, indicando associação entre dieta e disbiose.⁹⁶

Lipopolissacarídeos podem induzir inflamação sistêmica, como já demonstrado em camundongos alimentados com uma dieta rica em lipopolissacarídeos, os quais desenvolveram aumento da síntese de marcadores inflamatórios como TNF alfa e IL-6.⁹⁷ Além disso, administração experimental de dieta rica em gorduras por 4 semanas foi capaz de aumentar a concentração de lipopolissacarídeos em 2-3 vezes, estado definido como endotoxemia e que mostrou ser capaz de iniciar resistência à insulina e contribuir para o aumento de peso.⁹⁷

Disfunção da barreira intestinal parece ser o link entre disbiose e inflamação hepática.⁹³

Não está claro, entretanto, se a alteração de permeabilidade intestinal é causa ou consequência da inflamação hepática, uma vez que fígado e intestino estão conectados pela circulação enterohepática e ambos são capazes de liberar toxinas. Diminuição de proteínas específicas que unem as células epiteliais para formar a barreira intestinal (*tight junctions proteins*), como a *junctional adhesion molecule A* (JAMA), são um mecanismo central que resulta em aumento da permeabilidade intestinal e translocação de bactérias para o fígado, derivando em EHNA.⁹³

Produtos bacterianos que se deslocam via barreira intestinal disfuncional para a veia porta, e daí para o fígado, induzem uma resposta inflamatória a partir da ativação de células inflamatórias intestinais como macrófagos e linfócitos e também a nível hepático.

No fígado, na superfície das células residentes hepáticas ou intracelularmente, existem receptores programados para detectar DAMPs (*Damage-associated molecular patterns*), liberados por células danificadas, e PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*), metabólitos de bactérias intestinais (como os lipopolissacarídeos)⁹⁴. Estes receptores, conhecidos como *Toll-like receptors* (TLRs), são expressos em células residentes do fígado, tais como hepatócitos, células de Kupfer e células estreladas, e diante de diferentes DAMPs e PAMPs são capazes de atividade pró-inflamatória e transcrição de genes envolvidos na resposta inflamatória imune⁹⁵

Embora componentes bacterianos sejam potentes ligantes dos receptores TLR, em condições normais estes receptores estão presentes em pequeno número nas células hepáticas e são a primeira linha de defesa contra agentes bacterianos; este equilíbrio é rompido em pacientes com EHNA, com aumento no número e na ativação destes receptores, sendo a ativação continuada deletéria para o organismo.⁹⁸

Entre os 13 TLRs identificados em mamíferos, somente os TLR-2, TLR-4, TLR-5 e TLR-9 estão envolvidos na patogênese da doença, reconhecendo respectivamente peptídeos glicanos (componentes de bactérias Gram positivas), lipopolissacarídeos (componentes de bactérias Gram negativas), flagelina (proteína estrutural dos flagelos) e DNA bacteriano.⁹⁸

80% dos lipopolissacarídeos injetados via intra-venosa alcançam o fígado em 20-30 minutos, fazendo do fígado um órgão alvo de ação, através da ligação com os TLR-4.⁹⁸

Além disto, PAMPs e DAMPs também podem ser reconhecidos por receptores intracelulares (citoplasmáticos) do sistema imune como os NLRPs (*NOD-like receptors*), também conhecidos como inflamassomas, por formarem um grande complexo multiprotéico intracelular formado por receptor (NLR), proteínas adaptadoras ASC e pró-caspase 1; TLRs e receptores TNF alfa podem intermediar a ativação desta plataforma inflamatória, primeiramente através de aumento transcricional dos componentes do inflamassoma via NFkB, e secundariamente ocorre reunião dos três componentes estruturais e maturação da caspase-1, a qual cliva pró-IL-1B e pró-IL-18 em suas formas maduras.⁹⁹

A presença e ativação de NLRP3 tem sido demonstrada como resposta imune inata de diversos tipos celulares, como células de Kupfer e neutrófilos, e mesmo em células não imunes, como hepatócitos, células estreladas, células endoteliais e miofibroblastos.⁹⁹

NLRP-3 é, portanto, regulador crítico da IL-1B e IL-18, estando sua expressão aumentada e tendo responsabilidade direta no desencadeamento da resposta inflamatória em pacientes com NASH, em estudos clínicos e experimentais.⁹⁹

Ácidos biliares (cuja síntese e excreção é hepática) podem influenciar a microbiota através de seus efeitos anti-microbianos, da mesma forma que enzimas produzidas pelas bactérias podem modificar a composição de ácidos biliares; sua contribuição no desenvolvimento de NASH ainda precisa ser melhor compreendida.

b-) Hits intra-hepáticos:

b-1) Lipotoxicidade:

DHGNA é uma condição heterogênea, e isto ocorre porque diferentes tipos de lipídeos com diferentes potenciais de citotoxicidade se acumulam nas células, e a resposta contra esta lipotoxicidade varia de indivíduo para indivíduo.¹⁰⁰

Triglicerídeos, o tipo mais comum de gordura encontrada no fígado gorduroso, por si não são hepatotóxicos (podendo mesmo ser protetores contra a lipotoxicidade), e o grau de esteatose não é preditor de inflamação, injúria ou fibrose.¹⁰⁰

Por outro lado, certos tipos de lipídios que se acumulam no fígado, como ácidos graxos, diacilglicerol, ceramidas, ésteres de colesterol, colesterol livre e fosfolipídios podem ser deletérios ao fígado.¹⁰¹

Uma demanda aumentada de ácidos graxos no fígado acarreta sobrecarga/ disfunção mitocondrial e estresse oxidativo, resultando em radicais livres e EROS com consequente injúria hepatocelular, inflamação e fibrose.¹⁰¹

Crescentes evidências indicam que a qualidade dos metabólitos lipídicos, mais que a quantidade, pode desempenhar um papel central no desenvolvimento de NASH.¹⁰¹

Lipídios podem causar toxicidade por diversos mecanismos: disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, estresse do retículo endoplasmático, prejuízo no mecanismo de autofagia, geração de inflamação estéril e perturbação das vias de sinalização celular; podem interagir com fatores de transcrição e/ou ligar-se a receptores TLR, promovendo resistência insulínica, inflamação, fibrose e morte celular.¹⁰⁰

Esta associação do acúmulo de lipídios tóxicos no fígado com estresse oxidativo/disfunção mitocondrial, estresse do retículo endoplasmático e prejuízo no mecanismo de autofagia é denominada lipotoxicidade.⁷⁷

Em estudos experimentais, células cultivadas e expostas a concentrações altas de ácidos graxos saturados mostraram significativo aumento de morte celular por apoptose; o mesmo não ocorreu com a exposição a ácidos graxos insaturados.¹⁰¹

Estudos com ácido palmítico, um ácido graxo lipotóxico que abunda na circulação de pacientes com EHNA, demonstraram que este é capaz de liberar grande quantidade de vesículas extracelulares (exovesículas) contendo moléculas bioativas como micro-RNAs, lipídios e proteínas.¹⁰² Estas moléculas podem recrutar e ativar macrófagos e células estreladas quiescentes, contribuindo com processos chave na fisiopatogênese da doença, como inflamação, fibrose e angiogênese.¹⁰²

Dentro dos hepatócitos, ácidos graxos de cadeias longas são esterificados com glicerol-3-fosfato para formar monoacilgliceróis, diacilgliceróis e triacilgliceróis (triglicerídeos); moléculas de triglicerídeos podem originar diacilgliceróis (diglicerídeos) por ação da enzima ATGL (*adipose triglyceride lipase*).¹⁰²

Diacilgliceróis tem sido apontados como causa importante de resistência insulínica hepática, promovendo inflamação e progressão da doença.¹⁰³

Ceramidas são componentes estruturais de membranas celulares e da esfingomielina (proteína estrutural da bainha de mielina); são produzidas no fígado a partir de ácidos graxos

de cadeia longa, podendo também ser obtida através da utilização da esfingosina ou pela hidrólise da esfingomielina pela esfingomielinase.¹⁰³

No passado pensava-se que as ceramidas tinham função puramente estrutural, mas sabe-se agora que elas atuam tanto diretamente, quanto como segundo mensageiros em diversas sinalizações celulares e processos metabólicos.

Ceramidas inibem a sinalização da insulina (colaborando para a instalação de resistência insulínica), induzem inflamação (através da regulação de fatores de transcrição como NFκB), disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e possivelmente apoptose, podendo ter um papel na progressão da DHGNA para EHNA.¹⁰⁴

Ratos com esteatose hepática apresentam aumento na concentração hepática de ceramidas.¹⁰⁴

Citocinas inflamatórias (como TNF alfa e IL-1), lipopolissacarídeos, diminuição dos níveis de adiponectina (participa do clearance das ceramidas produzindo ceramidase) e estresse oxidativo, todos eventos relacionados com EHNA, podem ativar a síntese de ceramidas.¹⁰⁴ O acúmulo de diacilgliceróis e ceramidas no fígado de pacientes com EHNA está relacionado com disfunção mitocondrial.

Dados clínicos e experimentais linkam acúmulo de colesterol livre no fígado com EHNA.¹⁰⁵

Roedores que receberam dieta com alto teor de colesterol em modelos experimentais desenvolveram esteatohepatite dentro de 4-12 semanas.¹⁰⁶

Sobrecarga de colesterol livre nas mitocôndrias dos hepatócitos pode precipitar EHNA por alteração na permeabilidade da membrana mitocondrial, o que leva a perda da glutatona mitocondrial, estresse oxidativo e sensibilização do hepatócito ao TNF alfa e citocinas apoptóticas (sinalização de morte celular FAS-dependente via depleção de glutatona).¹⁰⁵

Também existe correlação entre os níveis de colesterol plasmático e hipóxia hepática; se acredita que a solubilidade e difusão do oxigênio estejam prejudicados em membranas com alto conteúdo de colesterol.¹⁰⁷

Os efeitos pró-inflamatórios do colesterol nos hepatócitos envolvem a formação de cristais de colesterol; cristais de colesterol nos hepatócitos interagem com inflamossomas NLRP-3 das células de Kupfer para induzir resposta inflamatória (funcionando como DAMPs).

105

Hidrolização dos ésteres de colesterol em colesterol livre nas células de Kupfer pode induzir inflamação, estresse oxidativo, ativação imune e morte celular; também se supõe que na presença de lipídeos tóxicos as células de Kupfer se tornem mais sensíveis à ativação por lipopolissacarídeos.¹⁰⁵

Acúmulo de colesterol livre nas células estreladas induziu fibrose em modelos animais de NASH.¹⁰⁸

Em adição à toxicidade direta do colesterol livre, ocorre um sinergismo de toxicidade quando o colesterol livre se associa a ácidos graxos; os produtos oxidativos do colesterol (oxiesteróis) também podem se combinar com ácidos graxos e contribuem para disfunção mitocondrial e injúria hepática.¹⁰⁴

O acúmulo de lipídeos tóxicos nas células hepáticas pode, portanto, ativar vias pró-oxidantes, pró-inflamatórias, pró-fibróticas e pró-apoptóticas responsáveis pelo surgimento de estresse oxidativo, inflamação, apoptose e fibrose.

b-2) Disfunção mitocondrial:

Estudos tem demonstrado que pacientes com EHNA apresentam alteração na morfologia mitocondrial, estando estas edemaciadas, arredondadas e frequentemente com

perdas de cristas; por outro lado, na ausência de anormalidades mitocondriais, o desenvolvimento de resistência insulínica ocasiona o surgimento de esteatose apenas.¹⁰⁹

Um fluxo constante de ácidos graxos e lipídios tóxicos através da mitocôndria pode causar fissura mitocondrial e gerar estresse oxidativo, sendo as EROS capazes de danificar o DNA mitocondrial e os complexos protéicos da cadeia respiratória mitocondrial.¹¹⁰

Uma vez que o DNA mitocondrial está localizado muito próximo da fonte de geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) e a mitocôndria é aberta, não possuindo histona para protegê-la, dano oxidativo tem sido considerado a principal causa de mutações/deleções no DNA mitocondrial.¹¹¹

Dano oxidativo do DNA mitocondrial é considerado o evento primário que leva à alteração da cadeia de transporte de elétrons, induzindo disfunção mitocondrial e formação de novos radicais livres em um ciclo vicioso.¹¹¹

De fato, severas deleções do DNA mitocondrial tem sido relatadas em pacientes com EHNA e esta é seguramente uma das causas das alterações de função mitocondrial nestes pacientes.¹¹²

Diminuição da atividade de todos os complexos da cadeia de transporte de elétrons tem sido reportados na EHNA.¹¹³

DAMPs derivados das mitocôndrias danificadas, especialmente moléculas de DNA mitocondrial livres e peptídeos liberados durante o dano físico às mitocôndrias, podem induzir inflamação e apoptose através de múltiplas vias.¹¹¹

Moléculas de DNA mitocondrial liberadas para o citoplasma durante o processo de morte das células hepáticas podem ativar os inflamassomas NLRP-3.¹¹⁴

Uma vez instalada a disfunção mitocondrial, ocorre colapso da oxidação de moléculas de gordura, com geração sucessiva de metabólitos tóxicos, estresse oxidativo e perda da capacidade antioxidante, colaborando de forma decisiva para o surgimento de EHNA.¹¹⁵

b-3) Estresse do Retículo Endoplasmático:

Retículo endoplasmático é a principal organela responsável pela maturação, dobramento, transporte e modificações biológicas das proteínas, além de ser um reservatório maior de cálcio na célula e um importante regulador da homeostasia dos lipídios.¹¹⁶

A alta qualidade no dobramento das proteínas é essencial para o seu perfeito funcionamento e sobrevivência celular.

Situações de estresse biológico, como hiperlipidemia (especialmente aumento de ácidos graxos ou colesterol livre) e hiperinsulinemia, as quais fazem parte da fisiopatologia da DHGNA, podem levar ao acúmulo de proteínas não dobradas e/ou mal dobradas no retículo, determinando estresse do retículo endoplasmático.¹¹⁷

Hiperglicemia, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e depleção de fosfatidilcolina também são causas de estresse do RE.¹¹⁵

Há uma evidência crescente da conexão entre estresse de RE e DHGNA; de fato, muitos processos lipogênicos ocorrem no retículo endoplasmático (produção de colesterol, síntese dos lipídios da membrana, reunião de partículas de VLDL).¹¹⁸

O retículo endoplasmático é o principal local de síntese de lipídios nos hepatócitos (SREBP1c se localiza em sua membrana), e contém todas as principais vias metabólicas dos lipídios, incluindo lipogênese, síntese e armazenamento de triglicerídios e oxidação de ácidos graxos¹¹⁹

VLDL é formado pela reunião de colesterol e triglicerídeos ao redor da apolipoproteína B 100; estresse do retículo pode prejudicar a formação de VLDL e portanto a secreção de triglicerídeos da célula hepática na forma de VLDL, resultando em esteatose.¹²⁰

Estresse do RE também leva à regulação de genes envolvidos no metabolismo lipídico e a doenças que resultam em desregulação do metabolismo lipídico, como obesidade.¹²⁰

Estudos desenvolvidos em modelos animais e seres humanos sugerem que altos níveis de colesterol podem desencadear estresse RE e induzir esteatose ou NASH.¹¹⁶

O retículo endoplasmático também é sensível ao acúmulo de ácidos graxos e outros lipídios tóxicos (como diglicerídeos), levando ao acúmulo de proteínas não dobradas ou mal dobradas.¹²¹

O estresse do retículo endoplasmático, por sua vez, ativa uma resposta conhecida como UPR (*Unfolded Protein Response*), uma tentativa das células se adaptarem ao estresse e reestabelecerem a homeostasia, evitando o acúmulo de proteínas defeituosas e lipídios, e o início da apoptose.¹²² Níveis altos de lipídios e proteínas mal dobradas são, portanto, capazes de desencadear UPR, a partir de um ambiente lipotóxico.¹²²

A UPR possui três braços (proteínas que funcionam como sensores de stress): *Protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase* (PERK), *Activating transcription factor 6* (ATF6) e *Inositol-requiring enzyme 1* (IRE1); estas três vias são ativadas por chaperonas do lúmen do retículo através de três receptores transmembrana, mantidos normalmente inativos por ligação com a proteína BiP/GRP78 (*binding immunoglobulin protein/glucose-regulated protein78*).¹²² Entretanto, sob estresse do RE, esta chaperona liga-se preferencialmente a proteínas mal dobradas acumuladas no retículo, liberando os três sensores para atividade.¹²³

O sistema de respostas da UPR envolve inibição transitória da tradução de proteínas (diminuindo o influxo de novas proteínas no retículo), ativação do ERAD (*ER-associated protein degradation*), o qual desloca proteínas do retículo para o citosol a fim de serem degradadas por proteassomas, e a modulação transcricional de genes que codificam chaperonas e anti-oxidantes a fim de aumentar o dobramento de proteínas e a síntese de proteínas envolvidas no ERAD.¹²⁴

UPR tem sido associada à vários tipos de resposta inflamatória, como ativação de NFκB, JNK, IL-6 e TNF alfa¹²³. Está ativada em várias doenças, como obesidade e DHGNA, e se o

estresse do retículo for elevado ou sustentado, autofagia e/ou apoptose serão acionadas na tentativa coordenada de restaurar a homeostasia celular.¹²² O organismo, por sua vez, responde à UPR através da ativação de outras vias.

A via Keap1-Nrf2-ARE possui três componentes celulares: *Kelch-like ECH –related factor 2 associated protein 1* (Keap1), *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2), e *antioxidant response elements* (ARE). Em condições fisiológicas normais, Keap1 está associado com Nrf2 (geralmente no citoplasma), de forma inibitória; entretanto, sob estresse oxidativo ou do retículo, Keap1 se dissocia de Nrf2, que migra para o núcleo e se liga com ARE de genes de fase II para tradução de enzimas detoxificadoras como glutathiona peroxidase (Gpx), glutathiona redutase (GR), tioredoxina (TRX) e peroxiredoxina (PRX) a fim de prevenir o estresse oxidativo.¹²⁵

Estresse do RE está linkado com estresse oxidativo através de ativação prolongada da UPR, por 3 mecanismos: expressão aumentada de CHOP, expressão aumentada de ERO-1 (*Endoplasmic reticulum oxidoreductin 1*) e diminuição da expressão de SERCA (*sarco endoplasmic Ca 2+-ATPase*).¹²⁶

ERO-1 (uma flavoenzima) e a chaperona PDI (*protein disulfide isomerase*) são essenciais para o processo de enovelamento de proteínas (quando a proteína dobra-se sobre si mesma para tornar-se ativa), através da formação de pontes dissulfeto, fundamentais para o enovelamento e manutenção da conformação das proteínas (que só deixam o lúmen do retículo quando devidamente dobradas).¹²⁷

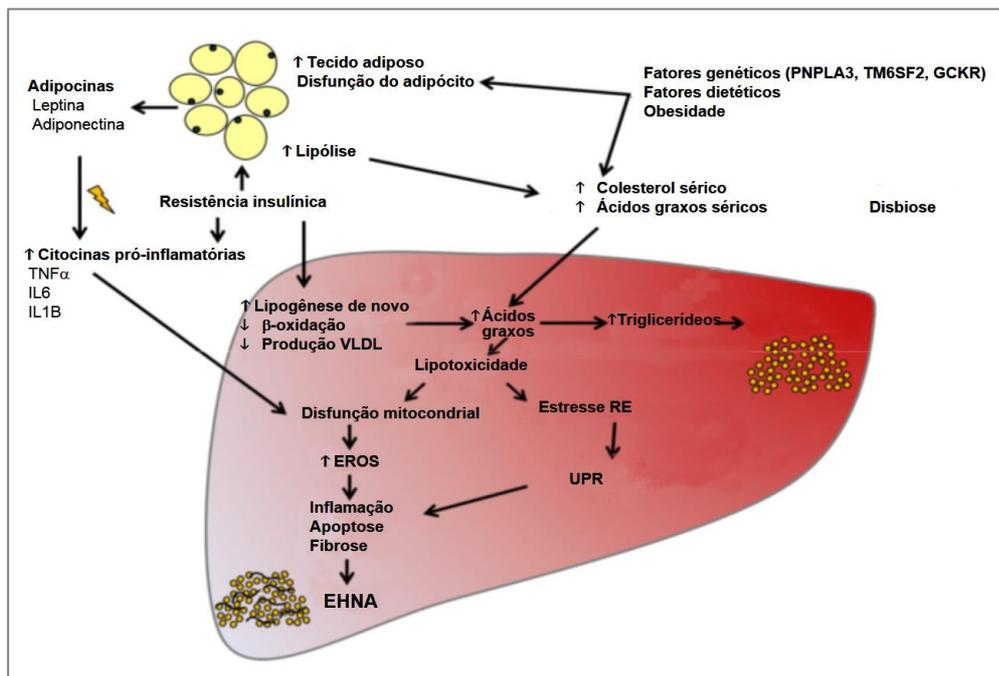
As pontes dissulfeto são geradas a partir de reações de oxi-redução; durante este processo, PDI oxida o substrato protéico e é subsequentemente reduzida; ERO1 reoxida e reativa PDI para um novo ciclo de enovelamento oxidativo, e através do seu co-fator FAD (*Flavine Adenine Dinucleotide*) transfere elétrons para o oxigênio molecular, produzindo H₂O₂.¹²⁷

Em resumo, o estresse do RE e cada braço da UPR podem contribuir para o surgimento de esteatose por promoverem lipogênese de novo e lipólise, redução na oxidação de ácidos graxos e prejuízo na secreção de VLDL; o braço IRE1/XPB1 tem demonstrado participação crucial no metabolismo lipídico através do processo de lipogênese e regulação da secreção de VLDL, e os braços IRE 1, ATF6 e PERK são importantes no desencadeamento de estresse oxidativo, ativação de inflamossomas, ativação da via NFkB (o qual promove secreção de fatores inflamatórios e quimiotáticos que resultam em piora da inflamação hepática e início de fibrose) e ativação da via JNK(promotora de inflamação/apoptose).¹¹⁹

b-4) Estresse Oxidativo:

O estresse oxidativo tem sido considerado um dos *hits* mais importantes na evolução de esteatose para inflamação e fibrose. Por ser um dos objetivos deste estudo, será abordado em separado no item específico a seguir (item 1.3). A figura 2 demonstra o modelo dos múltiplos *Hits*.

Figura 2 - Modelo dos múltiplos *hits*



Fonte: Chen et al .(2018) ¹²⁸

2.3 ESTRESSE OXIDATIVO

2.3.1 Conceitos e Importância

Estresse oxidativo é o desequilíbrio entre agentes oxidantes e anti-oxidantes em favor dos oxidantes, levando a uma perturbação do controle e da sinalização redox e/ou dano molecular.¹²⁹

Este desequilíbrio ocorre principalmente como resultado do excesso de produção de espécies reativas de Oxigênio (EROS) e/ou pela diminuição da atividade de enzimas anti-oxidantes. Exposição crônica ou intensa a estressores pode resultar em excessiva produção de EROS. Além de EROS, espécies reativas de Nitrogênio (ERNS), entre outras espécies químicas, também podem reagir com estruturas celulares.

Os agentes pró-oxidantes causam estresse oxidativo através de insulto direto ou de saturação da maquinaria anti-oxidante.¹³⁰

EROS, por definição, são moléculas quimicamente reativas produzidas dentro de sistemas biológicos.¹³¹

Consistem em pequenas moléculas instáveis de curta duração e alta reatividade. Podem ser radicais livres (como superóxido e radical hidroxila), ou moléculas não radicalares, como peróxido de hidrogênio e oxigênio singlet. Radicais livres, por sua vez, são átomos ou moléculas que possuem 1 ou mais elétrons não pareados em um de seus orbitais (geralmente no orbital mais externo), tornando-se reativos.¹³²

No entanto, nem sempre estas espécies reativas são prejudiciais à saúde. Classicamente, EROS são apontadas como moléculas de defesa liberadas por macrófagos e neutrófilos na destruição de patógenos como bactérias. Evidências indicam o seu papel como segundo mensageiro com influência em moléculas envolvidas na sinalização celular; como

consequência, podem causar crescimento, diferenciação, progressão e morte celular.¹²⁵ Em resposta a estressores, podem regular a função mitocondrial, modular a expressão de genes e proteínas de estresse e os níveis de antioxidantes; também são capazes de ativar o sistema imune.¹³¹

2.3.2 EROS e ERNS

As principais espécies reativas de oxigênio e nitrogênio estão resumidas abaixo no quadro 2.

Quadro 2 - Principais espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

Espécies Reativas de Oxigênio	Espécies Reativas de Nitrogênio
<p>Radicais livres superóxido (O₂·⁻) hidroxila (OH·) radical alcoxil (RO·) radical peroxil (ROO·)</p>	<p>Radicais livres óxido nítrico (NO·) dióxido de nitrogênio (NO₂·)</p>
<p>Espécies não radicalares peróxido de hidrogênio (H₂O₂) oxigênio singlet (¹O₂) ozônio (O₃) hidroperóxido (ROOH)</p>	<p>Espécies não radicalares peroxinitrito (ONOO⁻) cátion nitrosila (NO⁺) ânion nitrosila (NO⁻) trióxido de dinitrogênio (N₂O₃) tetraóxido de dinitrogênio (N₂O₄) ácido nitroso (HNO₂) ácido peroxinitroso (ONOOH) cloreto de nitrila (NO₂Cl)</p>

Fonte: Adaptado de Phaniendra et al. (2015).¹³³

O radical superóxido é o radical mais comum e abundante na célula e é produzido pela adição de um elétron ao oxigênio. Sua origem envolve principalmente o metabolismo oxidativo

mitocondrial e a produção enzimática através das NOX (NADP-oxidases). Outras enzimas como xantina-oxidase, ciclooxigenase e lipooxigenase também podem sintetizá-lo.¹³³

É considerado um Radical Livre (RL) primário, porque interage com moléculas na célula e forma RL/ EROS secundários via processo catalizados por enzimas ou metais. É instável e de curta duração. Sua reatividade com biomoléculas é baixa. Possui como locais de ação principalmente os centros de ferro e enxofre das cadeias respiratórias das bactérias e as mitocôndrias.¹³⁴

Apesar de o nome sugerir que este radical tenha um alto poder oxidante, o superóxido atua na maioria das reações como um agente redutor, e é o radical livre com menor poder de oxidação.¹³⁵

O superóxido pode ser rapidamente transformado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD) e então reduzido a água pelas enzimas catalase ou glutathiona peroxidase (GPx).¹³⁵

Superóxido também pode reagir com outra molécula de superóxido (reação de auto-dismutação), para formar H_2O_2 .¹³⁶

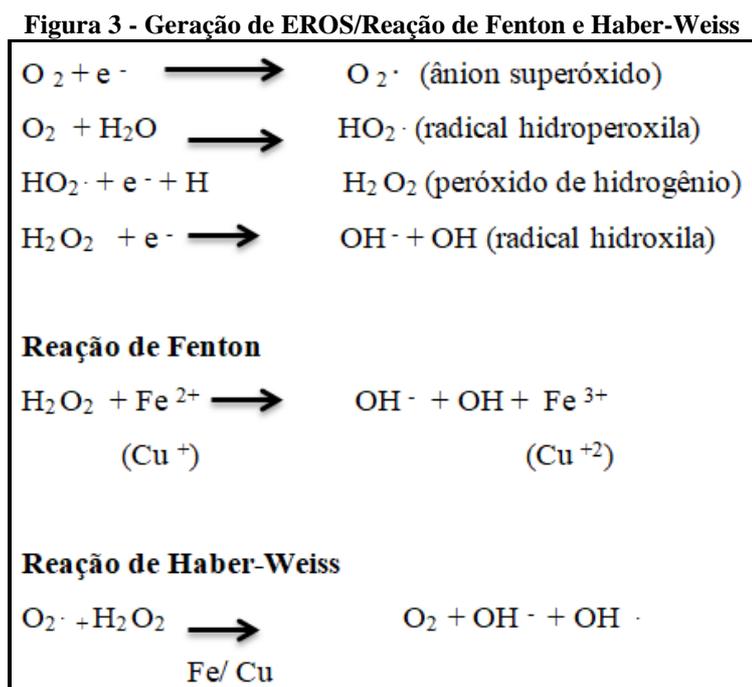
Também pode reagir com óxido nítrico (NO), uma espécie reativa de nitrogênio formada pela óxido nítrico sintase (NOS) durante o metabolismo da arginina em citrulina, para formar peroxinitrito (ONOO-), um poderoso oxidante.¹³⁷ De fato, células de defesa como macrófagos e neutrófilos são capazes de liberar simultaneamente superóxido e óxido nítrico nos vacúolos fagocitários para gerar peroxinitrito a fim de eliminar bactérias.¹³⁸

Em baixas concentrações, óxido nítrico pode regular a meia-vida celular, o tônus do músculo liso e a sinalização imune; em concentrações mais altas, entretanto, pode reagir com oxigênio ou superóxido formando ERN como peroxinitrito e dióxido de nitrogênio(NO_2).¹³⁷

Espécies reativas de nitrogênio (ERN) possuem, portanto, estreita relação com EROS. Superprodução de ERN é conhecida como estresse nitrosativo, e tal qual o estresse oxidativo pode causar fragmentação do DNA e oxidação lipídica.¹³⁷

Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa das reações que produzem o radical hidroxila (OH⁻), em presença de metais como o Ferro e Cobre (Reações de Fenton e Haber-Weiss).¹³⁹

Na reação de Fenton, reage com Fe e Cu para gerar radical hidroxila, enquanto na reação de Haber-Weiss reage com superóxido, também na presença destes íons, para gerar o radical hidroxila, como demonstrado na figura 3.



