



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**Faculdade de Medicina**

**Pós-Graduação em Ciências da Saúde**



**Hospital de Clínicas**

**Av. Pará, 1720 - Campus Umuarama 38400-902**

**Uberlândia MG**

**MARIA LUIZA GONÇALVES DOS REIS MONTEIRO**

**PADRÕES HEMODINÂMICOS HEPÁTICOS NA ESTEATOSE NÃO ALCÓOLICA:  
AVALIAÇÃO PELA