Fonte: Adaptado de Klaunig et al. (2010)¹³⁹

H₂O₂ pode ser obtido por dismutação (espontânea ou catalisada por enzimas) do superóxido ou redução divalente do oxigênio molecular.

Peróxido de hidrogênio por si só não é um radical livre por não apresentar elétrons de configuração ímpar; entretanto é precursor de espécies reativas como os radicais peroxil e

hidroxila. Possui habilidade de atravessar membranas celulares livremente, ao contrário do superóxido (que apresenta baixa solubilidade), e embora seja uma molécula estável e não cause dano ao DNA, pode ser altamente tóxico.¹³⁸

A maior parte dos efeitos tóxicos atribuídos ao peróxido de hidrogênio devem-se na verdade ao radical hidroxila.

O radical hidroxila é considerado o radical livre de oxigênio mais reativo, devido a sua meia-vida curta e capacidade de reagir com qualquer estrutura celular que se encontre próxima.

139

O fato de não haver um antioxidante natural torna o radical hidroxila ainda mais danoso.

Radical hidroxila, assim como peroxinitrito, são oxidantes potentes capazes de danificar macromoléculas e desencadear morte celular por necrose e/ou apoptose.

O oxigênio singlet ($^1\text{O}_2$) é a forma excitada do oxigênio molecular e não possui elétrons desemparelhados na última camada; os 2 elétrons ocupam o mesmo orbital deixando o orbital vazio altamente reativo. É produzido *in vivo* pela ativação de neutrófilos e eosinófilos e por reações catalisadas por peroxidases (como mieloperoxidase), lipooxigenases e dioxigenases; não apresenta restrição no transporte de elétrons (ao contrário do oxigênio molecular), o que o faz altamente reativo e capaz de produzir radicais alcóxil (RO) e peróxil (ROO).¹³⁵

Em quantidades excessivas, oxigênio singlet induz estresse oxidativo e apresenta efeitos tóxicos, decorrentes da oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos.¹⁴⁰

Possui alta reatividade com ácidos graxos e é capaz de induzir a expressão de genes envolvidos com o estresse oxidativo e inflamação, o que faz com que seja uma das espécies reativas de oxigênio mais agressivas.¹⁴⁰

2.3.3 Fisiopatologia da Geração de EROS/ERNS

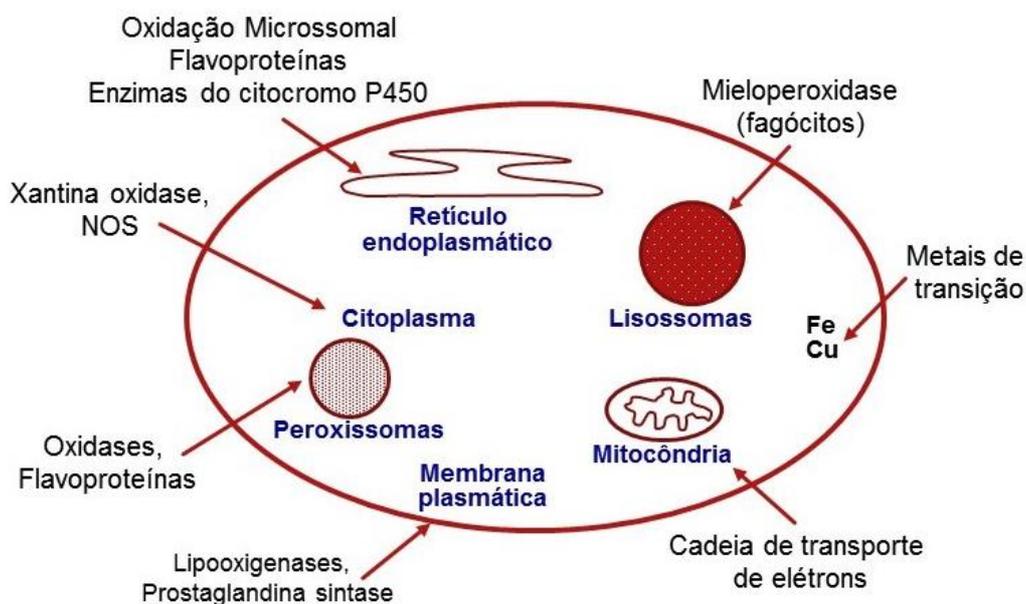
EROS podem ser gerados a partir de fontes endógenas ou exógenas.

A primeira categoria refere-se a EROS/ERNS formados durante processos biológicos naturais, como bioprodutos de reações químicas (figura 4).

A segunda categoria está relacionada com EROS/ERNS formados em decorrência de exposição a xenobióticos, bactérias ou citocinas, como um mecanismo de defesa do organismo contra agentes externos (figura 5).

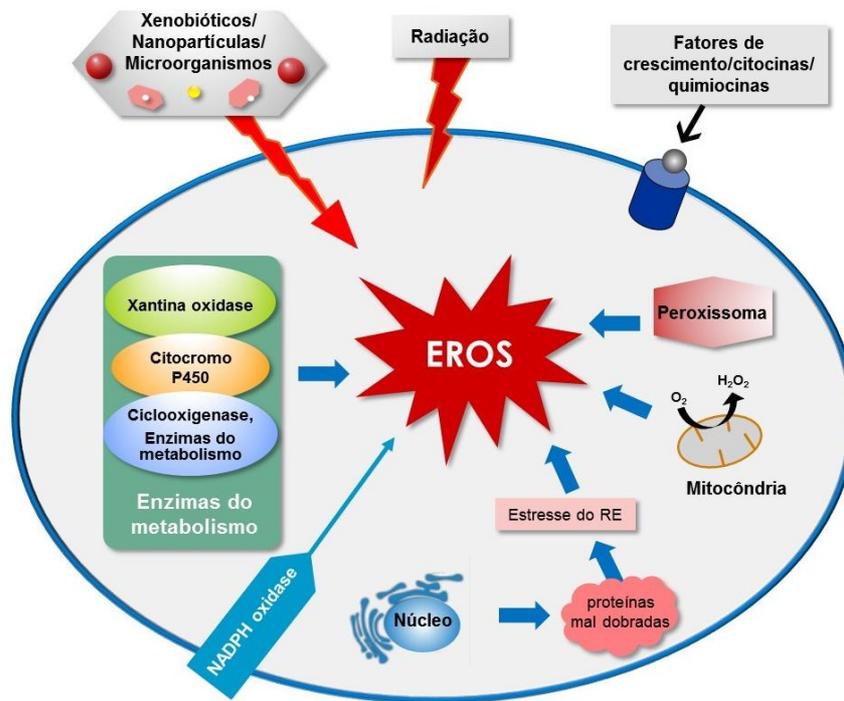
Figura 4 - Fontes endógenas geradoras de EROS/ERNS

Fontes endógenas geradoras de EROS/ERNS



Fonte: Kurutas (2016)¹³⁸

Figura 5 - Fontes exógenas geradoras de EROS/ERNS



Fonte: Dayem et al (2017).¹⁴¹

As principais fontes endógenas de EROS são as mitocôndrias e os complexos NOX (NADP-oxidases) nas membranas plasmáticas celulares; outras fontes importantes são o retículo endoplasmático e peroxissomas.

A beta oxidação de ácidos graxos é um mecanismo central para a produção de energia para o organismo.

A oxidação de ácidos graxos ocorre dentro das mitocôndrias (beta-oxidação), peroxissomas (beta-oxidação) e retículos endoplasmáticos (ômega-oxidação).¹⁴²

Em geral, ácidos graxos de cadeia curta, média e longa são oxidados dentro da mitocôndria (beta oxidação), enquanto ácidos graxos tóxicos, de cadeias muito longas, são oxidados nos peroxissomas.¹⁴³ Uma vez dentro das células, ácidos graxos podem ser esterificados ou sofrer beta oxidação (quebra das cadeias de ácidos graxos ou “queima”), gerando acetilcoenzima A (acetil-coA).¹⁴⁴

A beta oxidação mitocondrial de ácidos graxos está acoplada à síntese de ATP (Adenosina Trifosfato) que ocorre nesta organela, através da formação de NADH e FADH₂.

Especificamente a mitocôndria, através do metabolismo oxidativo, representa a maior fonte celular de produção de EROS. O acúmulo de cálcio no citoplasma resulta em gatilho para a ativação mitocondrial da cadeia de transporte de elétrons.¹⁴¹

O processo de oxidação normal do oxigênio, fundamental para o metabolismo energético celular e formação de ATP (adenosina Trifosfato) ocorre na mitocôndria, sendo que em 95-98% das vezes o oxigênio recebe 4 elétrons de uma só vez (redução tetraeletrônica), formando ATP e liberando água e gás carbônico; porém em 2-5% das vezes o oxigênio recebe um elétron de cada vez (redução monoeletrônica), formando intermediários tóxicos e reativos, principalmente nos complexos I e III.¹⁴⁵

O NADH e FADH₂, co-fatores enzimáticos que participam desta e de outras vias metabólicas que ocorrem dentro da mitocôndria, ao se reduzirem, a partir das moléculas NAD e FAD, recebem elétrons (retirando-os dos substratos em que atuam), que são transportados por carreadores até a cadeia respiratória (principalmente complexos I, III e IV) até o receptor final de elétrons, o oxigênio molecular.¹¹²

Radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROS) como superóxido e peróxido de hidrogênio podem se formar durante este processo.

NOX (NADPH-Oxidases) representam uma fonte não mitocondrial de geração de EROS (superóxido e peróxido de hidrogênio) e são ativadas por vários fatores de crescimento, cálcio e citocinas. Estas oxidases são geralmente inativas até os neutrófilos e macrófagos serem ativados após exposição a microorganismos ou mediadores inflamatórios, resultando na produção de EROS.

NOX possui 7 isoformas em mamíferos (NOX 1-5 e Dual-Oxidase/DUOX 1-2), sendo a NOX 1, a NOX 2 e a NOX 4 as principais produtoras de EROS no fígado; NOX1 e NOX 2 produzem principalmente superóxido, enquanto NOX 4 produz diretamente H₂O₂.¹⁴⁶

Estas enzimas desempenham papel crucial na formação de superóxido via redução de oxigênio mediada pela doação de elétrons de NADPH (NADPH doa elétrons para molécula de Flavina Adenina Dinucleotídeo/FAD, para o grupamento HEME e finalmente para a molécula de Oxigênio formar superóxido).¹⁴¹

Nos peroxissomos, a principal via de produção de radicais livres é a beta-oxidação de ácidos graxos, resultando em H₂O₂ como produto final; outros sistemas enzimáticos dos peroxissomos, como xantina-oxidase (também gerada no citoplasma), podem gerar além de H₂O₂, o radical superóxido.¹³³

No retículo endoplasmático, enzimas como citocromo P450/NADPH-citocromo P450 redutase, b5, ERO-1 e diamina-oxidases também podem gerar EROS.¹⁴⁷

O retículo endoplasmático liso hepático pode realizar ômega oxidação por membros da família citocromo P450 4A; este mecanismo é utilizado preferencialmente para detoxificação de componentes tóxicos exógenos e endógenos, mas pode tornar-se mais prevalente em caso de aumento do influxo hepático de ácidos graxos ou beta oxidação defectiva.¹¹⁰ Também contribuem para o estresse oxidativo do retículo o citocromo P450 2E1, envolvendo ativação da enzima citocromo P450 redutase, mecanismo implicado na progressão de esteatose para estato-hepatite.¹¹²

Outros sistemas enzimáticos presentes no citoplasma (NOS-óxido nítrico sintase) e nas membranas plasmáticas (ciclooxigenase, lipooxigenase...) também estão envolvidos na produção de EROS.

Xenobióticos (incluindo agentes químicos, álcool e tabaco), microorganismos, citocinas e radiação estão entre as principais fontes exógenas de estresse oxidativo.¹⁴¹

2.3.4 Lipoperoxidação

Por serem espécies muito reativas, as EROS assim que se formam reagem principalmente com os lipídeos (ácidos graxos poliinsaturados) das membranas, fenômeno este conhecido como lipoperoxidação, que nada mais é que a oxidação das membranas celulares por ação de radicais livres/EROS, comprometendo a integridade celular.

Glicolipídios, fosfolipídios e colesterol são alvos bem conhecidos de dano peroxidativo, sendo os ácidos graxos o principal substrato da lipoperoxidação.

O radical hidroxila (OH) é considerado o principal iniciador do processo de lipoperoxidação, através da retirada de um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos da membrana.¹⁴⁸ Outros radicais como o radical alcoxil (RO) também podem iniciar este processo.

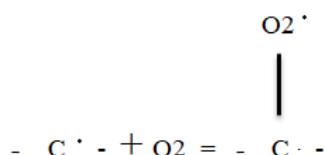
Sistemas enzimáticos pró-oxidantes como citocromo P450, ciclooxigenase e lipooxigenase também são capazes de induzir lipoperoxidação.¹⁴⁹ A figura 6 resume o mecanismo básico de lipoperoxidação. Os radicais livres lipídicos são representados pela letra R.

Figura 6 - Mecanismo Básico da Lipoperoxidação

A) INICIAÇÃO: O Hidrogênio (e seu único elétron) é abstraído do carbono do grupamento metileno da cadeia de ácidos graxos formando um radical lipídico C[•] (ou R[•])



B) PROPAGAÇÃO: O Radical Lipídico C[•] (ou R[•]) se une com O₂ formando ROO[•] (Radical Peroxil)



O Radical Peroxil (ROO[•]) instável reage com o ácido graxo adjacente retirando H e formando ROOH (Hidroperóxido Lipídico) perpetuando o processo se este não for contido.



C) TERMINAÇÃO Ocorre quando os radicais C[•] (R[•]) e ROO[•] propagam-se até destruírem a si próprios.



Fonte: Adaptado de Halliwell (1994).¹⁴⁸

Na fase de terminação, dois radicais peroxil reagem entre si formando um tetróxido instável que se decompõe dando origem ao oxigênio singlet e carbonilas excitadas que retornam ao seu estado fundamental emitindo quantas de luz visível.¹⁴⁵

A fase de terminação também pode ocorrer por ação de anti-oxidantes.¹⁵⁰

Os principais produtos primários da lipoperoxidação são os hidroperóxidos, produzidos durante a fase de propagação; este pode ser reduzido pela GPx evitando o dano peroxidativo ou induzir novos hidroperóxidos alimentando o processo de lipoperoxidação; também podem reagir com peroxinitrito e com ácido hipocloroso.¹⁵⁰

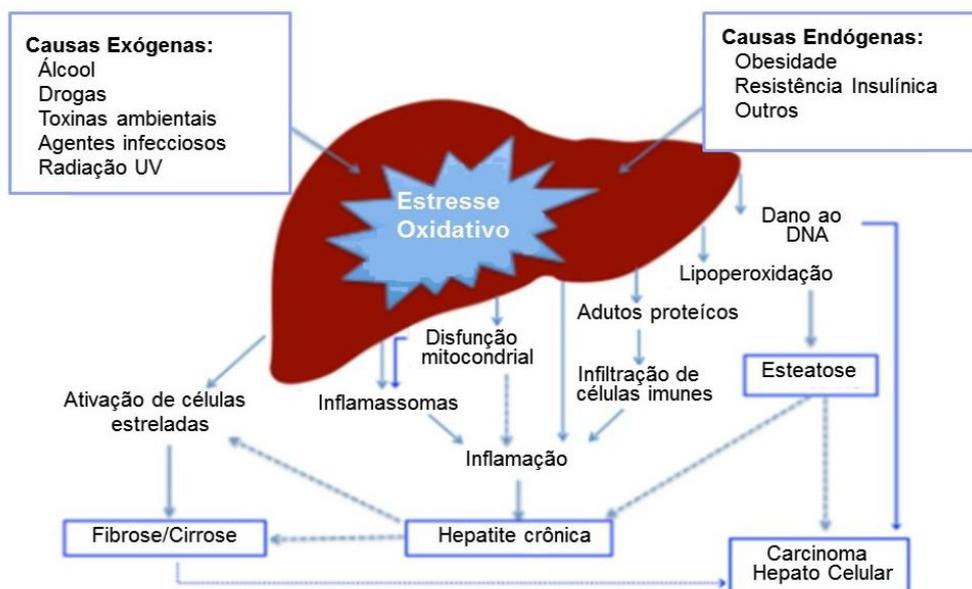
Durante o processo de lipoperoxidação, a fragmentação dos peróxidos pode produzir produtos secundários, aldeídos como malondialdeído (MDA), propanal, hexanal e 4-hidróxi-2-nonenal (4-HNE). E ao contrário das EROS, que atacam moléculas próximas aos sítios em que foram geradas, estes aldeídos podem facilmente se difundir por membranas e modificar qualquer proteína do citoplasma e do núcleo, mesmo longe de onde foram gerados, e danificar o DNA.¹⁵⁰

MDA parece ser o mais mutagênico produto da lipoperoxidação, enquanto 4-HNE é o mais tóxico (pode ser detoxificado por conjugação com GSH); MDA tem sido utilizado como biomarcador de lipoperoxidação devido a sua fácil reação com o ácido tiobarbitúrico.¹⁵⁰ Estas substâncias amplificam o dano tecidual, difundindo EROS para o espaço extra-celular.

Lipoperoxidação (LPO) é um dos principais mecanismos de morte celular induzida por radicais livres/EROS, podendo levar à morte de hepatócitos muito rapidamente através da destruição de suas membranas.¹⁵¹

Desequilíbrio iônico (como o afluxo intracelular de cálcio) está diretamente implicado neste processo, pois ativa proteases na degradação de membranas (como liberação de enzimas hidrolíticas dos lisossomas) e nucleases (fragmentando o DNA), culminando com a morte celular.¹⁵² A figura 7 resume o mecanismo geral do estresse oxidativo induzido por vários fatores no fígado.

Figura 7 - Fatores que influenciam o estresse oxidativo hepático



Fonte: Adaptado de Li S et al.(2015)¹⁵³

2.3.5 Inflamação/Fibrose/Morte celular

Estresse oxidativo, dentre os vários *hits* envolvidos no surgimento de NASH, parece ter um papel primordial na progressão de esteatose para inflamação e fibrose.¹⁵⁴

A geração de excesso de EROS, em adição à lipoperoxidação de membranas celulares, resulta em injúria hepatocelular.¹⁵⁴ Os radicais livres podem causar dano oxidativo à proteínas, lipídeos e ao DNA celular (mutações), seja através de dano direto ou agindo como moduladores da inflamação.⁸⁷

O resultado da injúria hepatocelular (DAMPs), em conjunto com PAMPs de microorganismos e moléculas de lipídios, podem se ligar a receptores das células de Kupfer e outras células hepáticas; a ativação destes receptores de reconhecimento (Toll like receptors/TLR e Nod like receptors/NLR), por sua vez, é capaz de ativar várias vias inflamatórias.¹⁵⁵

Uma vez ativados os receptores TLR e NLR, várias cascatas inflamatórias se iniciam, incluindo produção de citocinas (como TNF-alfa e interleucinas), quimiocinas (como MAPK e P13K), fatores de crescimento, fatores de transcrição (principalmente NFkB), inflamassomas e fatores de reparo tecidual.¹⁵⁶

Se o receptor de reconhecimento ativado for TLR, NFkB será ativado, se for NLR citoplasmático, serão ativados inflamassomas; NFkB é capaz de regular centenas de genes pró-inflamatórios, estando implicado na síntese de TNF-alfa, TGF-B e na regulação de IL-6, IL-8 e Fas-ligante.¹⁵⁶ IL-6 pode ativar a via JNK, envolvida em inflamação, apoptose e resistência insulínica. 26 TNF alfa pode ser responsável pela ativação sustentada de JNK.¹⁵⁶

Inflamação é necessária para remover debris e promover o acúmulo de células cicatrizantes, como células progenitoras e miofibroblastos; entretanto, excessiva inflamação compromete a viabilidade de hepatócitos residuais e conduz ao supercrescimento de células progenitoras e fibroblastos, derivando fibrose progressiva.¹⁰⁰

Fibrogênese é decorrente da sinalização de hepatócitos lesados e macrófagos ativados, levando a ativação de células estreladas quiescentes em miofibroblastos, os quais produzem colágeno e matriz protéica extracelular de forma mais rápida que sua degradação.¹⁵⁷

Células de Kupfer ativadas secretam, estimuladas por DAMPs, TGF-B (*tumor growth factor-B*), PDGF (*platelet-derived growth factor*), entre outros fatores que possuem estímulo mitogênico sobre células estreladas, promovendo fibrose.¹⁵⁸

Ativação de vias inflamatórias como NFkB e JNK são consideradas elementos chave linkando inflamação e fibrose.¹⁵⁹ Mediadores como TNF-alfa e IL-1B podem ativar NFkB nas células estreladas promovendo fibrose.¹⁵⁹ NLRP3 também contribui em larga escala para o desenvolvimento de fibrose decorrente de inflamação crônica.¹⁵⁶

Muitos fatores de transcrição e receptores como NFkB, NLRP3, AP-1, p-53, PPAR e Nrf2 são ativados por estresse oxidativo, que pode regular a expressão de muitos genes;

presença de estresse oxidativo e diminuição das defesas anti-oxidantes tem sido observados em quase todos os cenários de fibrose em modelos clínicos e animais.¹⁵⁹ EROS também podem interagir diretamente com as células estreladas (desequilíbrio redox pode contribuir na sua transformação da forma quiescente para ativada) ou estimular a geração de mediadores pró-fibrogênicos a partir de células inflamatórias.¹⁵⁹

A resposta primária contra estresse oxidativo/nitrosativo de leve a moderado é principalmente modulada pela cooperação destas vias: MAPK, NFκB e AP-1; entretanto, com o aumento de intensidade do estresse, a via Keap1-Nrf2-ARE também é ativada para induzir defesas anti-oxidantes.¹³⁹

Morte hepatocelular sustentada é outra característica comum de pacientes com NASH e tem sido implicada no desenvolvimento de fibrose.¹⁵⁸

Apoptose, um processo de morte programada altamente organizado e geneticamente controlado, é a forma predominante de morte celular em pacientes com NASH; pode ser iniciada por via extrínseca (receptores de membrana) ou por uma via intrínseca (disfunção de organelas como mitocôndria e retículo endoplasmático).¹⁵⁸

Ambas vias convergem para a ativação de caspases efetoras 3 e 7, que executam as alterações apoptóticas finais.¹⁶⁰

Portanto, estresse oxidativo e inflamação interagem entre eles para criar um ambiente favorável para o desenvolvimento de fibrose, desempenhando um papel importante na ativação de células estreladas.¹⁶⁰

2.4 SISTEMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTE

Estresse oxidativo pode resultar em adaptação, injúria ou morte celular.

Antioxidantes são fundamentais para manter a adaptação celular à injúria e o equilíbrio redox. Por definição, anti-oxidante é qualquer substância que retarda ou inibe a oxidação de um substrato.¹⁶¹ Se o sistema anti-oxidante estiver vulnerável, haverá estresse oxidativo.

Para manter a geração de EROS controlável no fígado, ambos sistemas de defesa anti-oxidante não enzimático e enzimático são ativados, e agem através de três linhas de defesa:

- a) primária: anti-oxidantes agem preventivamente (evitando a geração de novos EROS), extinguindo superóxido, e sequestrando íons metálicos, sendo o mecanismo de ação da maioria das enzimas anti-oxidantes, minerais (como Selênio, Zinco e Cobre) e algumas proteínas (como ferritina, que se liga a metais inibindo formação de EROS);
- b) secundária: anti-oxidantes agem após estresse oxidativo instalado, impedindo sua reação com substratos e evitando sua propagação (principalmente lipoperoxidação), sendo o mecanismo de ação de vitaminas, carotenoides, ácido úrico e outras moléculas;
- c) terciária: reparação de moléculas danificadas, sendo o mecanismo de ação de enzimas que reparam várias moléculas, como DNA, proteínas danificadas, lipídios oxidados e peróxidos.¹⁶²

2.4.1 Sistema Antioxidante Não Enzimático

Fazem parte do Sistema Antioxidante Não Enzimático, principalmente: glutathione (faz parte de ambos sistemas enzimático e não enzimático), vitamina C, vitamina E, carotenóides, albumina, bilirrubina, metais, ácido úrico, flavonóides e coenzima Q 10.¹⁶²

O Sistema Antioxidante Não Enzimático pode ser representado por substâncias endógenas como glutathione, ácido lipóico e L-arginina; também pode ser constituído por substâncias exógenas (que não podem ser sintetizadas diretamente *in vivo*) como vitaminas C e E.¹⁶³

Glutathione (GSH) é um tripeptídeo formado por três aminoácidos (ácido glutâmico, cisteína e glicina), sendo a cisteína (através do grupamento tiol) o seu sítio ativo. É sintetizada no fígado e encontrada no interior das células aeróbicas (especialmente hepáticas); o fígado

contém glutatona em todos os compartimentos celulares, assim como vitamina E em suas membranas.¹⁶³

Como cofator de GPx (glutaciona peroxidase), GSH catalisa a redução de H₂O₂ em H₂O e O₂, restringindo a formação de radical hidroxila.¹⁶¹ Também atua como cofator de outras enzimas detoxificadoras, como GST (glutaciona S transferase), converte vitamina C e E de volta a suas formas ativas, regula fatores de transcrição como NFκB e AP-1 e interage com vias de sinalização para impedir morte celular.¹⁶⁴

Glutaciona também tem função não enzimática através dos aminoácidos que a compõem, os quais são capazes de reagir com radicais livres como superóxido e radical hidroxila.¹⁶⁵ Depleção de GSH mitocondrial (mGSH) está implicada na patogênese de NASH e tem sido linkada com acúmulo de colesterol; supõe-se que o colesterol provoque alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial, impedindo o transporte de mGSH do citosol para a mitocôndria.¹⁶⁶

Vitaminas trabalham captando radicais livres para interromper a rede de reações em cadeia do estresse oxidativo, através de doação de elétrons; podem ser hidrossolúveis como vitamina C (ácido ascórbico) ou lipossolúveis como vitamina E (alfa-tocoferol), e podem agir sinergicamente.¹⁶⁷ Presentes em frutas e vegetais, vitaminas e carotenóides protegem o organismo da formação de radicais livres e baixos níveis circulantes associam-se com disfunção hepática.¹⁶⁸

Vitamina C, por ser hidrofílica, é um potente antioxidante intra e extra-celular, que elimina radicais livres como peroxila e hidroxila; também pode regenerar vitamina E nas membranas celulares ao combinar-se com GSH.¹⁶³

Vitamina E, cuja forma mais ativa é o alfa-tocoferol, é um potente anti-oxidante lipossolúvel presente nas membranas celulares, capaz de interceptar o radical peroxila e interromper a cadeia de lipoperoxidação.¹⁶⁷

Carotenóides são um outro grupo de nutrientes anti-oxidantes, presentes em frutas e vegetais, destacando-se entre eles b-caroteno e licopeno; por serem lipofílicos, protegem primordialmente membranas celulares e lipoproteínas da ação de EROS, especialmente radical peroxila e Oxigênio singlet.¹⁶⁹

Ácido úrico é responsável por aproximadamente 60% da capacidade anti-oxidante do plasma, e o seu efeito a nível tecidual tem sido objeto de estudo.¹⁶⁹

Polifenóis (flavonóides e não flavonoides) são uma classe heterogênea de componentes derivados de plantas que englobam vários anti-oxidantes hidrossolúveis.¹⁷⁰ Estão presentes em frutas, vegetais, chocolates e bebidas (como vinho tinto, café, chás) e apresentam efeitos hepáticos protetivos, como aumento da oxidação de ácidos graxos, modulação da resistência insulina e diminuição do estresse oxidativo (efeito anti-oxidante) e inflamação.¹⁷⁰

2.4.2 Sistema Antioxidante Enzimático

Existem várias evidências indicando que os mecanismos de defesas antioxidante estão alterados na DHGNA, ainda que haja divergência entre os resultados.¹⁷¹

Por causa da importância da mitocôndria como principal fonte geradora de EROS e do seu papel na DHGNA, os principais processos de eliminação de EROS encontram-se nesta organela.

Enzimas antioxidantes mitocondriais como GPx e Mn-SOD podem ser deficientes em pacientes com NASH e os níveis de catalase são incertos, mas acredita-se serem baixos na mitocôndria hepática.¹³⁰

SOD é considerada a primeira linha de defesa contra estresse oxidativo, eliminando o radical superóxido e impedindo a formação de peroxinitrito. SOD₂ (Mn SOD) é encontrada predominantemente nas mitocôndrias, também podendo existir nos peroxissomas; SOD1 (Cu-

Zn SOD) é mais frequente no citosol e espaço extra-celular, também existindo nos lisossomas, núcleos, e espaços intermembranosos das mitocôndrias.¹⁶⁵

SOD catalisa a dismutação de dois ânions superóxido em H₂O₂ e oxigênio molecular.¹⁷² Embora em modelos experimentais de NAFLD o aumento de superóxido seja um achado consistente, o status da SOD₂ não está estabelecido, podendo estar aumentada ou diminuída; há estudos que demonstram aumento de radical superóxido com aumento paradoxal na atividade de SOD₂.¹⁷³

A dismutação de superóxido, como mencionado, gera H₂O₂, um potente oxidante que pode ser degradado nas células hepáticas por várias enzimas anti-oxidantes, destacando-se as peroxiredoxinas (Prx), particularmente a Prx III mitocondrial, a glutathiona reduzida (GSH) e a glutathiona peroxidase (GPx), como a Gpx1 citosólica e a Gpx4 mitocondrial.¹⁷³

GPx é uma importante enzima que age na detoxificação de peróxidos e lipoperóxidos, impedindo a fase de propagação da lipoperoxidação. GPx, cujo centro catalítico utiliza Selênio, degrada H₂O₂ reduzindo-o a água, utilizando GSH como cofator (GSH doa elétrons para reduzir H₂O₂).¹⁷² Neste processo, GSH é convertida em glutathiona oxidada (GSSG), a qual pode ser novamente convertida (reduzida) em GSH pela ação da enzima glutathiona redutase (GR), utilizando NADPH (que é convertido em NADP⁺).¹⁷² A função de GR é manter a concentração de GSH alta e a concentração da forma oxidada (GSSG) baixa.

Glutathiona S-transferase (GST) é uma enzima presente em alta concentração no fígado (como todas as enzimas do sistema glutathiona) com papel primordial na detoxificação de substâncias exógenas (e também endógenas).

GSTs compreendem 3 famílias: GST citosólica (principal), GST mitocondrial e GST microsomal; GST citosólica é amplamente difundida no organismo e dividida em sete classes conforme suas propriedades físicas, químicas e estruturais: alfa, zeta, teta, mu, pi, sigma e ômega.¹⁷⁴

O mecanismo chave da GST é catalisar a conjugação de xenobióticos com glutathiona (GSH), levando quase sempre a formação de produtos menos reativos (e mais solúveis) que são rapidamente eliminados pela célula.¹⁷⁵ Glutathionas estão entre as principais enzimas detoxificadoras da fase 2 de detoxificação.

Além de detoxificarem xenobióticos eletrofílicos, as GSTs também podem inativar compostos endógenos como aldeídos, quinonas, epóxidos e hidroperóxidos formados como metabólitos secundários durante estresse oxidativo; também estão envolvidas na síntese de leucotrienos e prostaglandinas.¹⁷⁶

Entre os principais substratos das GSTs destacam-se nitrobenzenos, quinonas e carbonilas, especialmente CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno).¹⁷⁶

Hidrocarbonetos aromáticos oxidados por enzimas do citocromo P450 são substratos para múltiplas famílias e classes de GSTs.¹⁷⁵

GSTs também estão implicadas na modulação de vias de transdução relacionadas com sobrevivência celular e apoptose; podem inibir JNK diretamente.¹⁷⁴

Dosagem de GST no plasma é um marcador sensível de dano hepatocelular, podendo, segundo alguns autores, ser mais sensível do que a dosagem de transaminases.¹⁷⁷

O sistema tioredoxina, o qual consiste de uma família de proteínas, incluindo tioredoxina (Trx), peroxiredoxina (Prx) e tioredoxina redutase (TrxR) desempenha um papel crucial na defesa do organismo contra H₂O₂.¹⁷⁸

A atividade do sistema Prx/Trx protege as células do dano oxidativo de peróxido de hidrogênio, hidroperóxidos e peroxinitrito.¹⁷⁹

Especificamente, Trx doa elétrons para Prx reduzir H₂O₂; após, Trx oxidada é novamente reduzida ao seu estado original por TrxR, utilizando NADPH como co-fator.¹⁷⁶ O sítio ativo da Prx depende da conservação de um resíduo de cisteína.¹⁸⁰

Ao contrário de GPx e outras enzimas, Prx não depende de cofator, e segundo técnicas mais recentes, tem sido apontada por alguns autores como a maior enzima removedora de H₂O₂ do organismo.¹⁸⁰ O sistema Trx também tem outras funções relevantes contra o estresse oxidativo, como reparação de DNA, modulação de fatores de transcrição, modulação imune, controle da apoptose e do metabolismo lipídico.¹⁸¹

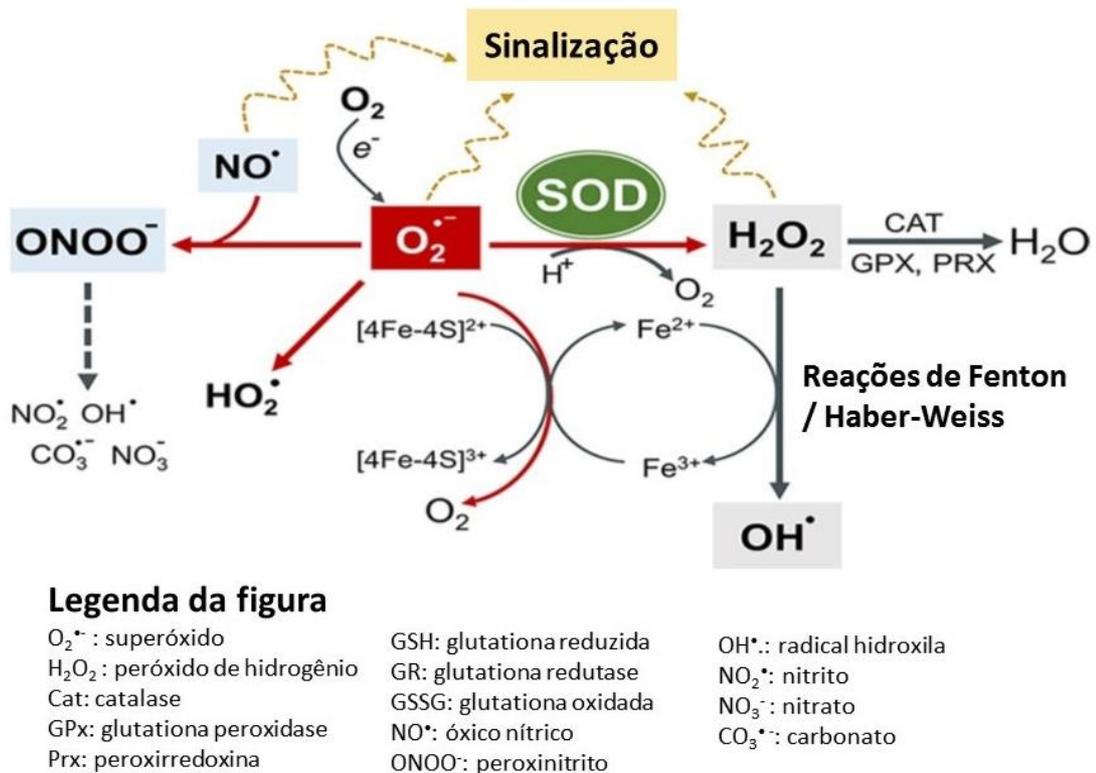
Trx1 é citosólica, enquanto Trx2 é mitocondrial.¹⁸¹

Catalase, outra enzima antioxidante que detoxifica o H₂O₂ decompondo-o em oxigênio molecular e água, predomina nos peroxissomas, não estando presente na maioria das mitocôndrias.¹⁸¹

Diminuição da atividade destas enzimas durante o estresse oxidativo ocorre ou por exaustão ou por inativação por radicais livres.¹⁷⁷

A figura 8 resume as principais reações químicas envolvidas na atividade de enzimas antioxidantes.¹⁸²

Figura 8 - Enzimas antioxidantes e suas principais reações químicas



Fonte: Adaptado de Wang et al.(2018)¹⁸²

2.5 DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA ASSOCIADA À TÓXICOS (*TAFLD/TOXICANT ASSOCIATED FATTY LIVER DISEASE*) E ESTEATO-HEPATITE ASSOCIADA À TÓXICOS (*TASH/TOXICANT ASSOCIATED STEATOHEPATITIS*)

2.5.1 Aspectos Gerais/Fisiopatologia Básica

Exposição a produtos químicos utilizados em vários processos industriais pode estar associada com hepatotoxicidade e DHGNA.

O fígado é o maior reservatório fixo de macrófagos (células de Kupfer) do organismo, além de possuir um duplo suprimento sanguíneo (recebe toxinas oriundas do intestino pela veia porta e artéria hepática), o que contribui para que seja o órgão mais comumente lesado por

químicos industriais; 33% dos 677 agentes químicos de uso mais comum nos Estados Unidos estão associados com hepatotoxicidade.¹⁸³

A maioria dos tóxicos industriais, incluindo solventes, exibe hepatotoxicidade dose-dependente (diferindo das reações idiossincrásicas causadas por drogas) e apresentam necrose como característica central; entretanto, colestase e hepatite aguda com rash e eosinofilia (semelhante a uma reação imunológica por drogas) tem sido relatados.¹⁸³

Entre as principais classes de químicos industriais associadas com hepatotoxicidade podemos destacar: solventes e outros hidrocarbonetos (incluindo compostos orgânicos voláteis/COVs), pesticidas, dioxinas, bifenilas policloradas (PCBs), metais (como arsênico, mercúrio e chumbo) e componentes nitro-orgânicos.¹⁸³

TAFLD (*toxicant-associated fatty liver disease*/doença hepática gordurosa associada a tóxicos) e TASH (*toxicant-associated steatohepatitis*/esteatohepatite associada a tóxicos) são termos utilizados desde 2010 por Cave e colaboradores para designar estas situações específicas de doença hepática associada à exposição química; TAFLD engloba todo o espectro de doença hepática gordurosa associada a tóxicos (esteatose, esteato-hepatite, cirrose e câncer).¹⁸⁴

TASH é a forma mais severa de TAFLD, caracterizando-se por esteatose, infiltrado inflamatório e em alguns casos fibrose; é uma das principais causas de esteato-hepatite, juntamente com álcool (ASH) e obesidade/ síndrome metabólica (NASH).¹⁸³ Assim como na NASH, podem haver alterações no metabolismo intermediário (incluindo resistência insulínica) e disfunção de adipocinas.¹⁸⁵

No estudo icônico de Cave e colaboradores (2010) envolvendo trabalhadores altamente expostos a cloreto de vinila em uma planta industrial, a prevalência de hepatite foi de 80% e 55% apresentavam fibrose, com elevação de citocinas inflamatórias, depleção de defesas antioxidantes e aumento da resistência insulínica; biópsias hepáticas foram semelhantes às da

esteato-hepatite alcoólica (ASH) e da esteato-hepatite não alcoólica (NASH), porém os pacientes não eram etilistas ou obesos.¹⁸⁴

Importante destacar que os estudos pioneiros que demonstraram a relação de produtos químicos com esteato-hepatite (TASH) foram realizados no nordeste do Brasil por Cotrim e col. em 1999, envolvendo trabalhadores do polo petroquímico assintomáticos com transaminases elevadas (> 3x LSN) em três medições, após excluídas outras causas frequentes de hepatopatia, como hepatites virais, hepatite auto-imune, etilismo, drogas e hemocromatose; os achados histológicos foram compatíveis com agressão tóxica e melhoraram em biópsias realizadas 8-14 meses após o afastamento do trabalho.¹⁸⁶

Estudo similar publicado pelo mesmo grupo envolveu trabalhadores da indústria petroquímica com DHGNA e buscou identificar a associação ou não de exposição ocupacional (benzeno, xileno, etileno, dimetilformamida, cloreto de vinila e outros) com resistência insulínica, conforme Cotrim e col.¹⁸⁷

Biópsia hepática foi realizada em 32 pacientes e 22 (68,8%) apresentaram esteato-hepatite com fibrose; resistência insulínica foi ausente em 72,5% dos pacientes com DHGNA, sendo que 37,9% destes pacientes não possuíam fatores de risco metabólicos.¹⁸⁷

Outros estudos envolvendo outros agentes hepatotóxicos como tetracloreto de carbono e bifenilas policloradas evidenciaram aumento na resistência insulínica^{185,188}, a qual pode ter um papel decisivo na instalação de TAFLD, como ocorre na DHGNA, porém esta associação ainda requer comprovação em mais estudos.

O mecanismo geral de hepatotoxicidade pode ser dividido em duas grandes categorias: **toxicidade intrínseca**, de alta incidência e dose-dependente, ocorre lesão nos hepatócitos por efeito físico-químico direto (ex: tetracloreto de carbono), podendo também ser indireta (através de alteração de rotas metabólicas)- citotóxica (ex: álcool) ou colestática (ex: MDA/metilenodianilina); **idiossincrasia** é outro mecanismo possível, porém com menor

incidência e sem relação com a dose, representado pelas reações imunológicas de hipersensibilidade.⁷⁵

A patogênese de TAFL/TASH não está totalmente elucidada, embora diversos mecanismos responsáveis pelo seu estabelecimento sejam conhecidos.

Diversos fatores contribuem para o surgimento de TAFLD, como: disfunção mitocondrial (diminuição da Beta oxidação mitocondrial via diminuição do co-fator NAD consumido por certos tóxicos), resistência insulínica (através de aumento da lipólise/liberação de ácidos graxos, diminuição na Beta oxidação mitocondrial e prejuízo na síntese de VLDL), redução na síntese de VLDL ou da secreção de triglicerídeos no plasma como VLDL, aumento na produção de citocinas (TNF alfa em ratos aumenta a lipólise e a lipogênese e diminui a Beta oxidação mitocondrial).¹⁸⁹

Alguns tóxicos como tetracloreto de carbono por exemplo, agem em todas estas vias, resultando em esteatose.¹⁸⁹

A patogênese da TASH, por sua vez, também não está totalmente elucidada, sendo estes os principais mecanismos envolvidos: **a) Inflamação, b) Disfunção Mitocondrial, c) Citocromo P 450, d) Estresse Oxidativo.**¹⁹⁰

a) Inflamação: em resposta a ativação por agentes químicos (muitas vezes pela ação direta de tóxicos e seus metabólitos) ou através de DAMPs (injúria tóxica inicial produz necrose focal), células de Kupfer são ativadas, resultando na produção de interleucinas inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF-alfa, que desencadeiam um infiltrado inflamatório, colestase e por vezes fibrogênese (com envolvimento de células estreladas), colaborando para a progressão da doença.¹⁹⁰ Inflamação é um achado frequente em hepatotoxicidade, e o fenótipo inflamatório pode ser atribuído à resposta imune inata gerada por células de Kupfer, monócitos, neutrófilos, e linfócitos; a resposta imune adaptativa também é influenciada pela resposta imune imediata, levando ao dano hepático.¹⁹¹ Neutrófilos são prontamente ativados por citocinas e outros

mediadores inflamatórios, acumulando-se nos sinusóides hepáticos; quando recebem um sinal quimiotático podem extravasar e atacar hepatócitos disfuncionais (não atacam hepatócitos normais), gerando lesão; podem causar morte celular principalmente através da geração de EROS por suas enzimas, como as NOX e as mieloperoxidases.¹⁹¹

Linfócitos inatos no fígado adulto incluem natural killer (NK) e *natural killer T cells* (NKT); estas células são potentes produtores de citocinas e influenciam ambas respostas imunes inata e adaptativa no fígado.¹⁹² Populações de linfócitos adaptativos, incluindo linfócitos T CD4+ e CD8+ e linfócitos B, também são encontradas no fígado, que embora muitas vezes não seja visto como um órgão imunológico, desempenha um papel imunológico ativo e pode ser alvo de reações imunoalérgicas.¹⁹²

Estudos experimentais com tetracloreto de carbono demonstraram infiltração de monócitos e aumento da fibrogênese.¹⁹³

Outros estudos experimentais com cloreto de vinila e seus metabólitos evidenciaram infiltrado de neutrófilos no fígado, sem recrutamento de macrófagos, indicando uma resposta inflamatória focal específica; ativação de inflamassomas também desempenhou um papel chave neste modelo.¹⁹³ O papel da resposta inflamatória na TASH ainda é pouco compreendido, com poucos estudos disponíveis.

b) Disfunção Mitocondrial: vários xenobióticos, como solventes, se concentram nas mitocôndrias atraídos pela lipossolubilidade da camada bilipídica de suas membranas, modificando a atividade catalítica de enzimas mitocondriais envolvidas em diversos processos, como transferência de elétrons, reações redox, síntese protéica e reparo de DNA.¹⁹⁴ Formação de poros e alteração de permeabilidade da membrana externa também ocorre na TASH. Inibição da oxidação de ácidos graxos a nível mitocondrial também ocorre, causando esteatose.

A vulnerabilidade das mitocôndrias ocorre por diversos motivos: ausência de histona, presença de citocromo P450 mitocondrial (gerador de radicais livres), lipossolubilidade das membranas, existência de poucas vias de reparo de DNA; além disto, muitos tóxicos (como metais pesados) podem adentrar a mitocôndria através dos canais de cálcio, substituindo cofatores de enzimas (inativando por exemplo enzimas anti-oxidantes).¹⁹⁵

c) Citocromo P450: após exposição química, muitos xenobióticos não são absorvidos ou são rapidamente eliminados pelos rins e pela bile (se forem hidrossolúveis); outros são metabolizados e detoxificados.¹⁹⁶ Dos xenobióticos absorvidos, a maioria são altamente lipossolúveis, sendo pouco excretados pelos rins; o fígado desempenha papel crucial no metabolismo destes componentes, transformando-os em metabólitos mais hidrossolúveis, passíveis de excreção.¹⁹⁷

Isto se dá a partir de reações de detoxificação ou metabolismo de primeira passagem (fase I e II), as quais podem ocorrer no fígado simultaneamente ou sequencialmente, catalisadas por cerca de um milhão de enzimas envolvidas no processo de oxidação/detoxificação; fase III é uma via alternativa no qual proteínas transportadoras especiais facilitam a excreção de xenobióticos, metabólitos e seus conjugados para o interior de sinusóides e canalículos biliares.

¹⁹⁶

Na fase I a maioria dos xenobióticos (como drogas e tóxicos ambientais), além de substâncias endógenas como ácidos graxos, esteroides e prostaglandinas, sofrem processo de oxi-redução ou hidrólise através da adição de um grupo reativo (hidroxila, carboxila, aminogruppo...); enzimas conhecidas como oxidases de função mista, representadas basicamente por citocromo P450 e NADPH-citocromo P450 redutase comandam esta via metabólica.¹⁹⁸ Na fase II, enzimas como glutatonas e UGTs (UDP-glucuro nosyl transferases) conjugam os metabólitos em conjugados menos tóxicos e ainda mais hidrofílicos que serão excretados então por rins ou bile. Estas reações de fase II envolvem a transferência de compostos hidrofílicos

através de enzimas correspondentes: ácido glucurônico é transferido por UGTs, sulfatos por sulfotransferases, glutatona por glutatona transferases, aminoácidos por aminoácido transferases, grupos acetil por N-acetiltransferases, entre outros.¹⁹⁹

Enzimas do citocromo P 450 (também conhecidas como oxidases ou hidroxilases) são uma grande família de monooxigenases que se caracterizam por conter heme em sua estrutura (oxidam um substrato usando ferro).

Dos 57 citocromos funcionais em seres humanos, somente cerca de uma dúzia de enzimas (a maioria pertencente aos citocromos 1, 2 e 3) são responsáveis pela biotransformação da maioria dos xenobióticos, incluindo 70-80% de todas as drogas.²⁰⁰

Citocromo P450 3A4, 1A2, 2E1, 2C8 E 2C9 são as formas mais expressas no fígado, enquanto 2A6, 2B6, 2D6, 3A5 e 2C19 são menos expressos no fígado e 1A1, 1B1 e 2J2 são expressos principalmente em tecidos extra-hepáticos.²⁰⁰ Além de drogas e tóxicos ambientais, citocromo P450 metaboliza hormônios (como estrogênio e progesterona), ácidos graxos, colesterol e carcinógenos.²⁰¹ Sua função predominante é detoxificadora, mas algumas vezes podem formar compostos intermediários tóxicos ainda mais reativos que o composto original, processo conhecido como bioativação.²⁰¹ Fatores que influenciam a efetividade deste sistema enzimático, incluem: variação genética intra ou inter-individual, idade, estado nutricional, interação com drogas (indução ou inibição enzimática), enfermidades, uso de álcool, atividade física e efeitos tóxicos ambientais.²⁰² Diminuição no metabolismo hepático e/ou elevada produção de metabólitos tóxicos podem diminuir a eficácia do sistema e modular hepatotoxicidade.²⁰² Citocromo P450 também pode ser regulado por diversas citocinas; estados inflamatórios podem reduzir sua atividade, já que NFκB pode se ligar a receptores de xenobióticos diminuindo sua regulação.²⁰³ A indução de enzimas do citocromo P450 por regulação transcricional de genes se dá a partir do reconhecimento de xenobióticos por receptores de ativação nuclear (sensores), como PXR (*pregnane X receptor*), CAR (*constitutive*

androstane receptor) e AhR (*aryl hydrocarbon receptor*), os quais regulam respectivamente os citocromos 3A4, 2B e 1A2.²⁰³ AhR é um receptor de reconhecimento de muitos tóxicos ocupacionais como dioxinas (como TCDD/tetraclorodibenzeno-p-dioxina) e hidrocarbonetos aromáticos halogenados e policíclicos.²⁰³

Citocromo 3A4 é amplamente expresso no fígado (e também é o citocromo mais expresso no intestino), sendo responsável pela detoxificação de mais de 50 % dos produtos farmacêuticos e também xenobióticos como hidrocarbonetos aromáticos e aflatoxinas; citocromo 1A2 tem conhecido papel na bioativação carcinogênica de hidrocarbonetos aromáticos como benzeno, de bifenilas policloradas e outros compostos tóxicos.²⁰⁰

Citocromo 2E1 são enzimas chaves na patogênese de várias doenças (como NASH), e são responsáveis pela detoxificação de vários agentes com ação sobre o sistema nervoso central, como etanol, halotano, isoflurano e hidrocarbonetos; produzem sempre radicais livres (independente do substrato), e estão linkados com resistência insulínica através da supressão de GLUT-4.²⁰⁰ Além disto, o aumento da atividade de citocromo 2E1 em pacientes com NASH (ao contrário de outros citocromos costuma aumentar sua atividade em estados inflamatórios), torna o fígado mais suscetível à hepatotoxicidade por xenobióticos.²⁰⁴ Solventes como tolueno mostraram ser capazes de induzir citocromo 2E1, além dos citocromos 2B1/2, 1A1/2 e 3A1.²⁰⁵

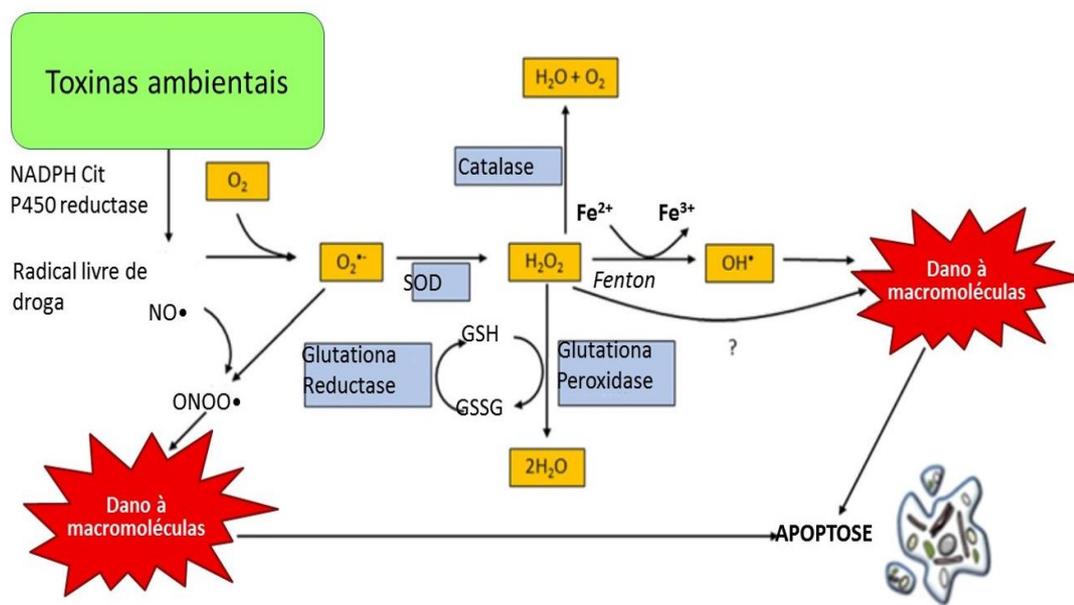
Citocromo 2D6 corresponde a apenas 4% do total de citocromos, entretanto está envolvido na biotransformação de mais de 25% das drogas relevantes.²⁰⁴ NADPH-citocromo P450 redutase, outra oxidase de função mista, devido ao seu papel preponderante na patogênese da TASH (através da produção de estresse oxidativo), será abordada no ítem a seguir.

d) Estresse Oxidativo: formação de radicais livres e ativação de estresse oxidativo ocorrem após exposição à muitas substâncias tóxicas, como: tolueno, etanol, chumbo, arsênico, radiação ionizante, entre outros.²⁰⁶

Estes xenobióticos produzem estresse oxidativo através de múltiplos mecanismos: ativação de NADPH-citocromo P450 redutase, ativação de outras isoformas de citocromo P450, geração de NADH no citosol, disfunção mitocondrial e aumento de radicais livres nas mitocôndrias, inflamação, produção de quinonas, etc.²⁰⁶

Estresse ambiental gerado por xenobióticos, como drogas e tóxicos ambientais, pode levar à geração de **radicais livres de drogas** através de redução monoelétrica catalisada pela NADPH-Citocromo P450 redutase (que doa um elétron para o substrato); estes radicais reagem rapidamente com oxigênio molecular para formar superóxido (que pode reagir com óxido nítrico formando peroxinitrito) e outros radicais livres, danificando macromoléculas.¹²⁴

Figura 9 - Geração de estresse oxidativo por xenobióticos



Fonte: Adaptado de Redza-Dutordoir et al (2016).¹²⁴

A bioativação de xenobióticos na fase I de detoxificação, portanto, está estreitamente relacionada com mecanismo oxidativo (transporte de elétrons) e geração de metabólitos tóxicos durante o metabolismo intermediário. Entre estes metabólitos tóxicos formados, destacam-se as quinonas, radicais com alto poder oxidativo, capazes de gerar radicais livres e danificar

proteínas e DNA (promovendo mutações e eventualmente câncer); quinonas podem gerar ciclos redox fúteis (que se perpetuam mesmo sem substrato) e também se ligar de forma covalente com GSH, causando depleção nas defesas anti-oxidantes.²⁰⁷ Estresse do retículo endoplasmático também está associado com a geração de quinonas.²⁰⁸

A maioria dos xenobióticos geram quinonas, as quais podem sofrer redução monoelétrica pela NADPH-citocromo P450 redutase gerando radicais semiquinonas, os quais podem ativar ciclos redox gerando novos radicais livres e estresse oxidativo.²⁰⁸

NQO1 (NADPH quinone oxidoreductase 1) é considerada uma enzima protetiva na toxicidade induzida por quinonas, por diminuir o estresse oxidativo, catalisando a redução de dois elétrons das quinonas em hidroquinonas (menos tóxicas), evitando a formação de semiquinonas; entretanto, as hidroquinonas podem sofrer auto-oxidação e desta forma gerar radicais livres.²⁰⁶ Em vários tecidos, como fígado, rins e pulmões, NQO1, (enzima de fase II), é induzida por estresse oxidativo e sua expressão é regulada pela via Keap1/Nrf2/ARE.²⁰⁹

2.5.2 Solventes Orgânicos

Solvente orgânico pode ser definido como um líquido que tem a capacidade de dissolver um soluto sem alterar as propriedades químicas de ambos.²¹⁰ Embora possuam ações tóxicas diferentes, mesmo dentro de um mesmo grupo, possuem características comuns: pelo menos um átomo de hidrogênio ou carbono na estrutura, volatilidade, lipofilicidade, e são geralmente inflamáveis.

São obtidos a partir do petróleo e podem dissolver substâncias como tintas, resinas, borracha, cola, verniz, laca, plásticos; também são utilizados em misturas como gasolina, querosene, thinner, removedores, lubrificantes e produtos de limpeza.²¹¹ São amplamente utilizados em diversos processos industriais, como pintura, chapeação, confecção de calçados,

desengraxamento, processamento de metais, manutenção aeronáutica e como químicos intermediários.²¹² Também são empregados para produzir adesivos, em atividades de impressão, na indústria farmacêutica, indústria têxtil, como pesticidas e cosméticos, entre outros; é estimado que 8% dos operários da indústria sejam expostos a solventes.²¹⁰

50% dos solventes são utilizados na fabricação de tintas, colas, vernizes e cosméticos, 20% na confecção de sapatos, 10% na produção de agrotóxicos, 10% na limpeza de metais, lavagem a seco, indústria têxtil e farmacêutica.²¹³ Por serem voláteis, são geralmente absorvidos por via inalatória, mas absorção cutânea é relevante em certas situações como pintura industrial e desengraxamento.²¹⁰ Absorção via digestiva, embora geralmente ocorra rapidamente, é infrequente no ambiente ocupacional.

Pode ocorrer através de alimentação no ambiente de trabalho, contato com água contaminada, tabagismo, ou mesmo de forma intencional (tentativa de suicídio).

Solventes orgânicos podem ser encontrados também a nível domiciliar ou como poluidores ambientais (poluição aérea, água e alimentos contaminados, exposição à água quente de banheira ou chuveiro...), especialmente ao redor de áreas de produção industrial. O quadro 3 resume a intensidade da exposição de acordo com a ocupação profissional.²¹⁰

Quadro 3 - Intensidade da exposição a solventes conforme a ocupação profissional

OCUPAÇÃO	INTENSIDADE DA EXPOSIÇÃO
Limpeza a seco Impressão de rotogravuras Impressão de telas Pintura industrial Manufatura de plástico reforçado com vidro Fixação de ladrilhos	ALTA
Pintura doméstica Fabricação de tintas Mecânica (chapeação) Desengraxamento industrial	MODERADA
Atendente de bomba de gasolina Marceneiro Carpinteiro Operador de processos químicos Limpador com polimentos Técnico de laboratório	BAIXA

Fonte: Adaptado de Dick.(2006).²¹⁰

O metabolismo dos solventes geralmente é hepático, envolvendo principalmente o citocromo P450; podem ser excretados inalterados na urina ou através da exalação.

Existe uma grande variabilidade individual em relação à hepatotoxicidade por solventes. Entre os fatores que contribuem para isto, podemos citar: tipo de solvente (os halogenados tendem a ser mais tóxicos), fluxo sanguíneo hepático (afetado diretamente pelo exercício físico), fatores genéticos (atividade do citocromo P450 e outras enzimas são diferentes entre os indivíduos), idade (idosos são mais suscetíveis à hepatotoxicidade), sexo, etnia, estado nutricional (aumento do tecido adiposo favorece hepatotoxicidade e desnutrição também), ligação com proteínas e pontos intracelulares de ligação dos solventes, álcool (muitos solventes disputam mesmo metabolismo enzimático com o álcool), interação medicamentosa, doença hepática subjacente, entre outros.²¹²

Exposição ocupacional a solventes pode causar dano hepático de forma insidiosa, mesmo os solventes mais fracos em grandes quantidades podem causar esteato-hepatite, necrose hepática aguda e síndrome hepatorenal (esta última descrita por exemplo em abuso por tolueno).²¹⁴

A magnitude do dano varia dependendo da composição do solvente ou da mistura de solventes e da extensão da exposição, sendo pior em espaços fechados (principalmente confinados); solventes são tóxicos para o fígado, sistema nervoso central, coração, rins, pulmões, órgãos endócrinos e metabolismo, aparelho auditivo, músculo e órgãos reprodutivos, e alguns são cancerígenos.²¹⁴

Misturas de solventes são mais frequentes do que o seu uso isolado; além disto, quando sistemas de pintura baseados em solventes foram usados, o fator aditivo foi 3 vezes maior do que os sistemas de solvente baseados em água (em sistemas de pintura predomina tolueno, em sistemas baseados em água xileno).²¹⁵

Esteatose é um achado comum em exposição a solventes, e é um bom marcador de hepatotoxicidade (excluída outras causas); necrose é o segundo efeito mais comum de dano hepático por solventes.²¹⁰ Análise de dois grandes bancos de dados nos Estados Unidos sobre esteatose em modelos experimentais demonstrou que depois de pesticidas (responsáveis por 44% dos casos de TAFLD em roedores), solventes ficaram em segundo lugar.²¹⁶

Existe uma ampla variedade de classes de solventes, como cetonas, álcoois, éteres, ésteres e glicóis. Os de interesse clínico, porém, especialmente no que tange à esteato-hepatite por solventes (TASH), são principalmente os hidrocarbonetos (disfunção mitocondrial está diretamente relacionada com o grau de cloração de uma molécula).¹⁸⁹

Hidrocarbonetos são um grupo heterogêneo e incluem substâncias orgânicas compostas primariamente por Hidrogênio e Carbono; podem ser classificados como alifáticos quando as moléculas de carbono são arranjadas em uma cadeia linear ou ramificada (aberta) e aromáticos

quando as cadeias de carbono são arranjadas em um anel.²¹¹ Hidrocarbonetos halogenados são um subgrupo de todos os hidrocarbonetos nos quais um ou mais átomos de Hidrogênio são substituídos por átomos halogênicos (nome dado aos elementos químicos Cloro, Bromo, Fluor e Iodo).²¹¹ Geralmente são utilizados no âmbito ocupacional compostos clorados.

Os principais solventes orgânicos que são fatores causais de TAFLD/TASH serão abordados a seguir:

HIDROCARBONETOS ALIFÁTICOS HALOGENADOS: estão incluídos neste grupo **tetracloroeto de carbono, clorofórmio, cloroetano** (como o 1,1,1-tricloroetano/ 1,1,2-tricloroetano e 1,1 dicloroetano/1,2 dicloroetano), **tricloroetileno e percloroetileno**.

Tetracloroeto de carbono e clorofórmio são potentes anestésicos com alto potencial de necrose hepática e renal e características comuns, já que o clorofórmio é um dos seus metabólitos, sendo obtido industrialmente através da redução do tetracloroeto de carbono.

Tetracloroeto de carbono já foi amplamente utilizado como solvente de limpeza a seco, em refrigeração, extintor de fogo, anti-helmíntico e na fabricação de CFC (clorofluorcarbono ou freon).²¹⁷ Devido à toxicidade hepática e conhecida carcinogenicidade em animais (e provavelmente também em humanos/pode causar hepatocarcinoma) e aos danos causados pelo CFC na camada de ozônio, sua função tornou-se limitada; atualmente é utilizado principalmente como intermediário na fabricação química.²¹⁷ Também é muito utilizado em pesquisa experimental, para reproduzir cirrose hepática em modelos animais.

Clorofórmio (também conhecido como triclorometano) foi inicialmente utilizado como anestésico, anti-helmíntico, e na produção de CFC, mas devido à sua toxicidade (que é ligeiramente inferior a do tetracloroeto de carbono), seu uso foi limitado como solvente e removedor na indústria química e farmacêutica, além de ser usado na cloração da água (em baixas doses).²¹⁷ Também tem sido utilizado na limpeza de plásticos e como adesivo.²¹⁸

A intoxicação por tetracloreto de carbono ocorre principalmente por via inalatória, levando à múltipla falência de órgãos e morte em 25% dos casos (geralmente por insuficiência renal); uma fase prodrômica consistindo de tonturas, cefaleia, confusão, náuseas, vômitos e diarreia dura 1-2 dias antes da instalação de insuficiência hepática aguda (icterícia é encontrada na metade dos casos).¹⁸³

Depressão do SNC, arritmias (sensibilização do miocárdio por catecolaminas) e depressão cardiorrespiratória também podem ocorrer; dano testicular e ovariano é relatado em doses tóxicas em animais.²¹⁹

Em pacientes expostos a tetracloreto de carbono, sintomas foram relatados nos primeiros 5 minutos da exposição e ele foi detectado no ar exalado em 15 minutos.²¹⁹ Em estudos animais, esteatose foi proeminente em 3hs após exposição e necrose e inflamação em 6hs.²²⁰

O metabolismo é predominantemente hepático, mas também em rins, pulmões e outros tecidos contendo citocromo P450; uma fração substancial (30-50%) é eliminada inalterada no ar exalado.²¹⁹

A bioativação do tetracloreto de carbono em radical triclorometila, principal responsável pelos seus efeitos tóxicos, se dá principalmente através do citocromo P450 2E1; radical triclorometila causa extensa lipoperoxidação no fígado, e o estresse oxidativo é responsável pela necrose maciça em modelos animais (inflamação subsequente e liberação de citocinas e ceramidas também parecem estar envolvidos no quadros mais graves de insuficiência hepática e renal).²¹⁹

Cloroetanos (1,1/1,2 dicloroetano e 1,1,1/1,1,2-tricloroetano) surgiram como alternativa aos solventes mais tóxicos, sendo utilizados principalmente como solventes (para dissolver colas e tintas na indústria), químicos intermediários (na fabricação de cloreto de vinila, entre outros) e desengraxantes.²²¹ São depressores do SNC, produzindo efeitos que

variam de cefaleia, vertigens, náuseas, irritabilidade, tremores, sonolência, alteração de humor, distúrbio de comportamento, alteração de memória, incoordenação motora e neuropatias, até depressão grave do SNC, podendo haver paralisia, inconsciência, anestesia, convulsões, coma e morte; sintomas cardíacos (insuficiência cardíaca, miocardiopatias, arritmias/sensibilização à catecolaminas, hipotensão), respiratórios (tosse, dispneia, broncoespasmo) e cutâneos (dermatite, alterações esclerodermia-like) também podem ocorrer.²²¹

1,1 dicloroetano e 1,1,1-tricloroetano, embora possam causar hepatotoxicidade após exposição aguda e crônica, geralmente esta restringe-se à formas leves e transitórias (o que leva ao seu maior uso em relação aos respectivos isômeros), com elevação de transaminases, hepatomegalia e esteatose, podendo haver necrose; os sintomas mais graves de intoxicação costumam ser neurológicos (incluindo a neuropatia periférica associada ao 1,1,1-tricloroetano), ainda que casos de hepatite e cirrose hepática após uso de 1,1,1 tricloroetano tenham sido relatados.²²¹ Por outro lado, **1,2-dicloroetano e 1,1,2 tricloroetano**, devido à particularidades do seu metabolismo (maior metabolismo e bioativação hepática que seus isômeros), são mais hepatotóxicos e danosos ao organismo, exibindo também nefrotoxicidade.

Estresse oxidativo também parece contribuir para a maior toxicidade do 1,1,2-tricloroetano em relação ao seu isômero 1,1,1-tricloroetano.²²²

1,2–dicloroetano causou elevação de transaminases, hepatomegalia e esteatose em ratos, e elevação de transaminases, hepatomegalia e necrose em seres humanos; 1,1,2-tricloroetano parece ter potencial de causar esteato-hepatite e hepatocarcinoma em animais.¹⁸³

Tricloroetileno é amplamente utilizado como desengraxante industrial de metais (especialmente à vapor) e também como solvente e intermediário químico, especialmente na indústria automotiva, metalúrgica e aeronáutica; também na indústria de eletrônicos, galvanização e impressão.^{223,224} Também é frequente o uso doméstico em produtos como

líquidos corretores de texto, colas, adesivos e removedores.²²³ É um contaminante maior do solo e lençol freático.²²⁴

Como a maioria dos solventes, costuma ser absorvido via inalatória e o alvo principal de sua ação é o sistema nervoso central, mas hepatotoxicidade e nefrotoxicidade também são relevantes; os efeitos gerais se assemelham aos cloroetanos, com algumas particularidades.

Em um estudo, 10% dos trabalhadores com mais de 30 anos de exposição à tricloroetileno desenvolveram icterícia, apresentando necrose aguda ou subaguda similar à vista com o uso de tetracloreto de carbono.²²⁵

Esteatose hepática e alterações no metabolismo lipídico foram demonstradas após exposição à tricloroetileno em modelos experimentais.²²⁶

Menos frequente, mas relevante diante da pouca resposta a corticoides e dificuldade de manejo, é a síndrome de hipersensibilidade ao tricloroetileno, caracterizada por dermatite esfoliativa, erosão de mucosas, esteato-hepatite e eosinofilia.²²³

Percloroetileno (ou tetracloroetileno), toxicologicamente similar ao tricloroetileno, é o solvente mais utilizado em lavagem à seco; também é utilizado no desengraxamento de metais, na indústria têxtil e como químico intermediário, além de produtos domésticos como removedores, lubrificantes de silicone e alimentos, entre outros.²²⁷

Como outros solventes, é tóxico para fígado, rins e sistema nervoso central, e pode ser carcinogênico; 80-90% é excretado inalterado no ar expirado, enquanto o mecanismo de hepatotoxicidade proposto envolve seu principal metabólito (ácido tricloroacético), que age através de vários mecanismos, como estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, dano ao DNA e possível resposta imune-mediada.²²⁷ Injúria hepática na forma de hepatomegalia, icterícia, aumento de transaminases e bilirrubinas tem sido descrita; na maioria dos casos a hepatotoxicidade foi transitória, mas há relatos (infrequentes) de insuficiência hepática aguda,

bem como evolução para cirrose.²²⁷ Hepatite por exposição crônica ao percloroetileno tem sido descrita.

Broadkin relatou aumento de ecogenicidade leve a moderado com exposição à percloroetileno (achado com >90% de sensibilidade e especificidade para esteatose).²²⁸ Bagnell relatou um caso de uma criança exposta a percloroetileno através do leite materno que desenvolveu icterícia obstrutiva com rápida melhora clínica após retirada da fonte de exposição.

229

Exposição a percloroetileno também está relacionada com aumento significativo do risco de aborto e com perda da visão colorida (especialmente na discriminação azul/amarelo).

230,231

HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS: o odor adocicado característico levou a esta denominação os compostos formados por anel de benzeno, como tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX); por possuírem alta pressão de vapor em condições normais de temperatura e pressão, evaporando muito facilmente, também são conhecidos como **COVs** (compostos orgânicos voláteis).

São (antes de evaporarem) líquidos incolores facilmente inflamáveis, utilizados principalmente como solventes e químicos intermediários.

Intoxicação aguda por solventes aromáticos (depressores do sistema nervoso central), costuma causar um quadro clínico similar à embriaguez: inicialmente euforia e desinibição, evoluindo para sintomas pré-narcóticos como tonturas, náuseas, vômitos, incoordenação, prejuízo de julgamento, parestesias, aumento da salivagem e taquicardia; altas doses de neurotoxinas podem causar coma, convulsões e morte.²³²

Repetida exposição a solventes pode causar sintomas persistentes, como cefaleia, fadiga, irritabilidade, alteração de memória, depressão, instabilidade emocional, distúrbio do

sono, intolerância ao álcool, perda de libido, impotência e perda de interesse pelas atividades diárias; encefalopatia tóxica crônica também pode ocorrer, resultando em alteração de memória, prejuízo psicomotor, prejuízo na fala e distúrbio de humor (podendo persistir mesmo após o fim da exposição).²³²

Hepatotoxicidade, irritação de mucosas, pneumonia química, alteração de fertilidade, nefropatia, dermatite, ototoxicidade e distúrbios hematológicos (estes especialmente com benzeno) são efeitos comuns aos COVs.

Tolueno (metilbenzeno) é utilizado principalmente na produção de benzeno (>50% do seu uso), mas também é muito utilizado como solvente, como constituinte da gasolina, na produção de xileno e di-isocianato (precursor da espuma de poliuretano).²³³ Como solvente, é utilizado na fabricação de tintas, colas, vernizes, corantes, laca, limpadores, adesivos, cosméticos, pesticidas, produtos farmacêuticos, alimentos, entre outros. A poluição ambiental por tolueno ocorre principalmente pela combustão de combustíveis.

Os maiores níveis de exposição a tolueno tem sido encontrados em atividades como pintura, impressão, indústria automotiva e indústria do calçado.²³⁴

Tolueno é o principal componente do tiner (60-70%), amplamente utilizado a nível industrial e doméstico; esta mistura de solventes frequentemente apresenta também baixa percentagem de benzeno (0-2,2% em um estudo mexicano).²⁰⁶

Após absorção via inalatória (também tem considerável absorção cutânea), tolueno é biotransformado (oxidado) em álcool benzílico e após em benzaldeído, o qual é convertido em ácido benzóico, que é conjugado com glicina para formar ácido hipúrico e ser excretado na urina (este último um biomarcador urinário do tolueno).

Destes, benzaldeído é um dos metabólitos intermediários mais tóxicos, por formar EROS; também uma via metabólica minoritária que deriva na formação de cresol pode formar

epóxidos intermediários que podem gerar estresse oxidativo e dano ao DNA.²³⁴ Estresse oxidativo tem sido considerado o principal mecanismo de toxicidade do tolueno.

Intoxicação aguda por tolueno pode causar, além dos sintomas neurológicos já referidos, injúria hepática e síndrome hepatorenal, rabdomiólise (80%), hipocalcemia, acidose metabólica e arritmias; fosfatase alcalina e gama GT costumam estar desproporcionalmente elevados (injúria biliar) em relação ao grau de injúria hepatocelular.²³⁵ Injúria hepática na intoxicação aguda por tolueno parece ser leve e não contribui para a mortalidade.²³⁵

Exposição crônica a baixas doses de solventes aromáticos e alifáticos entre pintores causou esteatose em uma série de trabalhadores expostos a solventes, conforme Dossing e col.²³⁶

Um estudo com trabalhadores da indústria petroquímica expostos a COVs demonstrou que 29,4% apresentaram alterações de transaminases, e destes, 51,9% apresentaram esteatose hepática na ecografia, conforme Perez e col.²³⁷ Estudos experimentais também evidenciaram que o tolueno causa esteatose em modelos animais.²¹⁶

Esteato-hepatite por mistura de solventes (aromáticos e outros), como já referido, foi descrita em um estudo entre trabalhadores da indústria petroquímica brasileira, conforme Cotrim e col.¹⁸⁵ Hepatite aguda a tolueno (geralmente em abusadores) tem sido descrita em relatos raros, com presença de icterícia, náuseas, vômitos e insuficiência renal.²³⁸

Estudos em animais demonstram que após uso de solventes como tiner, a função hepática tende a normalizar após 4 semanas sem exposição.²³⁹

A capacidade que alguns solventes (caso do xileno e seus isômeros) possuem para induzir o citocromo P450 sugere a possibilidade de efeitos sinérgicos com outros químicos que induzem este sistema, significando que uma exposição a uma mistura de solventes contendo xileno poderá ter a sua toxicidade potencializada, tal qual ocorre na exposição concomitante com tolueno (inibição do metabolismo do tolueno).

Xileno (dimetilbenzeno) é um hidrocarboneto aromático incolor que existe naturalmente no petróleo, carvão e alcatrão, existindo em três formas isoméricas: orto, meta e paraxileno.²⁴⁰ É utilizado em solventes, tintas, colas, vernizes, corantes de impressão, resinas e na indústria do couro e da borracha.²³²

Também é encontrado em pequenas quantidades na gasolina e no cigarro, e utilizado em tratamentos odontológicos e em técnicas histológicas laboratoriais (sua alta solvência aumenta a absorção de parafina e a transparência tecidual), sendo os técnicos de histologia uma das populações mais expostas à alta concentração de xileno.²⁴⁰ É facilmente absorvido pelos pulmões e pela pele (absorção cutânea principalmente em estado líquido).²³² Poluição ambiental por xileno ocorre porque ele pode persistir inalterado por meses antes de ser transformado em outros compostos, contaminando água e alimentos; isto se dá geralmente através de vazamento de produtos petroquímicos de tanques subterrâneos, já que evapora facilmente ao contato com a luz solar.²⁴⁰ Contaminação por poluição aérea também ocorre (principalmente indústria petroquímica e fumaça de automóveis). Xileno é metabolizado primariamente no fígado por oxidação de um grupo metil e conjugado com glicina para formar ácido metilhipúrico, o qual é excretado na urina (e é utilizado como marcador biológico de exposição).²⁴⁰ Toxicidade hepática por xileno parece ocorrer somente com altos níveis de exposição (e é geralmente reversível); baixos níveis de exposição não afetam significativamente o fígado.²⁴¹ Estudos em animais mostram que xileno pode alterar a função hepática e aumentar o peso do fígado, porém com discretas alterações histológicas, como hipertrofia do retículo e alterações mitocondriais.²⁴² Entretanto, há que considerar o papel do xileno como componente frequente de misturas de solventes.

Benzeno tem sido utilizado em diversos cenários industriais, como indústria petroquímica, indústria química, indústria do calçado, do plástico e da borracha e em atividades envolvendo impressão; transporte, distribuição e fornecimento de gasolina também são

importantes fontes ocupacionais.²⁴³ É muito utilizado como solvente e intermediário químico (fabricação de lubrificantes, detergentes, tinturas, borracha, pesticidas...), sendo um dos 20 principais químicos produzidos nos Estados Unidos.²⁴⁴ Devido à sua toxicidade, não é geralmente utilizado no âmbito domiciliar. Como outros solventes, é poluidor ambiental (poluição aérea) Possui pouca absorção cutânea (exceto na forma líquida). É metabolizado primariamente no fígado em ácido trans, trans-mucônico, que pode servir como marcador biológico na urina, mesmo em baixas doses de exposição; como a maioria dos outros solventes, é metabolizado pelo fígado, e estresse oxidativo parece ser primordial para sua toxicidade.²⁴⁵

Existem poucos estudos relacionando exposição com benzeno e resistência insulínica, e os achados não se confirmaram em modelos animais; por outro lado, estudos em animais e seres humanos encontraram associação da exposição a benzeno com dislipidemia.²⁴⁴

Os efeitos tóxicos gerais do benzeno são similares a outros hidrocarbonetos aromáticos, exceto pela hematotoxicidade. Exposição crônica a benzeno pode causar alterações hematológicas como leucopenia, trombocitopenia, anemia, pancitopenia e anemia aplástica, linfocitose, eosinofilia e basofilia.²⁴⁶

Os efeitos carcinogênicos do benzeno são bem estabelecidos, conforme será abordado no item 2.5.2.1

Hepatotoxicidade por benzeno isoladamente tem sido pouco descrita na literatura. Alteração de função hepática tem sido relatada em séries de pacientes expostos.²⁴⁷ Estudos experimentais em ratos também demonstraram alteração da função hepática (e renal); transaminases aumentaram após aumento da concentração de benzeno.²⁴⁸

Etilbenzeno, um intermediário químico do benzeno utilizado principalmente na produção de estireno (e em menor grau como solvente), apresenta hepatotoxicidade limitada; não foram encontradas alterações na função hepática em trabalhadores com mais de 20 anos de

exposição.²⁴⁹ Estudos em animais, por sua vez, demonstraram hepatomegalia, hipertrofia do retículo endoplasmático e necrose hepática.²⁴⁹

Estireno (vinilbenzeno), produzido a partir do etilbenzeno, é utilizado principalmente como monômero na fabricação de poliestireno (fabricação de plástico e borracha).

Alguns estudos em seres humanos mostraram discreta elevação de enzimas hepáticas com estireno; em estudos com animais a hepatotoxicidade foi inversamente proporcional ao tempo de exposição, apresentando necrose hepática na fase aguda seguida de regeneração e melhora com a exposição crônica.²⁵⁰

AMIDAS N-SUBSTITUÍDAS:

Este grupo de solventes é representado essencialmente pela dimetilformamida e pela dimetilacetamida, ambas evocadas como hepatotóxicas, sendo o fígado o alvo primário de ação.

Dimetilformamida, amplamente utilizada na indústria do couro sintético e do poliuretano, pode causar estato-hepatite, fibrose, cirrose e câncer; alterações das transaminases foram mais evidentes nos primeiros 3 meses, sendo muito mais modestas após um ano de exposição.¹⁸³

Dimetilacetamida, utilizada na fabricação de fibra sintética e resina acrílica, possui baixa a moderada hepatotoxicidade (foi introduzida como uma opção menos tóxica do que a dimetilformamida); diversos estudos em animais evidenciaram alterações como esteatose, hepatomegalia, degeneração hepatocelular e necrose.²⁵¹ Hepatite tóxica tem sido descrita com dimetilacetamida.²⁵²

2.5.2.1 Solventes Orgânicos: Cirrose Hepática e Câncer

Os principais solventes orgânicos relacionados com cirrose hepática são: tetracloreto de carbono, tricloroetano, tricloroetileno, trinitrotolueno e dimetilformamida; carcinoma hepatocelular está relacionado com tetracloreto de carbono, tricloroetileno, percloroetileno, e trinitrotolueno.¹⁸³

A associação de benzeno com leucemia mielóide aguda é conhecida; ele também é suspeito de causar leucemia mielóide crônica, leucemia linfóide crônica, mieloma múltiplo e linfoma Hodgkin.²¹⁷

O tempo necessário para o desenvolvimento de neoplasias no âmbito ocupacional costuma ser longo (5-20 anos), o estímulo genotóxico (dano oxidativo, aberrações cromossômicas, mutações...) propicia ao longo do tempo redução nos mecanismos de reparo de DNA, apoptose e checkpoints efetivos, ou outras diferenças genéticas que determinem o surgimento do câncer).²⁵³

2.5.3 Diagnóstico Laboratorial

Exames laboratoriais de função hepática tem sido utilizados para o diagnóstico de exposição a solventes orgânicos. Dosagem sérica de ALT (alanina aminotransferase) parece ser o melhor marcador de toxicidade hepática por solventes. Lundquist²⁵⁴ revisou cerca de 20 artigos sobre exposição à mistura de solventes (geralmente exposição crônica em baixas concentrações) nas décadas de 80 e 90 e encontrou elevação de transaminases em aproximadamente um terço deles.²⁵⁴

ALT por ser uma enzima predominantemente hepática e puramente citosólica reflete melhor lesão hepática por solventes que AST (aspartato aminotransferase), a qual é predominantemente (80%) mitocondrial (por isto aumenta em dano alcoólico) e existe em vários outros órgãos, como cérebro, coração, rins, pulmões, músculo esquelético e pâncreas.

Exames laboratoriais como glicemia de jejum, triglicerídeos e HDL-colesterol são importantes neste estudo para o diagnóstico de síndrome metabólica, a qual, como vimos, está relacionada com DHGNA.

A tabela 1 indica os principais agentes químicos implicados na gênese de esteato-hepatite e a sua consequência sobre as transaminases.

Tabela 1 - Agentes químicos associados com esteatohepatite

ESTEATOHEPATITE/TRANSAMINASES NORMAIS	ESTEATOHEPATITE/TRANSAMINASES ALTERADAS
Cloreto de Vinila	Tetracloroeto de carbono
Tetracloroetileno	Dimetilformamida
Nitrobenzeno	Metilmercúrio
Nitrometano	Pesticidas
Solventes (ocasionalmente COVS *)	Bifenilpoliclorados
	Fósforo Amarelo
	Tricloroetano
	Arsênico
	Chumbo
	COVS * (ocasionalmente)

Fonte: Lomonaco et al.(2013)⁶²

2.5.4 Elastografia Transitória Hepática (FIBROSCAN)

O fígado fibrótico tem a elasticidade reduzida por depósito de tecido fibroso no parênquima hepático. FibroScan fornece uma medida de rigidez hepática utilizando pulsos ecográficos, e tem sido superior a outros escores não invasivos simples na detecção de fibrose.²⁵⁵ O exame utiliza o escore METAVIR, fibrose sendo classificada em uma escala F0-F4: F0 ausência de fibrose, F1 fibrose portal sem septos, F2 poucos septos, F3 muitos septos sem cirrose, F4 cirrose.

Embora ecografia seja o método de escolha no diagnóstico de esteatose hepática, pela sua acurácia e fácil aplicabilidade, não permite diferenciar esteatose de esteato-hepatite não alcoólica, e não é capaz de identificar fibrose.

Biópsia hepática, considerada o padrão-ouro para o diagnóstico de esteato-hepatite, é um exame invasivo que apresenta morbidade relacionada ao procedimento e possibilidade de erro de amostragem.²⁵⁶

A sensibilidade da FibroScan na detecção de fibrose significativa (METAVIR $F \geq 2$) em pacientes com DHGNA variou de 65,2%-90%, enquanto a especificidade variou de 45%-88,7%.²⁵⁷

A associação de Síndrome Metabólica com DHGNA e desta última com hepatotoxicidade, suscita o questionamento sobre que consequências a agressão tóxica ao fígado teria sobre o metabolismo e da possível inter-relação entre hepatotoxicidade e Síndrome Metabólica.

3 JUSTIFICATIVA

Um percentual significativo de trabalhadores da indústria são expostos diariamente à substâncias químicas com potencial de hepatotoxicidade, havendo poucos estudos em humanos sobre as consequências desta exposição prolongada. O conhecimento da fisiopatologia da TAFLD/TASH e os efeitos da exposição química a solventes orgânicos sobre o metabolismo são pobremente conhecidos. Estresse oxidativo tem sido apontado como um dos principais *hits* na evolução da esteatose hepática para esteato-hepatite não alcoólica.

Síndrome Metabólica acomete aproximadamente 1/4 da população mundial e os solventes orgânicos podem estar implicados na sua etiopatogenia, levando à fibrose, cirrose e/ou carcinoma hepatocelular

4 QUESTÃO DE PESQUISA

Trabalhadores expostos a solventes por período maior ou igual a 5 anos estão mais predispostos a apresentar Síndrome Metabólica e hepatotoxicidade?

5 HIPÓTESE

Exposição crônica a solventes orgânicos está associada com Síndrome Metabólica e hepatotoxicidade.

6 OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a existência de Síndrome Metabólica e hepatotoxicidade em uma população exposta a diferentes solventes.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

6.2.1 Estabelecer a frequência de síndrome metabólica em 2 populações (uma exposta e outra não exposta a solventes).

6.2.2 Analisar lesão hepatocelular através da dosagem sérica de alanina aminotransferase (ALT).

6.2.3 Analisar estresse oxidativo através das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) e da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e glutathione S-transferase (GST) nas duas populações.

6.2.4 Avaliar o grau de fibrose através da realização de elastografia transitória hepática (FibroScan) nas duas populações.

7 POPULAÇÃO E MÉTODOS

7.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo transversal

7.2 CALCULO DE TAMANHO DE AMOSTRA

Assumindo uma diferença de médias de 5 unidades de ALT entre expostos vs controles, com um desvio padrão comum de 6,5 ($d=0,77$) (Moro, 2017), foi estimado que um tamanho de amostra de 54 indivíduos (27 por grupo) teria um poder estatístico de 80% em um nível de significância de 5%.²⁴³

7.3 POPULAÇÃO EM ESTUDO

Critérios de inclusão: foram selecionados 30 trabalhadores expostos a solventes orgânicos há pelo menos 5 anos em indústrias de Porto Alegre e região metropolitana (município de Gravataí), no estado do Rio Grande do Sul, sul do Brasil. No grupo controle foram selecionados 40 trabalhadores da área administrativa de empresas sem exposição a risco químico. Foi considerado risco químico exposição frequente a solventes orgânicos durante a jornada de trabalho.

Dos 30 trabalhadores expostos, 10 trabalhavam como chapeadores, 7 em uma indústria de fabricação de tintas, 6 como pintores, 4 como estofadores, 1 como auxiliar de odontologia, 1 como jardineiro (manipulação frequente de combustível), e um em atividades de manutenção;

23 afirmaram não utilizar EPI (equipamento de proteção individual), enquanto somente 7 registraram uso com regularidade.

Este estudo foi realizado em trabalhadores altamente expostos a solventes por pelo menos 5 anos (média de 13 anos), predominantemente hidrocarbonetos aromáticos como tolueno, tanto isoladamente como sob a forma de mistura de solventes, neste caso geralmente associados com xileno. Tolueno foi utilizado como solvente de tintas, tiner e/ou cola.

Critérios de exclusão: idade <18 anos ou >65 anos, sexo feminino, hepatite B e C (excluídas por sorologias), hemocromatose, doença hepática conhecida, uso de álcool, drogas ou medicações hepatotóxicas, tabagismo, índice de massa corporal (IMC) >30.

7.4 ANÁLISE CLÍNICO-LABORATORIAL

Os trabalhadores foram inicialmente sensibilizados a participar deste estudo. Todos assinaram TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido).

Foi realizada anamnese em todos os pacientes, com coleta de informações sobre tipo de exposição, tempo de exposição, uso de álcool, drogas ou medicações hepatotóxicas, doença hepática conhecida ou comorbidades, tabagismo e atividade física.

Mensuração de peso foi realizada através de balança antropométrica calibrada, com o paciente descalço em ortostatismo (medida em kg). A altura foi medida através de estadiômetro acoplado na balança, com o paciente ereto e descalço, olhando para o horizonte (graduação em cm).

Pressão arterial foi medida com esfigmomanômetro de mercúrio calibrado (medida em mm de Hg).

Circunferência abdominal foi aferida com fita inextensível, na linha média entre o rebordo inferior da última costela e a crista ilíaca, considerando como ponto de corte >102cm, conforme NCEP/PAM III para homens.

Índice de massa corporal (IMC) foi calculado como peso/altura ao quadrado (kg/m²). Classificação de síndrome metabólica foi realizada conforme os critérios estabelecidos pela NCEP/PAM 3.

Foram realizadas coletas de sangue periférico para análise de ALT (U/L), com valores de referência que variaram 30-45 dependendo do laboratório e metodologia empregada (até 30,0 UI/L pelo método enzimático e até 45 U/L pelo método cinético UV automatizado).

Colesterol HDL no soro foi analisado pelo método homogêneo direto automatizado, com valores de referência desejáveis: superior a 40mg/dl.

Glicemia de jejum foi analisada no soro pelo método enzimático, com valores de referência em jejum: 65-99 mg/dl. Triglicerídeos foram analisados no soro pelo método enzimático automatizado, com valores de referência desejáveis em jejum: inferior a 150mg/dl.

Preparação do sangue para avaliação de estresse oxidativo

O sangue periférico foi coletado de veia do membro superior e colocado (4ml) em tubo de hematologia com EDTA. Foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos. Em seguida foi separado o plasma e congelado a -70 graus C para análises posteriores. Foram realizadas três lavagens com solução fisiológica em volumes iguais utilizando o pellet de glóbulos vermelhos, centrifugando em cada etapa da lavagem a 3000 rpm por 5 min e descartando o sobrenadante. Os glóbulos lavados foram diluídos em sulfato de magnésio e solução de ácido acético e em seguida congelados para análises enzimáticas.

Quantificação de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976), em placa de 96 poços, tendo como base o azul brilhante de Comassie (o qual se une aos resíduos lisina de proteínas), utilizando uma solução de 0,5 mg/ml de albumina sérica bovina.²⁵⁸ Posteriormente, a solução azulada é conduzida ao leitor de placa a 595 nm. O cálculo utiliza um fator de correção médio obtido a partir da curva de calibração.

Avaliação da Lipoperoxidação

A lipoperoxidação no fígado gera aldeídos que são quantificados pela reação das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), através do surgimento de um produto corado (malondialdeído e outros produtos da lipoperoxidação).

As amostras foram colocadas em tubos de ensaio contendo uma mistura de ácido tiobarbitúrico 0,67% com ácido tricloroacético 10%; posteriormente foram aquecidas em banho durante 15min e resfriadas em gelo durante 5 minutos. Após o resfriamento das amostras, foi colocado álcool n-butílico para extrair o pigmento formado, e foram colocadas em agitador por 45 segundos e centrifugadas por 10 minutos a 3000 rpm. Por último, o produto corado foi lido em espectrofotômetro com comprimento de onda de 535nm. A concentração de TBARS foi expressa em nmol/mg de proteínas (Yagi,1984).²⁵⁹

Avaliação das Enzimas Antioxidantes:

Atividade da SOD

Para avaliação da atividade das enzimas antioxidantes, as amostras foram descongeladas e centrifugadas a 1200 rpm durante trinta segundos, e foi utilizado o sobrenadante. A análise da atividade de SOD (superóxido dismutase) nos eritrócitos foi baseada na capacidade da SOD em inibir a reação do radical superóxido com adrenalina, segundo o método de Misra e

Fridovich (1972).²⁶⁰ Na placa de 96 poços colocou-se, além da amostra, adrenalina e tampão de glicina 50 mM, com pH 11, para posterior agitação e leitura a 480 nm. Os resultados foram expressos em USOD/mg de prot.

Atividade da GST

A atividade da GST (glutathione S-transferase) é baseada na reação da enzima, que catalisa a formação de 1 μ M de 2,4 dinitro-fenil-glutathione (DNP-SG) por minuto a 30 graus C, utilizando 1 mM de concentração da GSH e CDNB (cloro-dinitro-benzeno), detectada por espectrofotometria a 340nm. Os valores foram expressos em μ M/min/mg de proteína, conforme Mannervik e Gluthenberg.²⁶¹

7.5 ELASTOGRAFIA TRANSITÓRIA HEPÁTICA (FIBROSCAN)

FibroScan foi realizada após 3 hs de jejum com o paciente deitado em decúbito dorsal, com o braço direito abduzido e posicionado atrás da cabeça.

O aparelho utilizado é composto de sonda M, um sistema eletrônico e uma unidade de controle (um transdutor de ecografia é montado no eixo de um vibrador). Vibrações de leve amplitude e baixa frequência (50Hz) foram transmitidas do vibrador para os tecidos pela sonda do transdutor (similar à utilizada na ecografia), aplicada com leve pressão sobre a pele do abdome na altura do lobo direito do fígado, no espaço intercostal. Ao mesmo tempo pulsos ecográficos foram emitidos para seguir a propagação da onda e medir sua velocidade, que se relaciona diretamente com o grau de rigidez do parênquima hepático. Foram obtidas 10 medidas consecutivas realizadas no mesmo lugar e o resultado foi expresso em kPa (kilopascals). A mediana das aquisições de sucesso foi considerada representante do grau de rigidez. Valores de rigidez <5,3 kPa foram considerados normais (F0), sendo 5,3-7,5-9,5 e 12,5 os respectivos

pontos de corte para F1-F2-F3-F4. A validade das medidas resultantes dependeu do IQR (*interquartile range*), o qual reflete a variabilidade das medidas e não deve exceder 30% para que o exame seja válido.

Análise estatística

As variáveis quantitativas apresentaram distribuição não paramétrica e foram descritas pela mediana (intervalo inter quartil) e comparadas pelo teste U de Mann-Withney. As variáveis categóricas foram descritas por porcentagens e comparadas pelo teste do Qui-quadrado da razão de verossimilhança.

O nível de significância estatística adotado foi $p < 0.05$.

Na análise dos dados, foi utilizado o software SPSS, versão 21.0.

Aspectos éticos

A pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre com o CAAE:01297512.5.0000.5327.

8 RESULTADOS

A tabela 2 aponta as principais características da população em estudo, enquanto a tabela 3 sumariza os principais achados de Síndrome Metabólica e seus componentes entre os grupos comparativamente. As figuras 10 e 11 indicam a porcentagem de elevação de ALT entre expostos e não expostos e a influência do tempo de exposição sobre a elevação de ALT.

Os valores de HDL e ALT alterados foram ajustados, respectivamente, conforme idade/atividade física frequente e IMC (tabela 4).

Tabela 2 – Características dos pacientes

Característica	Expostos n = 30	Não- expostos n = 40	p
Idade, anos	36,3±8,7	42,1±13,8	0,039
Índice de massa corporal, kg/m ²	24,8±2,5	23,7±2,3	0,066
Tempo de exposição, anos	10,1±5,6	–	–
Atividade física frequente, n° (%)*	7/30 (23,3)	11/38 (28,9)	0,601
Uso de EPI, n° (%)**	7 (23,3)	–	–

Os dados são apresentados como média±desvio padrão ou contagens (percentuais).

*Atividade física frequente considerada= 3 ou mais x por semana (pelo menos 150 min/semana).

**EPI equipamento de proteção individual.

Tabela 3 - Tabela comparativa da síndrome metabólica e os seus componentes entre os grupos

	Expostos n=30	Não expostos n=40	P
Síndrome metabólica	10,0%	5,0%	0,424
Pressão arterial média (≥130/85 mm Hg)	40,0%	45,0%	0,675
Circunferência abdominal (>102 cm)	3,3%	5,0%	0,730
Glicemia de jejum (≥100 mg/dL)	13,3%	20,0%	0,459
HDL (<40 mg/dL)	26,7%	7,5%	0,029
TGC (≥150 mg/dL)	20,0%	17,5%	0,791

*Variáveis quantitativas descritas pela mediana (intervalo interquartil) e comparadas pelo teste de Mann Whitney. Variáveis categóricas descritas por % e comparados pelo teste de Qui-quadrado de razão de verossimilhança

Figura 10 - Porcentagem de elevação de ALT em expostos e não expostos

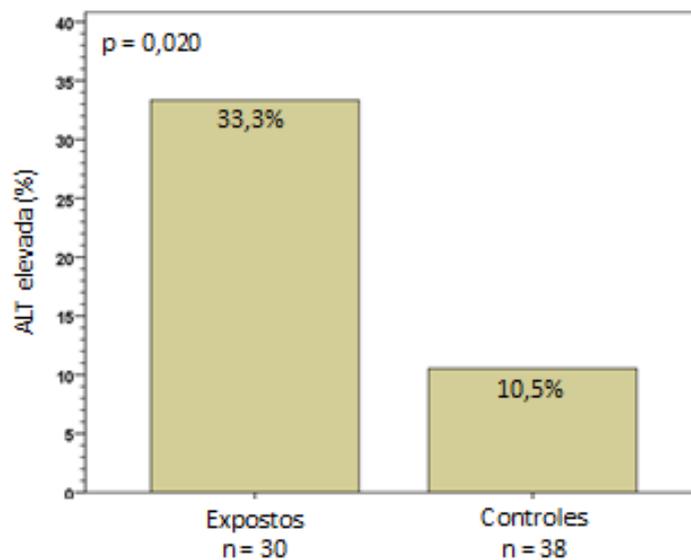


Figura 11 – Tempo de Exposição

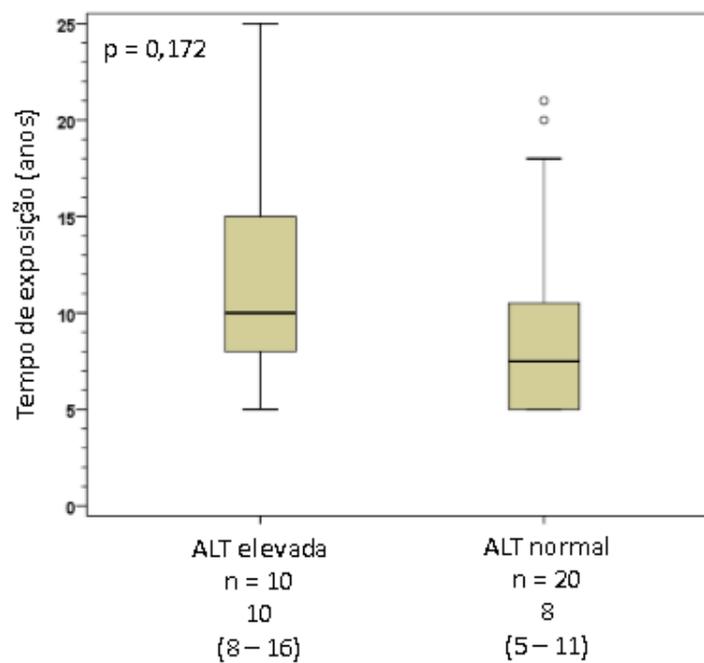


Tabela 4 – Comparação de HDL e ALT entre os pacientes

	Expostos n = 30	Não- expostos n = 40	p
HDL < 40mg/dL, n° (%)	8 (26,7)	3 (7,5)	0,039 ^a
ALT, valor/referência	0,90±0,44	0,71±0,21	0,043 ^b

(a) ajustado para idade e atividade física frequente; (b) ajustado por índice de massa corporal.

As figuras 12, 13 e 14 a seguir demonstram os resultados da lipoperoxidação (TBARS) e atividade enzimática (SOD e GST) entre os grupos.

Figura 12 - Avaliação de TBARS em expostos e não expostos

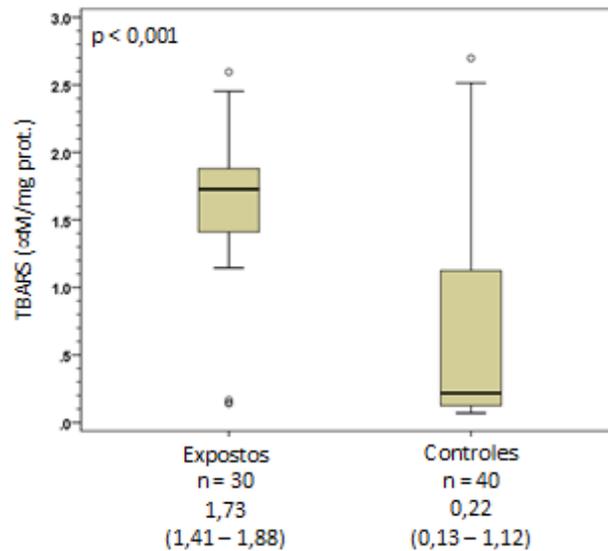


Figura 13 - Comparação da atividade de SOD em expostos e não expostos

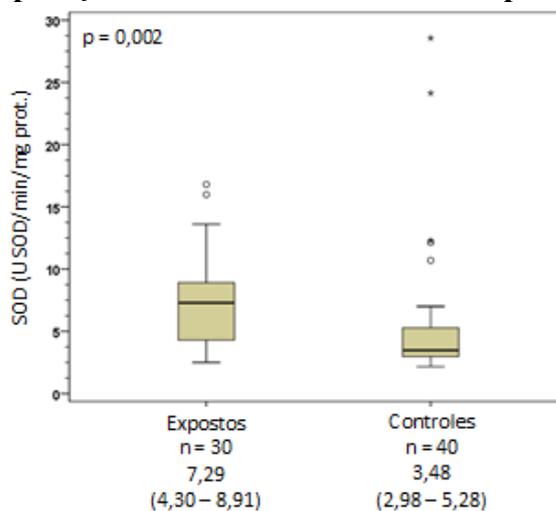
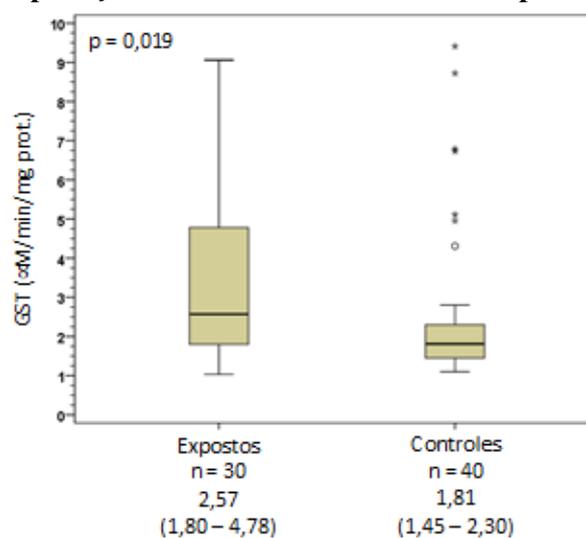


Figura 14 - Comparação da atividade de GST em expostos e não expostos



Fibroscan foi realizada em 15 trabalhadores expostos e 15 trabalhadores não expostos, com os mesmos resultados nos dois grupos: 11 trabalhadores apresentaram F:0 e 4 trabalhadores apresentaram F:1.

9 DISCUSSÃO

Este estudo evidenciou alterações metabólicas (HDL-colesterol <40 mg/dl), assim como maiores níveis séricos de ALT e de marcadores de estresse oxidativo no sangue (TBARS, atividade de SOD e atividade de GST) no grupo exposto em relação ao grupo controle. Estes resultados foram significativos ($p < 0,05$) mesmo após ajustes de idade, atividade física e IMC.

Há evidências na literatura sugerindo que significativas alterações metabólicas podem ocorrer como consequência da influência dos solventes sobre o fígado. Kaukiainen et al. (2004), estudando a influência dos solventes sobre o metabolismo de 29 trabalhadores expostos, encontrou correlação positiva de colesterol e triglicerídeos séricos com exposição a solventes.²⁶² Estudos experimentais de Vaghasia et al. (2015), também indicaram aumento no colesterol hepático secundário à exposição a solventes e proporcional à dose de exposição.²⁶³

Mais recentemente, em um grande estudo multicêntrico, exposição a solventes foi associada com 32% mais de prevalência de hipertensão arterial em relação aos controles.²⁶⁴

Um estudo de Kim et al. (2012), corroborado por outro realizado por Panke et al. (2017), evidenciou associação positiva de exposição química com hipertrigliceridemia.^{265,266} No presente estudo, embora não haja maior porcentagem de síndrome metabólica no grupo exposto, houve um número significativo de expostos com HDL-colesterol <40 em relação aos controles ($p < 0,05$). Estes achados são relevantes porque a principal causa de morte na síndrome metabólica é doença cardiovascular e não surpreendem em razão destes tóxicos influenciarem receptores ligados com o citocromo P450, o qual está envolvido no metabolismo do colesterol e detoxificação de lipídios.

Avaliar a hepatotoxicidade decorrente da ação de solventes (mais especificamente tolueno e xileno) também foi um dos objetivos deste estudo. Os relatos de esteato-hepatite tóxica no ambiente de trabalho tem despertado um interesse crescente pela compreensão da

patogênese e evolução da doença. De fato, TASH (toxicant-associated steatohepatitis/esteato-hepatite associada à tóxicos), juntamente com ASH (*alcoholic steatohepatitis/esteato-hepatite alcoólica*) e EHNA (*esteato-hepatite não alcoólica*) é uma das três formas mais prevalentes de esteato-hepatite, ainda com poucos estudos realizados.

A ascensão do desenvolvimento moderno, urbano e industrial, não teve o seu impacto sobre a saúde da população devidamente avaliado. Estudos com produtos petroquímicos como cloreto de vinila, alertaram para a possibilidade de dano hepático grave de evolução subclínica, mesmo com provas hepáticas normais.

ALT (alanina aminotransferase) tem demonstrado ser um importante marcador de injúria hepática, ao contrário da GGT (gama glutamil transferase), que parece estar mais relacionada com mecanismo de indução e pode estar elevada por dano em outros órgãos além do fígado. Transaminases séricas refletem injúria hepática relacionada com necrose, enquanto ALP (fosfatase alcalina) e GGT estão associadas com colestase hepática.²⁶² Solventes podem danificar hepatócitos e ALT tem demonstrado ser um bom biomarcador de dano antes deste ser irreversível.

A presença de maiores níveis séricos de ALT foi significativa neste estudo no grupo exposto ($p:0.020$) e esteve de acordo com outros estudos similares. O tempo de exposição não exerceu influência significativa sobre o resultado da ALT ($p>0,05$).

Tomei et al. (1999) observou, pesquisando 33 sapateiros, alteração de função hepática em 44% dos trabalhadores mesmo com níveis baixos de exposição à mistura de solventes.²⁶⁷

Carvalho et al. (2006), investigando trabalhadores de uma refinaria de petróleo brasileira, encontrou como alterações laboratoriais mais frequentes elevação simultânea de transaminases e GGT, que ocorreu em 41,4 % dos expostos, mesmo quando os efeitos de álcool, obesidade e hepatite foram considerados.²⁶⁸

Perez et al. (2006), em uma empresa petroquímica em que houve exposição a uma mistura de tolueno, xileno e benzeno, descreveu como principal achado laboratorial alteração de transaminases (29,4%); destes, 51,9% apresentaram esteatose hepática em exames de ecografia.²³⁷

Rees et al. (1993), investigando injúria hepática em trabalhadores de uma planta de produção industrial de tintas envolvendo mistura de solventes, identificou que 65% tinham pelo menos um enzima hepática alterada; AST (aspartato aminotransferase) estava elevada em 52% e atividade de GGT foi elevada em 46%.²⁶⁹

Por outro lado, outros estudos não demonstraram associação significativa ($p > 0,05$) de exposição a solventes com alteração de transaminases.

Ukai et al. (1994) relatou ausência de alteração de função hepática em trabalhadores expostos a baixas doses de solventes, com predomínio de tolueno.²⁷⁰ Chen et al. (1991) também não detectou alterações nas transaminases em trabalhadores da produção industrial de tintas em que predominaram como solventes tolueno e xileno.²⁷¹

Lundberg et al. (1994) estudou o efeito a longo prazo da exposição à tinta em pintores, mas com pouca ou nenhuma exposição atual (exposição no passado), sem aumento significativo de transaminases e GGT.²⁷²

A maioria destes estudo com transaminases normais, entretanto, ocorreu com baixas doses de exposição, geralmente obedecendo os limites de tolerância à exposição preconizados.²⁷³

Estresse oxidativo, por sua vez, é o mecanismo de toxicidade mais importante dos solventes, através da geração de radicais livres, EROS (espécies reativas de oxigênio) e ERNS (espécies reativas de nitrogênio).¹⁹⁰

Como radicais livres possuem meia-vida curta que dificulta sua identificação, costuma-se analisar estresse oxidativo indiretamente através dos do seu efeito sobre as membranas

lipídicas (lipoperoxidação); TBARS (substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico) tem sido utilizado com este propósito.

A análise da atividade de enzimas antioxidantes no sangue, por outro lado, permite analisar os mecanismos de defesa antioxidante lançados pelo organismo sob agressão. Estes testes, combinados com dosagem de ALT, possibilitam uma inferência não invasiva da agressão hepatotóxica por solventes. Estas coletas ocorreram durante a jornada de trabalho, para maior eficácia de resultados.

Neste estudo, o grupo exposto apresentou maiores níveis de TBARS no plasma (7,8 vezes mais que os controles), com significância estatística ($p < 0,01$), indicando lipoperoxidação de grande magnitude. A atividade de SOD e GST também estava aumentada (sendo esta última uma importante enzima detoxificadora), e alcançou significância estatística ($p < 0,05$), indicando uma resposta de indução enzimática compensatória provável em consequência da agressão hepática.

Halifeoglu et al. (2000), em concordância com nosso estudo, encontrou aumento nos níveis de TBARS, SOD e GPx (glutathione peroxidase), evidenciando estresse oxidativo em um grupo de 18 pintores expostos a tiner (misturas de solventes em que predomina o tolueno).²⁷⁴

Também de forma similar ao nosso estudo, Moro et al. (2012) demonstrou significativo aumento de TBARS no sangue de pintores, linkando o dano às membranas biológicas ao possível efeito tóxico decorrente da biotransformação do tolueno em metabólitos tóxicos.²³⁴

Exposição a tolueno, tem demonstrado, *in vivo* e *in vitro*, ser capaz de causar estresse oxidativo.²⁷⁵

Não houve fibrose significativa, através do exame de FibroScan, nos pacientes expostos deste estudo. Infelizmente, nem todos os pacientes expostos realizaram o procedimento em função de impedimento imposto por uma das indústrias elencadas.

Mesmo na ausência de fibrose, deve haver prudência em classificar solventes como o tolueno como de baixo risco, especialmente se houver exposição alta e continuada a mistura de solventes, em função de efeito aditivo. Há que se considerar também a suscetibilidade individual e as particularidades do metabolismo de tóxicos de cada indivíduo através do citocromo P 450, a qual pode ser muito influenciada por fatores genéticos e ambientais.

Concluimos que este estudo teve como primeira limitação o delineamento transversal e a impossibilidade de determinar com exatidão relação causa-efeito. Doenças crônicas, que podem interferir com o estresse oxidativo, existiram mas foram poucas (5 pacientes expostos apresentaram doenças como hipertensão arterial, diabetes mellitus e dislipidemia). Conflito econômico com empresas participantes também foi um fator limitador.

Os achados deste estudo convergem para o entendimento de que a toxicidade hepática por solventes possui repercussão multissistêmica, especialmente no que concerne ao metabolismo.

Além disto, ainda quando afastados fatores de confusão como etilismo e obesidade, solventes aromáticos mostraram ser capazes de causar hepatotoxicidade, com consequências que ainda não são completamente conhecidas.

10 CONCLUSÃO

Não foi encontrado um percentual maior de síndrome metabólica no grupo exposto, mas quando analisamos cada um dos componentes da síndrome individualmente, detectamos um número significativo ($p < 0,05$) de HDL < 40 entre os expostos.

Podemos inferir que houve dano hepático evidenciado por elevação de ALT e de marcadores de estresse oxidativo nos pacientes expostos a solventes orgânicos, ainda que sem fibrose significativa.

11 ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS

ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS

**EXPOSURE TO ORGANIC SOLVENTS AND
HEPATOTOXICITY**

Artigo científico submetido à Archives of Toxicology, Qualis A1.

De: em.atox.0.61e4e6.172f3009@editorialmanager.com
<em.atox.0.61e4e6.172f3009@editorialmanager.com> em nome de
Editorial Office Arch Tox <em@editorialmanager.com>
Enviado: quinta-feira, 14 de março de 2019 18:00
Para: Cristiano Brauner

Assunto: ATOX-D-19-00226 : Submission Confirmation for Exposure to
organic solvents and hepatotoxicity (in vivo)

Dear Dr. Brauner,

Your submission entitled "Exposure to organic solvents and
hepatotoxicity (in vivo)" has been received by Archives of Toxicology

The submission id is: ATOX-D-19-00226
Please refer to this number in any future correspondence.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to
Editorial Manager as an author. The URL
is <https://www.editorialmanager.com/atox/>.

Exposure to organic solvents and hepatotoxicity

Cristiano Brauner ^{1*}, Mário Reis Álvares-da-Silva ^{1,2}, Norma Marroni ³,
Silvia Bona ¹, Elizângela Schemitt ¹, Raissa Nardi ¹, Dvora Joveleviths ^{1,2}

¹ Programa de Pós Graduação em Gastroenterologia e Hepatologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

² Divisão de Gastroenterologia e Hepatologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Porto Alegre, RS, Brasil.

³ Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas-Medicina e Fisiologia- Universidade Federal do Rio Grande do Sul Porto Alegre, RS, Brasil.

* Corresponding author: Cristiano Osorio Brauner. Rua Ramiro Barcelos, 2350-Santa Cecília, Porto Alegre, RS, Brasil, CEP: 90035-903. Phone: (+ 55 51) 3359-8307.

Email: cristianobrauner@hotmail.com

Abstract:

Objectives: The purpose of this study was to identify the long term effect of chemical exposure on the liver, through clinical and laboratory tests and oxidative stress tests.

Population and Methods: cross-sectional study comprising 70 workers, 30 of them exposed to organic solvents and 40 not exposed. The history and physical examination was performed for all patients. Laboratory tests included ALT dosage and oxidative stress tests, such as substances that react with the thiobarbituric acid (TBARS) in plasma and superoxide dismutase (SOD) and glutathione S-transferase (GST) analysis in the erythrocytes. All those exposed presented at least 5 years of exposure to solvents. Hepatitis B and C, known hepatic disease, comorbidities, use of alcohol, drugs or hepatotoxic medications, smoking, body mass index (BM) >30, female sex and age <18 years or >65 years were excluded from the sample.

Results: elevated ALT was more frequent in the group exposed compared to the controls: 33% v 10.5%, with a statistical significance ($p < 0.05$). TBARS was significantly elevated ($p < 0.01$) in the group exposed compared to the controls: 1.73 nmol/mg of prot. (1.41-1.88) v 0.22 nmol/mg of prot. (0.13-1.12). Antioxidant enzymes were also significantly more elevated ($p < 0.05$) in the group exposed compared to the controls: SOD 7.29 (4.30-8.91) USOD/mg of prot. v 3.48 (2.98-5.28) USOD/mg of prot. and GST 2.57 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of prot. (1.80-4.78) v 1.81 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of prot. (1.45- 2.30) $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ of prot.

Conclusion: The results suggest an association between exposure to organic solvents and hepatotoxicity.

Key words: Solvents; aromatic hydrocarbons; chemical exposure, hepatotoxicity, TASH.

Introduction

Organic solvents such as aromatic hydrocarbons are widely applied in the industry for activities such as manufacturing paints, glues, resins, varnishes, dyes, adhesives, shoes, plastics, rubber, synthetic fibers, pesticides, cosmetics, degreasers, polyurethane foam, and others. ^{1,2,3,4,5} They are also much used as chemical intermediaries in printing activities and gasoline manufacturing. ⁶

Solvents are involved in the rise of TAFLD (toxicant-associated fatty liver disease), TASH (toxicant-associated steatohepatitis), cirrhosis of the liver and cancer (mainly hepatocellular carcinoma and acute myeloid leukemia/exposure to benzene.). ^{7,8,9,10,11,12}

It is estimated that 8% of the workers in industry have contact with solvents during their work; the highest levels of exposure to solvents are found in professions such as industrial painting, dry cleaning, rotogravure and canvas printing, laying tiles and manufacturing glass-reinforced plastic. ¹³

Absorption usually occurs by inhalation, but in certain situations rapid absorption may occur through the skin (such as exposure to solvent in liquid form or in work involving industrial painting or degreasing).

Although aromatic hydrocarbons are considered less toxic than halogenates (usually chlorinated compounds), frequent use in the form of solvent mixtures such as thinner (in which toluene predominates) need to be better evaluated, especially over the long term and with intense exposure. Solvent mixtures may potentiate the individual effect of each toxic component, as occurs in the association of toluene with xylene (xylene inhibits the toluene metabolism, increasing its toxicity). ¹⁴

The analysis of oxidative stress has been used as a non-invasive form of hepatotoxicity evaluation. The purpose of this study was to evaluate the impact of organic solvent use on the liver.

Population and Methods

Study design

Cross sectional study

Population studied

Inclusion criteria: 30 workers exposed to organic solvents for at least 5 years in industries in the Porto Alegre and Metropolitan region in the south of Brazil were selected. In the control group 40 workers in the administrative sections of companies were selected who were not exposed to the risk of chemicals. Chemical risk was considered frequent exposure to organic solvents during the work day, with a predominance of toluene and xylene.

Exclusion criteria: age <18 years or >65 years, female sex, hepatitis B and C (excluded by serologies), hematochromatosis, known liver disease, use of alcohol, drugs or hepatotoxic mediations, smoking, body mass index (BMI) >30.

This study was performed with workers highly exposed to solvents for at least 5 years (mean 13 years), predominantly aromatic hydrocarbons such as toluene, both alone and in the form of a solvent mixture, in this case generally associated with xylene. Toluene was used as a solvent for paints, thinner and /or glue.

Among the 30 workers exposed, 10 worked as metal platers, 7 in a paint factory, 6 as painters, 4 as upholsterers, 1 as a dental assistant, 1 as a gardener (frequent manipulation of fuel), and one on maintenance activities; 23 said that they did not use Individual protection equipment (IPE), while only 7 mentioned regular use.

Clinical and Laboratory Analysis

The workers were initially made aware of the importance of participating in this study. They all signed the Free Prior Informed Consent (FPIC)

A history was taken of all patients, collecting information about the type of exposure, time of exposure, use of alcohol, drugs or hepatotoxic medications, known liver disease, or comorbidities, smoking and physical activity. Weight and height were measured because BMI was considered an exclusion criterion, since obesity is a frequent cause of NAFLD and alteration of the liver function

Weight was measured using the calibrated anthropometric scale with the patient barefoot and in an orthostatic position (measured in kg).

Height was measured by a stadiometer attached to the scale with the patient erect and barefoot looking at the horizon (graduated in cm).

Blood pressure (arterial pressure) was measured with a calibrated mercury sphygmomanometer (measure in mm of Hg).

Body Mass Index (BMI) was calculated as weight/height squared (kg/m²).

Peripheral blood was collected to analyze ALT (U/L) using the enzymatic method.

Preparation of blood to evaluate oxidative stress

The peripheral blood was collected from a vein in the upper limb and placed (4ml) in a hematology tube with EDTA. It was centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes. Then the plasma was separated and frozen at -70 degrees C for later analysis. Three washings were performed with saline solution in equal volumes using the pellet of red blood cells, centrifuging at each stage of washing at 3000 rpm for 5 min and discarding the supernatant. The washed red cells were diluted in magnesium sulphate and acetic acid solution and then frozen for enzymatic analyses.

Quantification of proteins

Protein concentration was determined by the Bradford method (1976), in a plate with 96 wells, on a base of Coomassie Brilliant Blue (which is united to the lysine residues of proteins), using a 0.5 mg/ml solution of bovine serum albumin.¹⁵ Later the bluish solution is taken to the plate reader at 595nm, The calculation uses a mean correction factor obtained from the calibration curve.

Lipoperoxidation

Lipoperoxidation in the liver generates aldehydes that are quantified by the reaction of the substances that react with the thiobarbituric acid through the appearance of a stained product (malonaldehyde and other products of lipoperoxidation).

The samples were placed in test tubes containing a mixture of thiobarbituric acid 0.67% with trichloroacetic acid 10%; later they were warmed in a bath for 15 min and cooled in ice for 5 minutes. After the samples were cooled n-butyl alcohol was placed to extract the pigment

formed, and they were placed in an agitator for 45 seconds and centrifuged for 10 minutes at 3000 rpm. Finally, the stained product was read in a spectrophotometer with a wavelength of 535nm. The TBARS concentration was expressed in nmol/mg of proteins (Yagi, 1984)¹⁶.

SOD activity

In order to evaluate the activity of the antioxidant enzymes, the samples were defrosted and centrifuged at 1200 rpm for thirty seconds, and the supernatant was used. The analysis of SOD (superoxide dismutase) activity in the erythrocytes was based on the capacity of SOD to inhibit the reaction of the superoxide radical with adrenaline, according to the method of Misra & Fridovich (1972).¹⁷ In the 96-well plate, besides the sample, adrenaline and glycine buffer 50mM were placed with pH 11 for later agitation and reading at 480 nm. The results were expressed in USOD/mg of prot.

GST analysis

The activity of GST (glutathione S-transferase) is based on the reaction of the enzyme which catalyzes the formation of 1 μ M of 2,4 dinitrophenyl-glutathione (DNP-SG) per minute at 30 degrees C, utilizing 1 mM of concentration of GSH and CDNB (chloro-dinitrobenzene), detected by spectrophotometry at 340 nm. The values were expressed in μ M/min/mg of protein, according to Mannervik & Gluthenberg (1981).¹⁸

Statistical analysis

The quantitative variables presented a non-parametric distribution and were described by the median (inter-quartile interval) and compared by the Mann Whitney U test.

The level of statistical significance adopted was $p < 0.05$.

For the data analysis, software SPSS , version 21.0 was used.

Ethical aspects:

The research was approved by the ethics committee of Hospital de Clinicas de Porto Alegre under number CAAE:01297512.5.0000.5327.

Results

Table 1 points out the main characteristics of the population that is being studied, while figure 1 and 2 indicate the percentage of the elevation of ALT among the exposed and non-exposed and the influence of time of exposure on the elevation of ALT.

Table 1: Characteristics of the patients

Characteristic	Exposed n = 30	Non- exposed n = 40	p
Age, years	36.3±8.7	42.1±13.8	0.039
Body mass index, kg/m ²	24.8±2.5	23.7±2.3	0.066
Time of exposure, years	10.1±5.6	-	-
Frequent physical activity, n ^o (%)*	7/30 (23.3)	11/38 (28.9)	0.601
Use of IPE, n ^o (%)**	7 (23.3)	-	-

The data are presented as mean±standar deviation or counts (percentages).

*Frequent physical activity considered = 3 or more x a week (at least 150 min/week)

**IPE individual protection equipment.

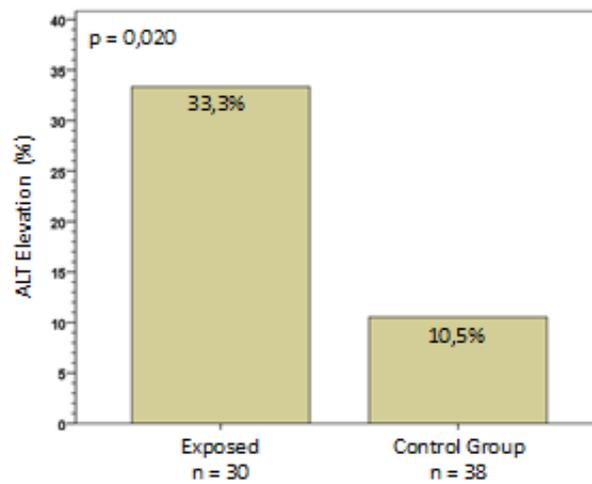


Figure 1: Percentage of ALT elevation in exposed and non-exposed patients

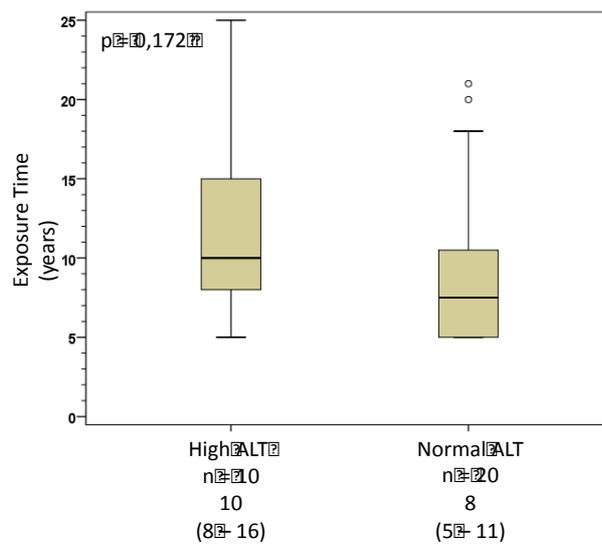


Figure 2: Relationship ALT/Exposure time

Figures 3, 4 and 5 and following show the results of lipoperoxidation (TBARS) and enzymatic activity (SOD and GST) among the groups.

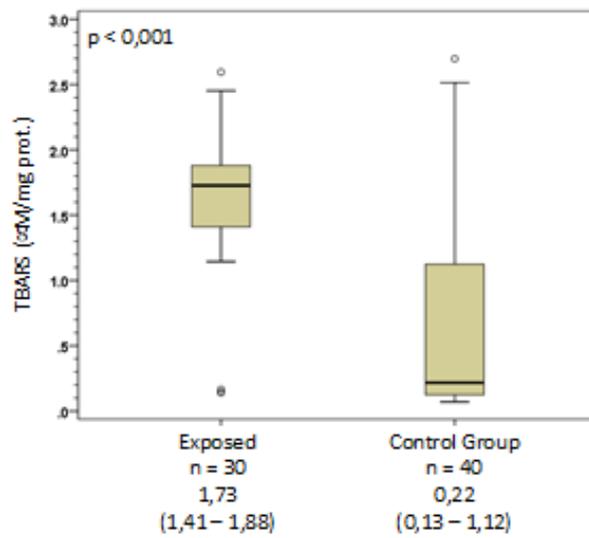


Figure 3: Evaluation of TBARS in exposed and non-exposed patients

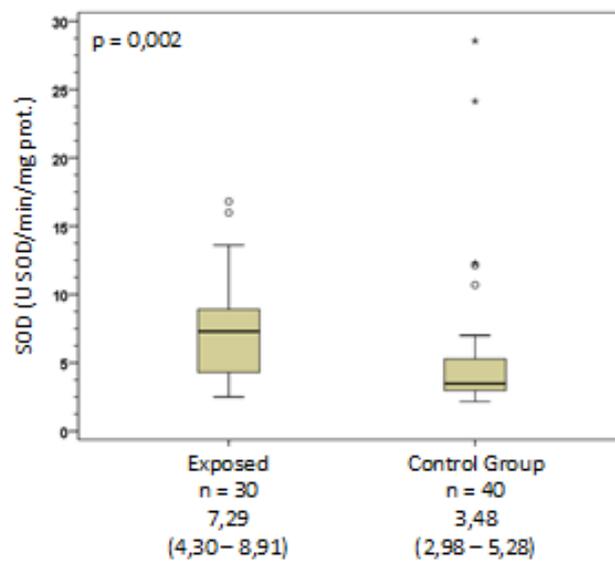


Figure 4: Comparison of SOD activity in exposed and non-exposed patients

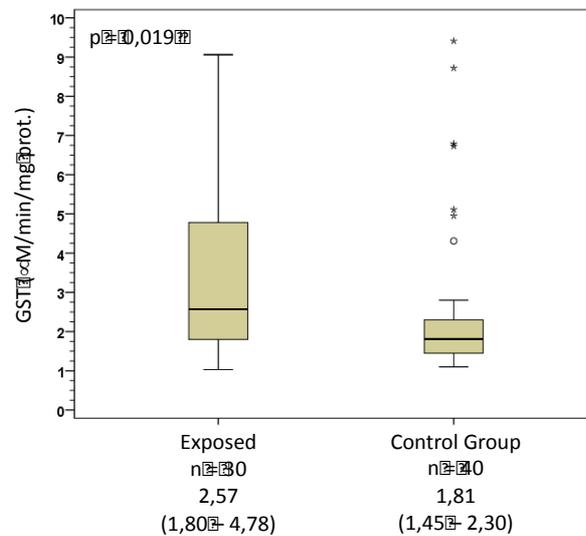


Figure 5: Comparison of GST activity in exposed and non-exposed patients

Discussion

This study evidenced higher serum levels of ALT and oxidative stress markers in blood (TBARS , SOD activity and GST activity) in the group exposed compared to the control group. The time of exposure did not have a significant influence on the results of ALT ($p > 0.05$).

Ever since Cave et al. for the first time in 2010 used the term TASH to describe the cases of toxic steatohepatitis in the work environment, there has been a growing interest in understanding the pathogenesis and evolution of the disease.⁹ Indeed, TASH, together with ASH (alcoholic steatohepatitis) and NASH (non alcoholic steatohepatitis) is one of the

three most prevalent forms of steatohepatitis, but few studies have been performed so far.

The impact of the rise of modern, urban and industrial development on health, with the progressive need to develop products from different raw materials, has not been duly sized. Studies on petrochemical products such as vinyl chloride, called attention to the possibility of severe liver damage with a subclinical evolution; in Cave's et al. study, 80% of the workers exposed presented histopathological evidence of steatohepatitis and 55% developed fibrosis, 80% presenting normal transaminases.¹⁹

It should be pointed out that the pioneering studies that first demonstrated the association between steatohepatitis and TASH were performed in the Brazilian Northeast by Cotrim et al. (1999), involving workers from the Petrochemical Complex with elevated transaminases.²⁰

ALT (alanine aminotransferase) has proved to be an important marker of liver injury (more than induction) on the contrary of GGT (gamma glutamyl transferase), which appears to be more closely related to the induction mechanisms and may be elevated due to damage in other organs besides the liver. Serum transaminases reflect a liver injury related to necrosis, while ALP and GGT are associated with hepatic cholestasis.²¹ Solvents may damage hepatocytes and ALT has proved to be a good biomarker of damage before it becomes irreversible

Lundquist et al. (1999), revising approximately 20 articles on exposure to solvents, observed the elevation of transaminases in about a third of them.²²

The presence of an elevation of ALT was clear in this study, in the group exposed (p:0.020) and was in accordance with other similar studies; there was no elevation >3x LSN.

Researching 33 shoemakers, Tomei et al. (1999) observed changes in the liver function in 44% of the workers, even with low levels of exposure to the mixture of solvents.²³

Carvalho et al. (2006), investigating workers at a Brazilian oil refinery, found as most frequent alterations in laboratory tests, the simultaneous elevation of transaminases and GGT, which occurred in 41.4 % of those exposed, even when the effects of alcohol, obesity and hepatitis were taken into account.²⁴

Perez et al. (2006) in a petrochemical company in which there was exposure to a mixture of toluene, xylene, described as the main laboratory finding, the alteration of transaminases (29.4%); of these 51.9% presented liver steatosis at ultrasound.²⁵

Rees et al. (1993), investigating liver injury in workers at an industrial plant that produced paints involving a mixture of solvents, found that 65% had at least one altered liver enzyme; AST (aspartate aminotransferase) was elevated by 52% and the GGT activity was elevated by 46%.²⁶

On the other hand, other studies did not show a significant association ($p>0.05$) between exposure to solvents and alteration of transaminases.

Ukai et al.(1994) reported the absence of alteration of the liver function in workers exposed to low doses of solvents, with a predominance of toluene.²⁷ Chen (1991) also did not detect alterations in the transaminases in workers in the industrial production of paints, in which the predominating solvents are toluene and xylene.²⁸

Lundberg et al. (1994) studied the long term effect of exposure to paint in painters, but with little or no current exposure (exposure in the past), without a significant increase of transaminases and GGT.²⁹

Most of these studies with normal transaminases, however, were performed with low doses of exposure, generally obeying the limits of tolerance to the recommended exposure .³⁰

Oxidative stress, in turn, is the most important toxicity mechanism of the solvents, through the generation of free radicals, ROS (reactive oxygen species) and RNS (reactive nitrogen species).^{31,32,33,34,35} It is characterized by the imbalance between oxidant and antioxidant agents favoring the oxidants, with a change in the cellular signalling and/or damage to the macromolecules)³⁶ Many toxic substances are metabolized mainly in the endoplasmic reticulum by mixed function oxidases (P450 cytochrome), especially P450 2E1 cytochrome (in the case of solvents) and NADPH P450 cytochrome reductase; these phase 1 enzymes may generate toxic metabolic intermediaries, such as quinones and semi-quinones (frequent in the metabolism of toluene and benzene), that are implicated in hepatotoxicity caused by solvents..^{37,38}

Since free radicals have a short half-life that makes it difficult to identify them, usually oxidative stress is analyzed indirectly through its effect on the lipidic membranes (lipoperoxidation); TBARS (substances that react with thiobarbituric acid) has been used for this purpose.

The analysis of antioxidant enzyme activity in blood, on the other hand, enables the analysis of the antioxidant defense mechanisms launched by the organism that is under attack.³⁹ These tests, combined with the ALT dosage, enable a non invasive evaluation of hepatotoxic aggression by solvents. These collections occurred during the workday for more efficacious results.

In this study, TBARS was 7.8 times greater in the plasma of the patients exposed ($p < 0.01$) than in the controls, indicating a large magnitude lipoperoxidation. The elevation of SOD and GST (the latter

being a major detoxicant enzyme) also attained statistical significance ($p < 0.05$) indicating a probable compensatory enzymatic induction response as a consequence of the hepatic aggression.

Halifeoglu (2000), studying a group of 18 painters, evaluated the effect of the thinner (mixture of solvents in which toluene predominates) on oxidative stress: there was, similarly to our study, an elevation of TBARS, SOD and GPx (glutathione peroxidase), evidencing oxidative stress.⁴⁰ Moro et al. (2012) also demonstrated a significant increase of TBARS in the blood of painters, linking the damage to the biological membranes to the possible toxic effect resulting from the biotransformation of toluene into toxic metabolites.³⁸

Exposure to toluene has shown, in vivo and in vitro, that it can cause oxidative stress.⁴¹

These results confirm that one should be careful when classifying solvents such as toluene as being low risk, especially if there is high and continuous exposure to the mixture of solvents, because of the additive effect. Even removing confounding factors such as alcoholism and obesity, aromatic solvents may cause hepatotoxicity, with consequences that are not yet fully known. It is also necessary to consider individual susceptibility and the particularity of the metabolism of toxic substances in each individual through the P450 cytochrome, which can be greatly influenced by genetic and environmental factors.⁴²

The first limitation of this study was the cross-sectional design and the impossibility of determining precisely the cause-effect relationship. There were only a few chronic diseases that could interfere in oxidative stress (5 patients exposed presented diseases such as arterial hypertension, diabetes mellitus and dyslipidemia.).

Conclusion:

There was liver damage evidenced by the elevation of ALT and oxidative stress markers in the patients exposed to organic solvents.

Further studies are needed to evaluate evolutionary liver lesions in this type of exposure.

Funding:

This study was supported by FIPE (Fundo de Incentivo à Pesquisa) at Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Conflict of interests:

There is no conflict of interests.

References:

1. Teschke R. Intoxications by aliphatic halogenated hydrocarbons : hepatotoxic risks for patients and clinical issues including role of CO₂-induced hyperventilation as therapy option. J Clin Exp Tox 2018; 2(1): 25-29
2. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) 2004. Interaction profile for 1,1,1-trichloroethane, 1,1-dichloroethane, trichloroethylene and tetrachloroethylene. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services. Public Health Services.

3. Shen C, Zhao C, Liu F, Wang Y, Wang W. Acute liver failure associated with occupational exposure to tetrachloroethylene. *J Korean Med Sci* 2011; 26(1):138-142.
4. Jung H, Kim H, Song B, Kim E. Trichloroethylene hypersensitivity syndrome: a disease of fatal outcome. *Yonsei Med J* 2012; 53(1): 231-235.
5. Xu H, et al. Exposure to trichloroethylene and its metabolites causes impairment of sperm fertilizing ability in mice. *Toxicol Sci* 2004; 82(2): 590-7.
6. Hubková B, Racz O, Body G, Frisman E, Mareková M. Toluene abuse markers in marginalized populations. *Interdiscip Toxicol* 2018; 11(1): 22-26
7. Wahlang B, Beier S, Clair H , Bellis Jones H, Falkner K, McClain C, Cave M. Toxicant-associated steatohepatitis. *Toxicologic pathology* 2013; 41(2): 343-360.
8. Kang Y, Ahn J, Hwang Y. Acute liver injury in two workers exposed to chloroform in cleanrooms: a case report. *Annals of Occupational and Environmental Medicine* 2014; 26:49.
9. Broadkin CA, et al. Hepatic ultrasonic changes in workers exposed to perchloroethylene. *Occup Environ Med* 1995; 52(10):679-685.
10. Al-Eryani L, Wahlang B, Falkner K C, Guardiola J, Clair HB, Prough R, Cave M. Identification of environmental chemicals associated with the development of toxicant-associated fatty liver disease in rodents. *Toxicologic Pathology* 2015; (43):482-497.
11. D'Andrea M, Reddy G. Benzene exposure from the BP refinery flaring incident alters hematological and hepatic function among smoking subjects. *Int J Occup Med Environ Health* 2017; 30(6):849-860.
12. Liu X, Gong W, Xu Y, Zhu B. Dimethylacetamide-induced hepatic injury in vitro: mechanism and potential preventive strategy. *Biomed Environ Sci* 2016;29 (2);153-157.

13. Dick FD. Solvent neurotoxicity. *Occup Environ Med* 2006; 63:221-226.
14. Brautbar N, Williams J. Industrial solvents and liver toxicity: risk assessment, risk factors and mechanisms. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 2002; (205): 479-491.
15. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
16. Yagi K. Assay for blood plasma or serum. *Methods in Enzymology* 1984; 105:328-331.
17. Misra, HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972;247:3170-3175
18. Mannervik BG. Glutathione transferase. *Methods in Enzymology* 1981;77:731-735,
19. Cave M., et al. Toxicant-associated steatohepatitis in vinyl chloride workers. *Hepatology* 2010; vol 51, n 2: 474-481.
20. Cotrim HP, Andrade ZA, Parana R, Portugal M, Lyra LG, Freitas LA. Non alcoholic steatohepatitis: a toxic liver disease in industrial workers. *Liver* 1999;19(4):299-304.
21. Kaukianen A, et al. Results of common laboratory tests in solvent-exposed workers. *Int Arch Occup Environ Health* 2004; 77:39-46.
22. Lundquist G, Flodin U, Axelson O. A case-control study of fatty liver disease and organic solvent exposure. *Am J Ind Med* 1999; 35:132-136
23. Tomei F, Giuntoli P, Biagi M, Baccolo TP, Tomao E, Rosati MU. Liver Damage

Among Shoe Repairers . *Coment AM J Ind Med* 1999; 36 (5): 541-547.

24.Carvalho F, et al. Liver enzyme abnormalities among oil refinery workers. *Rev. Saúde Pública* 2006; 40 (1). <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102006000100015>.

25.Perez CA, et al. Liver damage in workers exposed to hydrocarbons. *Gastroenterologia y Hepatologia* 2006; 29(6): 334-337.

26.Rees D, Soderlund N, Cronje R, Song E, Kielkowski D, Myers J. Solvent exposure, alcohol consumption and liver injury in workers manufacturing paint. *Scand J Work Environ Health* 1993; 19:236-44.

27.Ukai H, et al. Occupational exposure to solvent mixtures: effects on health and metabolism. *Occupational and Environmental Medicine* 1994;51:523-529.

28.Chen JD, Wang JD, Jang JP, Chen Y. Exposure to mixtures of solvents among paint workers and biochemical alterations of liver function. *Br J Ind Med* 1991;48 (10):696-701.

29.Lundberg I, Nise G, Hedenborg G, Hogberg M, Vesterberg O. Liver function tests and urinary albumin in house painters with previous heavy exposure to organic solvents. *Occupational and Environmental Medicine* 1994; 51:347-353.

30.Chang W, Joe K, Park H, Jeong J, Lee D. The relationship of liver function tests to mixed exposure to lead and organic solvents. *Annals of Occupational and Environmental Health* 2013; 25(5): 1-12.

31.Malaguarnera G, Cataudella E, Giordano M, Nunnari G, Chisari G, Malaguarnera M. Toxic hepatitis in occupational exposure to solvents. *World Journal of Gastroenterology* 2012; 18 (22):2756-2766.

32. Martínez-Alfaro M, Alcaraz-Contreras Y, Cárabel-Trejo A, Leo-Amador G. Oxidative stress effects of thinner inhalation. *Indian J Occup Environ Med* 2011; 15 (3): 87-92.
33. Gray J, Karandrea S, Burgos D, Jaiswal A, Heart E. NADPH-dependent quinone oxidoreductase 1 (NQO1) and cytochrome P450 oxidoreductase (CYP450OR) differentially regulate menadione-mediated alterations in redox status, survival and metabolism in pancreatic B-cells. *Toxicol Lett* 2016; 262:1-11.
34. Toxicological review of carbon tetrachloride. In Support of Summary information on the Integrated Risk Information System (IRIS). EPA. US Environmental Protection Agency, Washington, 2010.
35. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) 2010. Adendum to the toxicological profile for 1,1,2-trichloroethane. Division of Toxicology and Environmental Medicine. Atlanta, GA, 30333.
36. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology* 2015; 4:180-183.
37. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates D. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta* 1863 (2016);2977-2992.
38. Moro A, et al. Evaluation of genotoxicity and oxidative damage in painters exposed to low levels of toluene. *Mutation Research* 2012; 746:42-48.
39. Bessone F, Dirchwolf M, Rodil M, Razori M, Roma M. Review article: drug-induced liver injury in the context of nonalcoholic fatty liver disease-a physiopathological and clinical integrated view. *Aliment Pharmacol Ther* 2018;1-22.
40. Halifeoglu I, Canatan H, Ustundag B, Ilhan N, Inanc F. Effect of thinner inhalation of lipid peroxidation and some antioxidant enzymes of people working with paint thinner.

Cell Biochemistry and Function 2000; 18:263-267.

41. Karabulut I, Balkank ZD, Pehlivanoglu B, Erdem A, Fadillioglu E. Effects of toluene on erythrocyte membrane stability under in vivo and in vitro conditions with assessment of oxidant /antioxidant status. *Toxicol in Health* 2009; 25: 545-50.

42. Zanger U, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology and Therapeutics* 2013; 138: 103-141.

12 PERSPECTIVAS E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Poucos estudos tem sido realizados nas últimas décadas sobre os efeitos da exposição aos solventes sobre o organismo. Dificuldades operacionais e conflitos econômicos estão entre os principais fatores limitantes. Muitos estudos ainda são da década de 80, em função de acontecimentos como a terceirização, que contribuiu para a invisibilidade das doenças ocupacionais. Estudos adicionais são requeridos para a elucidação da etiopatogenia e repercussão clínica de TAFLD/TASH. Medidas de prevenção devem sempre ser reforçadas.

REFERÊNCIAS

1. Grundy SM, Brewer HB, Cleeman JI, Smith Jr SC, Lenfant C. Definition of Metabolic Syndrome: Report Of the National Heart, Lung and blood institute/ American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation*. 2004;(109):433-8.
2. Cleeman JI. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel III). *J Am Med Assoc*. 2001;285(19):2486-97.
3. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet*. 2005;365(9468):1415-28.
4. Wiklund PK, Pekkala S, Autio R, Munukka E, Xu L, Saltevo J, et al. Serum metabolic profiles in overweight and obese women with and without Metabolic Syndrome. *Diabetol Metab Syndr*. 2014;6(1):40.
5. O'Neill S, O'Driscoll L. Metabolic Syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. *Obes Rev*. 2015;16(1):1-12.
6. Moore JX, Chaudhary N, Akinremiju T. Metabolic Syndrome Prevalence by Race/Ethnicity and Sex in the United States, National Health and Nutritional Examination Survey, 1988-2012. *Prev Chronic Dis*. 2017;14:E 24.
7. VIGITEL Brasil 2016. Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Saúde; 2017.
8. Ford ES, Giles WH. A comparison of the prevalence of metabolic syndrome using two proposed definitions. *Diabetes Care*. 2003;26(3):575-81.
9. Gang H, Quiro Q, Tuomilehto J, Balkan B, Borch-Johnson K, Pyorala K. For the DECODE Study Group. Prevalence of the metabolic syndrome and its relation to all cause and

cardiovascular mortality in non diabetic european men and women. Arch Intern Med. 2004;164:1066-76.

10. Aguillar-Salinas CA, Rojas R, Gomez-Perez FJ, Valles U, Rios- Torres JM, Franco A, et al. High prevalence of metabolic syndrome in Mexico. Arch Med Res. 2004;35(1):76-81.

11. OH JY, Hong YS, Sung YA, Connor-Barret E. Prevalence and factor analysis of metabolic syndrome in an urban korean population. Diabetes Care. 2004;27(8):2027-32.

12. Nolan PB, Carrick-Ranson G, Stinear JW, Reading SA, Dalleck LC. Prevalence of metabolic syndrome and metabolic syndrome components in young adults: a pooled analysis. Prev Med Rep. 2017;7:211-5.

13. Fontanelli MM, Sales CH, Carioca AAF, Marchioni DM, Fisberg RM. The relationship between carbohydrate quality and the prevalence of metabolic syndrome: challenges of glicemic index and glicemic load. Eur J Nutr. 2018;57(3):1197-205.

14. Carvalho Vidigal F, Bressan J, Babio N, Salas-Salvadó J. Prevalence of metabolic syndrome in Brazilian adults: a sistematic review. BMC Public Health. 2013;13(1):1198.

15. Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. JAMA. 2002;287(3):356-9.

16. Saklayen M. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. Curr Hypertens Rep. 2018;20(2):12.

17. Kaur J. A comprehensive review on metabolic syndrome. Cardiol Res Pract. 2014:1-21.

18. Hu G, Qiao Q, Tuomilehto J, Balkau B, Borch-Johnsen K, Pyorala K. Prevalence of the Metabolic Syndrome and its relation to all causes and cardiovascular mortality in nondiabetic european men an women. Arch Intern Med. 2004;164(10):1066-76.

19. Ford ES. Risks for all-cause mortality, cardiovascular disease, and diabetes associated with the metabolic syndrome: a summary of the evidence. *Diabetes Care*. 2005;28(7):1769-78.
20. Mottillo S, Filion KB, Genest J, Joseph L, Pilote L, Poirier P, et al. The metabolic syndrome and cardiovascular risk: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol*. 2010;56(14):1113–32.
21. Alberti KGM, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome- a new worldwide definition. *The Lancet*. 2005;366(9491):1059-62.
22. Gallagher E, Novosyadlyy R, Yakar S, LeRoith D. The increased risk of cancer in obesity and type 2 diabetes: potential mechanisms. In: Poretsky L, editor. *Principles of Diabetes Mellitus*. Springer: US; 2010. p. 579–99.
23. Dizaji BF. The investigations of genetic determinants of the metabolic syndrome. *Diabetes Metab Syndr*. 2018;12(5):783-89.
24. Lemieux I, Pascot A, Couillard C, Lamarche B, Tchernof A, Alméras N, et al. Hypertriglyceridemic waist: A marker of the atherogenic metabolic triad (Hyperinsulinemia, hyperapoprotein B, small dense (LDL) in men? *Circulation*. 2000;102(2): 179-84.
25. Tchernof A, Despres JP. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol Rev*. 2013;93(1):359-404.
26. Chen Z, Yu R, Xiong Y, Du F, Zhu S. A vicious circle between insulin resistance and inflammation in non alcoholic fatty liver disease. *Lipids Health Dis*. 2017;16(1):203.
27. Han TS, Lean MES. Metabolic syndrome. *Medicine*. 2010;39(1),24-31.
28. Prasanna Kumar, KM. Metabolic Syndrome. *Int J Diabetes*. 2011;31(4):185-7.
29. Milic S, Lulic D, Stimac D. Non alcoholic fatty liver disease and obesity: Biochemical, metabolic and clinical presentations. *World J Gastroenterol*. 2014;20(28):9330-7.

30. Combs TP, Berg AH, Obici S, Sherer DE, Rossetti L. Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein. *ACRP 30. J Clin Invest.* 2001;108(12):1875-81.
31. Unger RH. Lipid overload and overflow: Metabolic Trauma and the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metabol.* 2003;14(9):398-403.
32. Jung U, Choi M. Obesity and its metabolic complications: The role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci.* 2014;15(4):6184-223.
33. Ferrannini E, Haffner SM, Mitchell BD, Stern, MP. Hyperinsulinemia: The key feature of a cardiovascular and metabolic syndrome. *Diabetologia.* 1991;34(6):416-22.
34. Hurre S, Hsu W. The etiology of oxidative stress in insulin resistance. *Biomed J.* 2017;40(5):257-62.
35. Leonardini A, Laviola L, Perrini S, Natalicchio A, Giorgino F. Cross-talk between PPAR γ and insulin signaling and modulation of insulin sensitivity. *PPAR Res.* 2009; 2009:1-12.
36. Teramoto T, Sasaki S, Ishibashi S, Birou S, Daida H, Hiro T, et al. Metabolic Syndrome: Executive summary of the Japan Atherosclerosis society (JAS) Guidelines for the diagnosis and prevention of atherosclerotic cardiovascular diseases in Japan-2012 Version. *J Atheroscler Thromb.* 2013;21(1), 1-5.
37. De Coster S, Larebeke N. Endocrine –disrupting chemicals: associated disorders and mechanisms of action. *J Environ Public Health.* 2012.
38. Shug T, Janesick A, Blumberg B, Heindel J. Endocrine Disrupting Chemicals and Disease Susceptibility. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2011;127(3-5):204-15.

39. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: practice guidelines from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2018;67(1), 328-57.
40. Levene AP, Goldin RD. The epidemiology, pathogenesis and histopathology of fatty liver disease. *Histopathology*. 2012;61(2):141-52.
41. Tomic D, Kemp W, Roberts SK. Non alcoholic fatty liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2018;30(10):1103-15.
42. Bayard M, Holt J, Boroughs E. Non-alcoholic fatty liver disease. nonalcoholic fatty liver disease. *Am Fam Physician*. 2006;73(11),1961-8.
43. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non alcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011;34(3),274-85.
44. Younossi Z, 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.
45. Bellentani S, Scaglioni F, Marino G. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig. Dis*. 2010;28(1):155-61.
46. Machado M, Marques-Vidal P, Cortez-Pinto H. Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery. *J Hepatol*. 2006;45(4):600-6.
47. Rudermann N, Chisholm D, Pi-sunyer X, Schneider S. The metabolically obese, normal weight individual revisited. *Diabetes*. 1998;47(5):699-713.
48. Dai W, Ye L, Liu A, Wen SW, Deng J, Wu X, et al. Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in patients with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. *Medicine*. 2017;96(39):e8179.

49. Angulo P. Non-alcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med.* 2002;346(16):1221-31.
50. Leite NC, Nogueira C, Cardoso C, Salles G. Non-alcoholic fatty liver disease and diabetes: from physiopatological interplay to diagnosis and treatment. *World J Gastroenterol.* 2014;20(26):8377-92
51. Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. Non Alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* 2002;122(6):1649-57.
52. Paredes AH, Torres DM, Harrison SA. Non alcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis.* 2012;16(2):397-419.
53. Kneeman, J. Misdraji JM, et al. Secondary causes of non alcoholic fatty liver disease. *Ther Adv Gastroenterol.* 2012;5(3):199-207.
54. Adams LA, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. *AEP.* 2007;17(11):863-69.
55. Musso G, Gambino R, Cassader M. Non alcoholic fatty liver disease from pathogenesis to management: an Update. *Obes Rev.* 2010;11(6):430-45.
56. Chen L, Du S, Lu L, Lin Z, Jin W, Hu D, et al. The additive effects of the TM6SF2 E167k and PNPLA3 I148M polymorphisms on lipid metabolism. *Oncotarget.* 2017;8(43):74209-16.
57. Perumpail BJ, Khan MA, Yoo ER, Cholankeril G, Kim D, Ahmed A. Clinical Epidemiology and disease burden of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2017;23(47):8263-76.
58. Diehl A, Day C. Cause, pathogenesis and treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med.* 2017;377(21):2063-72.
59. Caligiuri A, Gentilini A, Marra F. Molecular pathogenesis of NASH. *Int J Mol Sci.* 2016;17(9):1-34.

60. Angulo P, Fielding C. Hepatic steatosis and steatohepatitis: are they really two distinct entities? *Curr Hepatol Rep*. 2014;13(2):151-8.
61. Andronescu C, Purcarea M, Babes P. Non alcoholic fatty liver disease: epidemiology, pathogenesis and therapeutic implications. *J Med Life*. 2018;11(1):20-3.
62. Lomonaco R, Sunny N, Bril F, Cusi K. Nonalcoholic fatty liver disease: current issues and novel treatment approaches. *Drugs*. 2013;73(1):1-14.
63. Hagstrom H, Elfwen O, Hulcrantz R, Stal P. Steatohepatitis is not associated with an increased risk for fibrosis progression in non alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterol Res Pract*. 2018;2018:1-7.
64. Tsochatzis E, Newsome P. Non alcoholic fatty liver disease and the interface between primary and secondary care. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2018;3(7):509-17.
65. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011;34(3):274-85.
66. Goh GB, McCullough A. Natural history of nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci*. 2016;61(5):1226-33.
67. Fazel Y, Koenig AB, Sayiner M, Goodman ZD, Younossi ZM. Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease. *Metabolism*. 2016;65(8):1017-25.
68. Cohen J, Horton J, Hobbs H. Human Fatty Liver Disease: Old Questions and New Insights. *Science*. 2011;332(6037):1519-23.
69. Tilg H, Moschen A. Evolution of inflammation in non alcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*. 2010;52(5):1836-46.

70. Takaki A, Kawai D, Yamamoto K. Multiple hits, including oxidative stress, as pathogenesis and treatment target in non alcoholic steatohepatitis (NASH). *Int J Mol Sci*. 2013;14(10):20704-28.
71. Eguchi Y, Eguchi T, Mizuta T, Ide Y, Yasutake T, Iwakiri R, et al. Visceral fat accumulation and insulin resistance are important factors in non alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol*. 2006;41(5):462-9.
72. Chituri S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C, et al. NASH and insulin resistance: Insulin Hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology*. 2002;35(2):373-9.
73. Baran B, Akyuz F. Non alcoholic fatty liver disease: what has changed in the treatment since the beginning? *World J Gastroenterol*. 2014;20(39):14219-29.
74. Varman S, Schulman G. Integrating mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell*. 2012;148(5):852-71.
75. Mendes R. *Patologia do trabalho*. 3. ed. Atheneu; 1995.
76. Tilg H, Moschen A, Roden M. Nafld and diabetes mellitus. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14(1):32-42.
77. Schuster S, Cabrera D, Arrese M, Feldstein A. Triggering and resolution of inflammation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018;15(6):349-64.
78. Sapp V, Gaffney L, Eauclaire SF, Matthews RP. Fructose leads to hepatic steatosis in zebrafish that is reversed by mechanistic target of rapamycin (mTOR) inhibition. *Hepatology*. 2014;60(5):1581-92.
79. Romero-Gómez M, Zelber-Sagi S, Trenell M. Treatment of NAFLD with diet, physical activity and exercise. *J Hepatol*. 2017;67(4):829-46.

80. Friedman S, Newschander-Tetri B, Rinella M, Sanyal A. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med.* 2018;24(7):908-922.
81. Tetri LH, Basaranoglu M, Brunt EM, Yerian LM, Neuschwander-Tetri BA. Severe NAFLD with hepatic necro inflammatory changes in mice fed trans fats and a high-fructose corn syrup equivalent. *AM J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008;295(5):987-95.
82. Parker H, Johnson N, Burdon C, Cohn J, O'Connor H, George J. Omega-3 supplementation and non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol.* 2012;56(4):944-51.
83. Polyzos SA, Toulis KA, Goulis DG, Zavos C, Kontouras J. Serum total adiponectin in nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Metabolism.* 2011;60(3): 313-26.
84. Ziemke F, Mantzoros CS. Adiponectin in insulin resistance: lessons from translational research. *AM J Clin Nutr.* 2010;91(1):258-61.
85. Polyzos SA, Kontouras J, Zavos C, Tsiaousi, E. The role of adiponectin in the pathogenesis and treatment of non alcoholic fatty liver disease. *Diabetes obes metab.* 2010;12(5):365-83.
86. Boutari C, Perakakis N, Mantzoros C. Association of adipokines with development and progression of nonalcoholic fatty liver disease. *Endocrinol Metab.* 2018;33(1):33-43.
87. Rabe K, Lehrke M, Parhofer K, Broedl U. Adipokines and insulin resistance. *Mol Med.* 2008;14(11-12):741-51.
88. Yadav A, Kataria M, Saini V, Yadav A. Role of leptin and adiponectin in insulin resistance. *Clinica Chimica Acta.* 2013;417:80-4.
89. Esteve E, Ricart W, Fernandez-Real J. Adipocytokines and insulin resistance: the possible role of lipocalin-2, retinol binding protein-4, and adiponectin. *Diabetes Care* 2009;3(Suppl 2):S362-S367.

90. Lemoine M, Ratziu V, Kim M, Maachi M, Wendum D, Paye F, et al. Serum adipokine levels predictive of liver injury in non alcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* 2009;29(9):1431-8.
91. Procaccini C, Galgani M, Rosa V, Carbone F, La rocca C, Ranucci G, et al. Leptin: the prototypic adipocytokine and its role in NAFLD. *Curr Pharm Des.* 2010;16(17):1902-12.
92. Ajmera V, Perito ER, Bass NM, Terrault NA, Yates KP, Gill R, et al. Novel plasma biomarkers associated with liver disease severity in adults with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2017;65(1):65-77.
93. Brandl K, Schnabl B. The intestinal microbiota and NASH. *Current Opin Gastroenterol.* 2017;33(3):128-33.
94. Boursier J, Mueller O, Barret M, Machado M, Fizanne L, Araujo- Perez F, et al. The severity of NAFLD is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota. *Hepatology.* 2016; 63(3): 764-75.
95. Saltzman E, Palacios T, Thomsen M, Vitetta L. Intestinal microbiome shifts, dysbiosis, inflammation, and non-alcoholic fatty liver disease. *Front Microbiol.* 2018;9:61, 1-9.
96. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet- induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes.* 2008;57(6):1470-81.
97. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic Endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007;56(7):1761-72.
- 98 Miura K, Ohnishi H. Role of gut microbiota and Toll-like receptors in nonalcoholic fatty liver disease. *Worl J Gastroenterol.* 2014;20(23):7381-91.

99. Wan X, Xu C, Yu C, Li Y. Role of NLRP3 inflammasome in the progression of NAFLD to NASH. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2016;2016:1-7.
100. Machado M, Diehl A. Pathogenesis of Nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2016;150(8):1769-77.
101. Alkhoury N, Dixon L, Feldstein A. Lipotoxicity in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: not all lipids are created equal. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2009;3(4):445-51.
102. Povero D, Feldstein A. Novel molecular mechanisms in the development of non-alcoholic steatohepatitis. *Diabetes Metab J*. 2016;40(1):1-11.
103. Byrne C, Targher G. NAFLD: a multisystem disease. *J Hepatol*. 2015;62:S47-S64.
104. Pagadala M, Kasumov T, Mc Cullough A, Zein N, Kirwan J. Role of ceramides in Nonalcoholic fatty liver disease. *Trends Endocrinol Metabol*. 2012;23(8):365-71.
105. Tirosh O. Hypoxic signaling and cholesterol lipotoxicity in fatty liver disease progression. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;18(7):1-15.
106. Matsuzawa N, Takamura T, Kurita S, Misu H, Ota T, Ando H, et al. Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology*. 2007;46(5):1392-403.
107. Anavi S, Madar Z, Tirosh O. Non-alcoholic fatty liver disease, to struggle with the strangle: oxygen availability in fatty livers. *Redox Biol*. 2017;13:386-92.
108. Anavi S, Eisenberg-Bord M, Hahn-Obercyger M, Genin O, Pines M, Tirosh O. The role of iNOS in cholesterol-induced liver fibrosis. *Laboratory investigation*. 2015;95(8):914-24.
109. Sanyal A, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo W, Contos M, Sterling R, et al. Non alcoholic steatohepatitis: association of resistance insulin and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology*. 2001;120(5),1183-92.

110. Foroughi M, Maghsoudi Z, Khayyatzadeh S, Ghiasvand R, Askari G, Iraj B. Relationship between non- alcoholic fatty liver disease and inflammation in patients with non-alcoholic fatty liver. *Adv Biomed Res.* 2016;5:28.
111. Theurey P, Pizzo P. The aging mitochondria. *Genes.* 2018;9(22):1-13.
112. Rolo A, Teodoro J, Palmeira C. Role of oxidative stress in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med.* 2012;52(1):59-69.
113. Tariq Z, Green C, Hodson L. Are oxidative stress mechanisms the common denominator in the progression from hepatic steatosis towards non-alcoholic steatohepatitis (NASH)? *Liver International.* 2014;34:e180-e190.
114. Shimada K, Crother TR, Karlin J, Dagvadorj J, Chiba N, Chen S, et al. Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP-3 inflamassome during apoptosis. *Immunity.* 2012;36(3):401-14.
115. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis E. The multiple hits pathogenesis of Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism.* 2016;65(8):1038-48.
116. Sozen E, Ozer N. Impact of high cholesterol and endoplasmic reticulum stress on metabolic diseases. *Redox Biol.* 2017;12:456-61.
117. Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJ Med.* 2010;103(2):71-83.
118. Chambel S, Santos-Gonçalves A, Duarte T. The dual role of NRF2 in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Regulation of Antioxidant Defenses and Hepatic Lipid Metabolism. *Biomed Res Int.* 2015;1-10.

119. Lebeaupin C, Vallee D, Hazari Y, Hetz C, Chevet E, Bailly-Maitre B. Endoplasmic Reticulum stress signaling and the pathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *J Hepatol.* 2018;69(4): 927-47.
120. DeZwaan-McCabe D, Sheldon RD, Gorecki MC, Guo DF, Gansemer ER, Kaufman RJ, et al. ER stress inhibits liver fatty acid oxidation while unmitigated stress leads to anorexia-induced lipolysis and both liver and kidney steatosis. *Cell Rep.* 2017; 19(9):1794-806.
121. Arab JB, Arrese M, Trauner M. Recent insights into the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Annu Rev Pathol.* 2018;13(1):321-50.
122. Lake AD, Novak P, Hardwick RN, Flores-Keown B, Zhao F, Klimecki WT, et al. The adaptive endoplasmic reticulum stress response to lipotoxicity in progressive human nonalcoholic fatty liver disease. *Toxicol Sci.* 2014;137(1): 26-35.
123. Malhi H, Kaufmann R. Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *J Hepatol.* 2011;54(4):795-809.
124. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates D. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2016;1863(12):2977-92.
125. Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y, et al. ROS and ROS-mediated cellular signaling. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;1-18.
126. Masarone M, Rosato V, Dallio M, Gravina A, Aglitti A, Loguercio C, et al. Role of oxidative stress in pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;1-14.
127. Zito E. *Free Radic. Biol Med.* 2015;83:299-304.
128. Chen J, Montagner A, Tan N, Wahli W. Insights into the role of PPAR B in NAFLD. *Int J Mol Sci.* 2018;19(7):1893.

129. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* 2015;(4):180-3.
130. Tariq Z, Green C, Hodson L. Are oxidative stress mechanisms the common denominator in the progression from hepatic steatosis towards non-alcoholic steatohepatitis (NASH)? *Liver International.* 2014;34:e180-e190.
131. Zuo L, Zhou T, Pannel BK, Ziegler AC, Best TM. Biological and physiological role of reactive oxygen species –the good, the bad and the ugly. *Acta Physiol.* 2015;214(3):329-48.
132. Turrens J. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003;552(2)335-44.
133. Phaniendra A, Jestadi D, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets and their implications in various diseases. *Ind J Clin Biochem.* 2015;30(1):11-26.
134. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(3):181-9.
135. Salvador M, Henriques JAP. Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo. Canoas: Ed ULBRA; 2004.
136. Kalyanaraman B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol.* 2013;1(1):244-57.
137. Gough DR, Cotter TG. Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule. *Cell Death Dis.* 2011;2(10):e213.
138. Kurutas E. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutr J.* 2016;15(1):71.
139. Klaunig J, Kamenoulis L, Hocevar B. Oxidative stress and oxidative Damage in carcinogenesis. *Toxicol Pathol.* 2010;38(1):95-109.

140. Agnez-Lima L, Melo JT, Silva AE, Oliveira AHS, Timoteo ARS, Lima-Bessa KM, et al. DNA Damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2012; 751(1):15-28.
141. Dayem A, Hossain M, Lee S, Kim K, Saha S, Yang G, et al. The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles. *Int J Mol Sci*. 2017;18(1):120,1-21.
142. Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF- alpha or adiponectin? *Hepatology*. 2004;40(1):46-54.
143. Berlanga A, Guiu-Jurado E, Porras JA, Auguet T. Molecular pathways in non alcoholic liver disease. *Clin Exp Gastroenterol*. 2014;7:221-39.
144. Barlett K, Eaton S. Mitochondrial B-oxidation. *Eur J Biochem*. 2004;271:462-9.
145. Marroni N, Martins MI, Porawski M. Radicais livres no processo saúde doença: da bancada à clínica. Curitiba: CRV; 2012.
146. Jiang J, Torok N. NADPH oxidases in chronic liver diseases. *Adv Hepatol*. 2014;1-8.
147. Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. *Clin Interv Aging*. 2007, 2(2):219-36.
148. Halliwell B. Free radical, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? *The Lancet*. 1994;344(8924):721-4.
149. Spahis S, Delvin E, Borys JM, Levy E. Oxidative stress as a critical factor in Nonalcoholic Fatty Liver Disease pathogenesis. *Antioxid Redox Signal*. 2017;26(10): 519-41.

150. Ayala A, Munõz M, Arguelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signalling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;6:1-31.
151. Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: present concepts. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010;26:173-9.
152. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanisms, measurement and significance. *Am J Clin Nutr*. 1993;57(5):715-25.
153. Li S, Tan H, Wang N, Zhang Z, Lao L, Wong C, et al. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *Int J Mol Sci*. 2015;16(11): 26087-124.
154. Koruk M, Taysi S, Savas M, Yilmaz O, Akcay F, Karakok M. Oxidative Stress and Enzymatic Antioxidant Status in Patients with Nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Clin Lab Sci*. 2004;34(1):57-62.
155. Alisi A, Carpino G, Oliveira F, Panera N, Nobili V, Gaudio E. The role of tissue macrophage-mediated inflammation on NAFLD pathogenesis and its complications. *Mediators Inflamm*. 2017;1-15.
156. Lugin J, Rosenblatt-Velin N, Parapanov R, Liaudet L. The role of oxidative stress during inflammatory processes. *Biol Chem*. 2014;395(2):203-30.
157. Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14(7):397-411.
158. Arrese M, Cabrera D, Kalergis A, Feldstein A. Innate immunity and inflammation in NAFLD/NASH. *Dig Dis Sci*. 2016;61(5):1294-303.
159. Li S, Hong M, Tan Hor-Yue, Wang N, Feng Y. Insights into the role and interdependence of oxidative stress and inflammation in liver diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;1-22.

160. Hirsova P, Gores GJ. Death receptor-mediated cell death and proinflammatory signaling in Nonalcoholic steatohepatitis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2015;1(1):17-27.
161. Davies KJ. The evolution of free radical biology and medicine: Still radical after a quarter of century. *Free Radic Biol Med.* 2010;49(12):1825-33.
162. Irshad M, Chaudhuri PS. Oxidant-antioxidant system: role and significancy in human body. *Indian J Exp Biol.* 2002;40(11):1233-9.
163. Zhang C, Wang N, Xu Y, Tan H, Li S, Feng Y. Molecular mechanisms involved in oxidative stress-associated liver injury induced by Chinese herbal medicine: an experimental evidence-based literature review and network pharmacology study. *Int J Mol Sci.* 2018;19(9):1-29.
164. Birben E, Sahiner U, Sackesen C, Erzurum S, Kalaicy O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 2012;5(1):9-19.
165. Patlevic P, Vaskova J, Svorc Jr P, Vasko L, Svorc P. Reactive Oxygen Species and antioxidant defense in human gastrointestinal diseases. *Integr Med Res.* 2016;5(4):250-8.
166. Simões I, Fontes A, Pinton P, Zischka H, Wiechowski M. Mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2018;95:93-9.
167. Nimse SB, Pal D. Free radicals, natural antioxidants and their reaction mechanisms. *RSC Adv.* 2015;5(35):27986-28006.
168. Kitade H, Chen G, Ni Y, Ota T. Non Alcoholic Fatty Liver Disease and Insulin Resistance: New Insights and Potential New Treatments. *Nutrients.* 2017;9(4):387.
169. Mikami T, Sorimachi M. Uric acid contributes greatly to hepatic antioxidant capacity besides protein. *Physiol Res.* 2017;66(6):1001-7.

170. Abenavoli L, Milic N, Luzzza F, Boccutto L, De Lorenzo A. Polyphenols treatment in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Transl Int Med.* 2017;5(3);144-7.
171. Serviddio G, Bellanti F, Vendemiale G. Free radical biology for medicine: learning from nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic Biol Med.* 2013;65:952-68.
172. Arauz J, Ramos-Tovar E, Muriel P. Redox-state and methods to evaluate oxidative stress in liver Damage: from bench to bedside. *Ann Hepatol.* 2016;15(2);160-73.
173. Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa J. Mitochondrial oxidative stress and antioxidants balance in fatty liver disease. *Hepatol Commun.* 2018;2(12):1425-39.
174. Allocati N, Masulli M, Di Ilio C, Federici L. Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. *Oncogenesis.* 2018;7(1):8.
175. Oakley A. Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug Metab Rev.* 2011;43(2):138-54.
176. Hayes JD, Flanagan JD, Jonsey JR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005;45:51-88.
177. Thakkar AP, Shah HJ, Patel ND, Shah JG. Alteration in antioxidant defense system and oxidative stress in blood for non alcoholic fatty liver disease. *IJSRBS.* 2017;4(5):1-10.
178. Pannala V, Dash R. Mechanistic characterization of the thioredoxin system in the removal of hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med.* 2015;78:42-55.
179. Rhee S. Overview on peroxiredoxin. *Mol Cells.* 2016;39(1):1-5.
180. Perkins A, Nelson K, Parsonage D, Poole L, Karplus PA. Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. *Trends Biochem Sci.* 2015;40(8):435-45.

181. He L, He T, Famar S, Ji L, Liu T, Ma X. Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. *Cell Physiol Biochem*. 2017; 44(2):532-53.
182. Wang Y, Branicky R, Noë A, Hekimi S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS Damage and regulating ROS signaling. *J Cell Biol*. 2018; 217(6):1915-28.
183. Wahlang B, Beier S, Clair H , Bellis Jones H, Falkner K, McClain C, et al. Toxicant-associated steatohepatitis. *Toxicol Pathol*. 2013; 41(2):343-60.
184. Cave M, Falkner KC, Ray M, Joshi- Barve S, Brock G, Khan R, et al. Toxicant-associated steatohepatitis in vinyl chlorid workers. *Hepato Comm*. 2010;51(2):474-81.
185. Clair HB, Pinkston CM, Rai SN, Pavuk M, Dutton ND, Brock GN, et al. Liver disease in a residential cohort with elevated polychlorinated biphenyl exposure. *Toxicol Sci*. 2018;164(1):39-49.
186. Cotrim HP, Andrade ZA, Parana R, Portugal M, Lyra LG, Freitas LA. *Non alcoholic steatohepatitis*: a toxic liver disease in industrial workers. *Liver*. 1999;19(4):299-304.
187. Cotrim H, Carvalho F, Siqueira AC, Lordelo M, Rocha R. *Nonalcoholic Fatty Liver Disease* and insulin resistance among petroquimical workers. *Jama*. 2005;17(8):1618-20.
188. Meyer-Alber A, Hartmann H, Stumpel F, Creutzfeldt W. Mechanism of insulin resistance in CCL4-induced cirrhosis of rats. *Gastroenterology*. 1992;102(1):223-9.
189. Kaiser JP, Lipscomb J, Wesselkamper S. Putative mechanisms of environmental chemical-induced steatosis. *Int J Toxicol*. 2012;31(6):551-63.
190. Malaguarnera G, Cataudella E, Giordano M, Nunnari G, Chisari G, Malaguarnera M. Toxic hepatitis in occupational exposure to solvents. *World Journal of Gastroenterology* 2012;18 (22):2756-66.

191. Adams D, Ju C, Ramaiah S, Uetrecht J, Jaeschke H. Mechanisms of immune-mediated liver injury. *Toxicological Sciences*. 2010;115(2):307-21.
192. Robinson M, Harmon C, O'Farrelly C. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. *Cellular and Molecular Immunology*. 2016;13(3):267-76.
193. Lang AL, Beier JJ. Interaction of volatile organic compounds and underlying liver disease: a new paradigm for risk. *Biol Chem*. 2018;399(11):1237-48.
194. Blajszczak C, Bonini M. Mitochondria targeting by environmental stressors: implications for redox cellular signaling. *Toxicology*. 2017;391:84-9.
195. Meyer JN, Leung MC, Rooney JP, Sandoel A, Hengartner MO, Kisby GE, et al. Mitochondria as a target of environmental toxicants. *Fundam Appl Toxicol*. 2013;134(1):1-17.
196. Stehbens W. Oxidative stress, toxic hepatitis, and antioxidants with particular emphasis on zinc. *Exp Mol Pathol*. 2003;75(3):265-76
197. Sturgill M, Lambert G. Xenobiotic-induced hepatotoxicity: mechanisms of liver injury and methods of monitoring hepatic function. *Clin Chem*. 1997;43(8):1512-26.
198. Wang M, Roberts D, Paschke R, Shea T, Masters B, Kim J. Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: prototype for FMN-and FAD-containing enzymes. *Proc Natl Acad Sci*. 1997;94(16):8411-6
199. Hodges R, Minich D. Modulation of metabolic detoxification pathways using food and food-derived components: a scientific review with clinical application. *J Nutr Metab*. 2015;1-23.
200. Zanger U, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther*. 2013;138(1):103-41.

201. Guengerich F. Intersection of roles of cytochrome P450 enzymes with xenobiotic and endogenous substrates. Relevance to toxicity and drug interactions. *Chem Res Toxicol.* 2017;30(1):2-12.
202. Stavropoulou E, Pirealabioru G, Bezirtzoglou E. The role of cytochrome P450 in infection. *Front Immunol.* 2018;9:89.
203. Mackowiak B, Wang H. Mechanisms of xenobiotic receptor activation: direct vs. indirect. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1859(9):1130-40.
204. Bessone F, Dirchwolf M, Rodil M, Razori M, Roma M. Review article: drug-induced liver injury in the context of nonalcoholic fatty liver disease-a physiopatological and clinical integrated view. *Aliment Pharmacol Ther.* 2018;1-22.
205. Nakajima T, Rui-Sheng W. Induction of cytochrome P450 by toluene. *Int J Biochem.* 1994;26(12):1333-40.
206. Martínez-Alfaro M, Alcaraz-Contreras Y, Cárabel-Trejo A, Leo-Amador G. Oxidative stress effects of thinner inhalation. *Indian J Occup Environ Med.* 2011;15(3):87-92.
207. Banerjee S, Ghosh J, Sil P. Drug metabolism and oxidative stress: cellular mechanism and new therapeutic insights. *Biochem and Anal Biochem.* 2016;5:255, 1-11.
208. Xiong R, Siegel D, Ross D. Quinone-induced protein handling changes: implications for major protein handling systems in quinone-mediated toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2014; 280(2):285-95.
209. Gray J, Karandrea S, Burgos D, Jaiswal A, Heart E. NADPH-dependent quinone oxidoreductase 1 (NQO1) and cytochrome P450 oxidoreductase (CYP450OR) differentially regulate menadione-mediated alterations in redox status, survival and metabolism in pancreatic B-cells. *Toxicol Lett.* 2016;262:1-11.
210. Dick FD. Solvent neurotoxicity. *Occup Environ Med.* 2006;63(3):221-6.

211. Teschke R. Intoxications by aliphatic halogenated hydrocarbons: hepatotoxic risks for patients and clinical issues including role of CO₂-induced hyperventilation as therapy option. *J Clin Exp Tox.* 2018;2(1):25-9.
212. Brautbar N, Williams J. Industrial solvents and liver toxicity: risk assessment, risk factors and mechanisms. *Int J Hyg Environ Health.* 2002; (205): 479-491.
213. Buschinelli JTP. Agentes químicos e intoxicações ocupacionais. In: Ferreira Jr M. Saúde no trabalho: temas básicos para o profissional que cuida da saúde dos trabalhadores. São Paulo: Roca; 2000, p. 137-75.
214. Hasani I, Sharaf N, El Desouki M, Shakour A, Mohamed M. Hepatic impairment among workers of furniture manufacture occupationally exposed to solvents in Egypt. *JASMR.* 2015;10(2):82-7.
215. Bratveit M, Hollund BE, Moen BE. Reduced exposure to organic solvents by use of water-based paint systems in car repair shops. *Int Arch Occup Environ Health.* 2004;77(1): 31-8.
216. Al-Eryani L, Wahlang B, Falkner K C, Guardiola J, Clair HB, Prough R, et al. Identification of environmental chemicals associated with the development of toxicant-associated fatty liver disease in rodents. *Toxicol Pathol.* 2015;43(4):482-97.
217. Olson K. *Manual de Toxicologia Clínica.* 6 ed. Porto Alegre: AMGH; 2014.
218. Kang Y, Ahn J, Hwang Y. Acute liver injury in two workers exposed to chloroform in cleanrooms: a case report. *Ann Occup Environ Med.* 2014; 26(1):49.
219. US Environmental Protection Agency. Toxicological review of carbon tetrachloride. In Support of Summary information on the Integrated Risk Information System (IRIS). EPA. Washington; 2010.

220. Plaa GL. Chlorinated methans and liver injury: highlights of the past 50 years. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2000;40(1):4365.
221. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Interaction profile for 1,1,1-trichloroethane, 1,1-dichloroethane, trichloroethylene and tetrachloroethylene. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services. Public Health Services; 2004.
222. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Adendum to the toxicological profile for 1,1,2-trichloroethane. Division of Toxicology and Enviromental Medicine. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services; 2010. 30333.
223. Jung H, Kim H, Song B, Kim E. Thrichloroethylene hypersensitivity syndrome: a disease of fatal outcome. *Yonsei Med J.* 2012;53(1): 231-5.
224. Xu H, Tanphaichitr N, Forkert PG, Anupriwan A, Weerachatanukul W, Vincent R, et al. Exposure to trichloroethylene and its metabolites causes impairment of sperm fertilizing ability in mice. *Toxicol Sci.* 2004;82(2):590-7.
225. Kim H, Kim T. Occupational hepatic disorders in Korea. *J Korean Med Sci.* 2010; 25(Suppl):S36-S40.
226. Cichocki J, Guyton K, Guha N, Chiu W, Rusyn I, Lash L. Target organ metabolism, toxicity, and mechanisms of trichloroethylene and perchloroethylene: key similarities, differences, and data gaps. *J Pharmacol Exp Ther.* 2016;359(1):110-23.
227. Shen C, Zhao C, Liu F, Wang Y, Wang W. Acute liver failure associated with occupational exposure to tetrachloroethylene. *J Korean Med Sci.* 2011; 26(1):138-42.
228. Broadkin CA, Daniell W, Checkoway H, Echeverria D, Johnson J, Wang K, et al. Hepatic ultrasonic changes in workers exposed to perchloroethylene. *Occup Environ Med.* 1995; 52(10):679-85.

229. Bagnell PC, Ellenberger HA. Obstructive jaundice due to a chlorinated hydrocarbon in breast milk. *Can Med Assoc J.* 1977;117(9):1047-8.
230. Doyle P, Roman E, Beral V, Brookes M. Spontaneous abortion in dry cleaner workers potentially exposed to perchloroethylene. *Occup Environ Med.* 1997;54(12):848-53.
231. Cavalleri A, Gobba F, Paltrinieri M, Fantuzzi G, Righi E, Aggazzotti G. Perchloroethylene exposure can induce color vision loss. *Neurosci Lett.* 1994;179(1-2):162-6.
232. Xiao J, Levin S. The diagnosis and management of solvent-related disorders. *Am J Ind Med.* 2000;37(1):44-61.
233. Hubková B, Racz O, Body G, Frisman E, Mareková M. Toluene abuse markers in marginalized populations. *Interdiscip Toxicol.* 2018;11(1): 22-6.
234. Moro A, Brucker N, Charão M, Bulcão R, Freitas F, Baierle M, et al. Evaluation of genotoxicity and oxidative *Damage* in painters exposed to low levels of toluene. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2012;746(1):42-8.
235. Camara-Lemarroy C, Rodriguez-Gutierrez R, Monreal-Robles R, Gonzalez-Gonzalez J. Acute toluene intoxication- clinical presentation, management and prognosis: a prospective observational study. *BMC Emerg Med.* 2015;15(1):19.
236. Dossing M, Arlien- Soborg PETER, Petersen LM, Ranek L. Liver Damage associated with occupational exposure to organic solvents in house painters. *Eur J Clin Invest.* 1983;13(2):151-7.
237. Perez CA, Bosia JD, Cantore MS, Chiera A, Cocozzella DR, Adrover RE, et al. Liver Damage in workers exposed to hydrocarbons. *Gastroenterologia y Hepatologia.* 2006;29(6):334-7.
238. Yurtseven A, Türksöylü M, Karapınar B, Saz EU. A glue sniffer teenager with anuric renal failure and hepatitis. *Turk J Pediatr.* 2018;60(2):206-9.

239. Uboh F, Ufot S. Withdrawal from exposure reverses hematotoxicity and hepatotoxicity caused by oral exposure to nitrocellulose thinner in male rats. *J Clin Toxicol*. 2013;3(5)1-6.
240. Kandyala R, Raghavendra S, Rajasekharan S. Xylene: an overview of its health hazards and preventive measures. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2010;14(1):1-5.
241. Uchida Y, Nakatsuka H, Ukai H, Watanabe T, Liu YT, Huang MY, et al. Symptoms and signs in workers exposed predominantly to xylene. *Int Arch Occup Environ Health*. 1993;64(8):597-605.
242. Niaz K, Bahadar H, Maqbool F, Abdollahi M. A review of environmental and occupational exposure to xylene and its health concerns. *EXCLI J*. 2015;14:1167-86.
243. Moro A, et al. Biomonitoring of gasoline station attendants exposed to benzene: effect of gender. *Mutation Research* 2017; 813:1-9.
244. Abplanalp W, Brucker N, Charão MF, Baierle M, Sauer E, Goethel G, et al. Benzene exposure is associated with cardiovascular disease risk. *PLoS One*. 2017;12(9):e0183602.
245. Hegazy R, Kamel H. Oxidant hepatic and /or haem. Injury on fuel-station workers exposed to benzene vapor, possible protection of antioxidants. *Am J Med Med Sci*. 2014;4(2):35-46.
246. Aksoy M, Dinçol K, Akgün T, Erdem Ş, Dinçol G. Haematological effects of chronic benzene poisoning in 217 workers. *Brit J Industr Med*. 1971;28(3):296-302.
247. D'Andrea M, Reddy G. Benzene exposure from the BP refinery flaring incidente alters hematological and hepatic function among smoking subjects. *Int J Occup Med Environ Health*. 2017;30(6):849-60.

248. El Shakour A, El-Ebiare AS, Ibrahim YH, Abdel MAE, El-Mekawy AM. Effect of benzene on oxidative stress and the functions of liver and kidney in rats. *J Environ Occup Sci.* 2015;4(1):34-9.
249. US Department of Health and Human Services. Toxicological profile for ethylbenzene. Agency for toxic substances and disease registry; 2010.
250. US Department of Health and Human Services. Public Health Service. Toxicological Profile for Styrene. Agency for Toxic Substances and Disease Registry; 2010.
251. Liu X, Gong W, Xu Y, Zhu B. Dimethylacetamide-induced hepatic injury in vitro: mechanism and potential preventive strategy. *Biomed Environ Sci.* 2016;29(2):153-7.
252. Gong W, Liu X, Zhu B. Dimethylacetamide–induced occupational toxic hepatitis with a short term recurrence: a rare case report. *J Thorac Dis.* 2016;8(6):E408-E411.
253. Snyder R. Leukemia and benzene. *Int J Environ Res Public Health.* 2012;9(8): 2875-2893.
254. Lundquist G, Flodin U, Axelson O. A case-control study of fatty liver disease and organic solvent exposure. *Am J Ind Med.* 1999;35(2):132-6.
255. Dyson J, Anstee Q, Mc Pherson S. Non alcoholic fatty liver disease: a practical approach to diagnosis and staging. *Frontline Gastroenterol.* 2014;5(3):211-8.
256. Carey E, Carey W. Non invasive tests for liver disease, fibrosis and cirrhosis: is the liver biopsy obsolete? *Cleve Clin J Med.* 2010;77(8):519-27.
257. Mikolasevic I, Orlic L, Franjic N, Hauser G, Stimac D, Milic S. Transient elastography (FibroScan) with controlled attenuation parameter in the assessment of liver steatosis and fibrosis in patients with non alcoholic fatty liver disease-Where do we stand? *World J Gastroenterol.* 2016;22(32):7236-51.

258. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1-2):248-54.
259. Yagi K. Assay for blood plasma or serum. *Methods in Enzymology* 1984; 105:328-331.
260. Misra, HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972;247(10):3170-3175
261. Mannervik BG. Glutathione transferase. *Methods Enzymol.* 1981;77:731-5.
262. Kaukiainen A, Vehmas T, Rantala K, Nurminen M, Martikainen R, Taskinen H. Results of common laboratory tests in solvent-exposed workers. *Int Arch Occup Environ Health.* 2004; 77:39-46.
263. Vagharia K, Bhavyata K, Linzbuoy G, Hyacinth H. Renal and hepatotoxic alterations in adult mice on inhalation of specific mixture of organic solvents. *Toxicol Ind Health* 2015; 31 (12): 1158-1164.
264. Bulka C, Davignus ML, Persky VW, Durazo-Arvizu RA, Avilés-Santa ML, Gallo LC, et al. Occupational Exposures and Metabolic Syndrome Among Hispanics /Latinos. *J Occup Environ Med.* 2017;59(11):1047-55.
265. Kim K, Won YL, Ko KS, Heo KH, Chung YH. The effects of hazardous chemical exposure on cardiovascular disease in chemical products manufacturing workers. *Toxicol Res.* 2012;28(4):269-77.
266. Panke C, Joveleviths D, Raimann G, Knijnik G, Dávila K, Monaiar L, Rodrigues S. Assessment of an occupational risk factor for metabolic syndrome. *Italian Journal of Occupational and Environmental Hygiene.* 2017;8(1).

267. Tomei F, Giuntoli P, Biagi M, Baccolo TP, Tomao E, Rosati MU. Liver Damage Among Shoe Repairers. *Coment AM J Ind Med.* 1999; 36(5):541-7.
268. Carvalho F, Silvany Neto AM, Mendes JLB, Cotrim HP, Nascimento ALC, Lima Júnior AS. Liver enzyme abnormalities among oil refinery workers. *Rev. Saúde Pública.* 2006;40(1).
269. Rees D, Soderlund N, Cronje R, Song E, Kielkowsky D, Myers J. Solvent exposure, alcohol consumption, and liver injury in workers manufacturing paint. *Scand J Work Environ Health.* 1993;19:236-44.
270. Ukai H, Takada S, Inui S, Imai Y, Kawai T, Shimbo SI, et al. Occupational exposure to solvent mixtures: effects on health and metabolism. *Occupational and Environmental Medicine.* 1994; 51:523-529.
271. Chen JD, Wang JD, Jang JP, Chen Y. Exposure to mixtures of solvents among paint workers and biochemical alterations of liver function. *Br J Ind Med.* 1991;48(10):696-701.
272. Lundberg I, Nise G, Hedenborg G, Hogberg M, Vesterberg O. Liver function tests and urinary albumin in house painters with previous heavy exposure to organic solvents. *Ann Occup Environ Med.* 1994;51;347-53.
273. Chang W, Joe K, Park H, Jeong J, Lee D. The relationship of liver function tests to mixed exposure to lead and organic solvents. *Ann Occup Environ Med.* 2013;25(5):1-12.
274. Halifeoglu I, Canatan H, Ustundag B, Ilhan N, Inanc F. Effect of thinner inhalation of lipid peroxidation and some antioxidant enzyme of people working with paint thinner. *Cell Biochem Funct.* 2000;18:263-7.
275. Karabulut I, Balkank ZD, Pehlivanoglu B, Erdem A, Fadillioglu E. Effects of toluene on erythrocyte membrane stability under in vivo and in vitro conditions with assessment of oxidant /antioxidant status. *Toxicol In Health.* 2009;25:545-50.

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

-CASOS

Nº do projeto GPPG ou CAAE: 01297512.5.0000.5327

Você está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa intitulado Síndrome metabólica e exposição a risco químico ocupacional. Este estudo foi motivado pela observação que pessoas expostas a produtos químicos no ambiente de trabalho podem apresentar danos ao organismo, especialmente ao fígado, além de possíveis alterações no peso, pressão arterial, glicose (açúcar) e gorduras no sangue. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Medicina Ocupacional do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

O objetivo do estudo é demonstrar se estas alterações estão presentes, e sua possível relação com o ambiente de trabalho. Para isso serão estudados dois grupos, um de pessoas expostas a produtos químicos e outro de pessoas não expostas. Você está sendo convidado a participar do grupo de pessoas **expostas** a produtos químicos.

Se você aceitar participar do estudo, em uma primeira etapa serão realizadas perguntas sobre hábitos de vida (álcool, fumo, drogas, atividade física, presença de doenças e uso de medicações). Em uma segunda etapa serão realizadas medidas de peso, altura, pressão arterial e circunferência abdominal. Em uma terceira etapa serão coletadas amostras de sangue para analisar hepatite B e C, gorduras, glicose (açúcar) e enzimas do fígado. Em uma quarta etapa será realizado o exame de FibroScan (elastografia hepática), para verificar existência de fibrose (cicatriz) no fígado.

O FibroScan é um procedimento não invasivo, sendo realizado como uma ecografia comum. É colocado um gel sobre a pele do abdome e após o aparelho é passado apenas sobre a pele captando as imagens do fígado.

Todas as etapas da pesquisa serão realizadas no mesmo dia, em um período estimado de 60 minutos. Não estão previstos encontros adicionais, caso necessário, você será convidado e receberá explicação sobre a eventual necessidade. Se houver alteração nos exames que indiquem necessidade de tratamento, os participantes serão encaminhados para acompanhamento em Serviço de Gastroenterologia e

Hepatologia do SUS (Sistema Único de Saúde) via central de regulação de consultas, conforme disponibilidade de consultas.

Esta pesquisa trará como benefício direto para os participantes a possibilidade de verificar doenças como diabetes, pressão alta, colesterol alto e hepatite, além de cirrose no fígado (doença caracterizada por uma cicatriz que pode ser visualizada através do exame FibroScan).

Os riscos à saúde são mínimos. Pode haver desconforto psicológico com algumas perguntas do questionário (como sobre o uso de álcool e drogas) ou desconforto físico com a medição da pressão arterial e da circunferência abdominal durante o exame físico. Também poderá acontecer alguma dor leve, inchaço ou mancha escura no local da coleta de sangue. Em relação ao exame FibroScan, não há riscos relacionados ao procedimento, como exposição à radiação ou qualquer risco de lesão aos órgãos internos, no máximo o desconforto do gel e da pressão do aparelho sobre a pele.

A participação nesta pesquisa é voluntária, podendo haver desistência a qualquer momento sem que haja qualquer tipo de prejuízo ao seu vínculo com a instituição empregadora ou em qualquer assistência recebida no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A participação nesta pesquisa não será remunerada e não haverá custos aos participantes.

Os resultados serão divulgados de maneira agrupada e poderão ser publicados com finalidade científica, respeitando a confidencialidade dos dados de identificação pessoal de cada participante e preservando por completo o anonimato.

Toda e qualquer dúvida poderá ser esclarecida antes, durante e depois do curso da pesquisa, através de contato pessoal ou telefônico com o grupo de pesquisa. O grupo de pesquisa poderá ser contatado em horário comercial no Serviço de Medicina Ocupacional do HCPA ou através dos telefones da pesquisadora responsável Dra. Dvora Joveleviths ou com o pesquisador Cristiano Osorio Brauner pelos números 51-33598222 e 33597801. O Comitê de Ética em pesquisa do Hospital de Clínicas também poderá ser consultado para esclarecimento de dúvidas no segundo andar do HCPA (Hospital de Clínicas de Porto Alegre), sala 2227, ou através do telefone 33597640, das 8 às 17hs, de segunda a sexta-feira.

O presente termo constitui-se de duas vias, sendo uma delas entregue ao senhor e outra será mantido pelo grupo de pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____

j

APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

-CONTROLES

Nº do projeto GPPG ou CAAE: 01297512.5.0000.5327

Você está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa intitulado Síndrome metabólica e exposição a risco químico ocupacional. Este estudo foi motivado pela observação que pessoas expostas a produtos químicos no ambiente de trabalho podem apresentar danos ao organismo, especialmente ao fígado, além de possíveis alterações no peso, pressão arterial, glicose (açúcar) e gorduras no sangue. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Medicina Ocupacional do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

O objetivo do estudo é demonstrar se estas alterações estão presentes, e sua possível relação com o ambiente de trabalho. Para isso serão estudados dois grupos, um de pessoas expostas a produtos químicos e outro de pessoas não expostas. Você está sendo convidado a participar do grupo de pessoas **não expostas** a produtos químicos.

Se você aceitar participar do estudo, em uma primeira etapa serão realizadas perguntas sobre hábitos de vida (álcool, fumo, drogas, atividade física, presença de doenças e uso de medicações). Em uma segunda etapa serão realizadas medidas de peso, altura, pressão arterial e circunferência abdominal. Em uma terceira etapa serão coletadas amostras de sangue para analisar hepatite B e C, gorduras, glicose (açúcar) e enzimas do fígado. Em uma quarta etapa será realizado o exame de FibroScan (elastografia hepática), para verificar existência de fibrose (cicatriz) no fígado.

O FibroScan é um procedimento não invasivo, sendo realizado como uma ecografia comum. É colocado um gel sobre a pele do abdome e após o aparelho é passado apenas sobre a pele captando as imagens do fígado.

Todas as etapas da pesquisa serão realizadas no mesmo dia, em um período estimado de 60 minutos. Não estão previstos encontros adicionais, caso necessário, você será convidado e receberá explicação sobre a eventual necessidade. Se houver alteração nos exames que indiquem necessidade de tratamento, os participantes

serão encaminhados para acompanhamento em Serviço de Gastroenterologia e Hepatologia do SUS (Sistema Único de Saúde) via central de regulação de consultas, conforme disponibilidade de consultas.

Esta pesquisa trará como benefício direto para os participantes a possibilidade de verificar doenças como diabetes, pressão alta, colesterol alto e hepatite, além de cirrose no fígado (doença caracterizada por uma cicatriz que pode ser visualizada através do exame FibroScan).

Os riscos à saúde são mínimos. Pode haver desconforto psicológico com algumas perguntas do questionário (como sobre o uso de álcool e drogas) ou desconforto físico com a medição da pressão arterial e da circunferência abdominal durante o exame físico. Também poderá acontecer alguma dor leve, inchaço ou mancha escura no local da coleta de sangue. Em relação ao exame FibroScan, não há riscos relacionados ao procedimento, como exposição à radiação ou qualquer risco de lesão aos órgãos internos, no máximo o desconforto do gel e da pressão do aparelho sobre a pele.

A participação nesta pesquisa é voluntária, podendo haver desistência a qualquer momento sem que haja qualquer tipo de prejuízo ao seu vínculo com a instituição empregatícia ou em qualquer assistência recebida no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A participação nesta pesquisa não será remunerada e não haverá custos aos participantes.

Os resultados serão divulgados de maneira agrupada e poderão ser publicados com finalidade científica, respeitando a confidencialidade dos dados de identificação pessoal de cada participante e preservando por completo o anonimato.

Toda e qualquer dúvida poderá ser esclarecida antes, durante e depois do curso da pesquisa, através de contato pessoal ou telefônico com o grupo de pesquisa. O grupo de pesquisa poderá ser contatado em horário comercial no Serviço de Medicina Ocupacional do HCPA ou através dos telefones da pesquisadora responsável Dra. Dvora Joveleviths ou com o pesquisador Cristiano Osorio Brauner pelos números 51-33598222 e 33597801. O Comitê de Ética em pesquisa do Hospital de Clínicas também poderá ser consultado para esclarecimento de dúvidas no segundo andar do HCPA (Hospital de Clínicas de Porto Alegre), sala 2227, ou através do telefone 33597640, das 8 às 17hs, de segunda a sexta-feira.

O presente termo constitui-se de duas vias, sendo uma delas entregue ao senhor e outra será mantido pelo grupo de pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____

APÊNDICE C – FICHA DE PESQUISA

PACIENTE
SETOR
IDADE(anos)
SEXO
PESO(kg)
ALTURA(metros)
IMC
CIRCUNFERÊNCIA ABDOMINAL(cm)
PAS(mmHg)
PAD(mmHg)
ATIV.FÍSICA
QTIDADE AF
CO-MORBIDADE
MEDICAÇÕES
TABAGISMO
USO DE BEBIDA ALCOÓLICA
QUANTIDADE BEBIDA
HEPATOPATIA
TEMPO EXPOSIÇÃO
SAT.TRANSF.
FIBROSCAN
HBSAG
ANTI-HCV
GLICEMIA
ALT
COLESTEROL
HDL
TRIGLICERÍDEOS
FERRITINA

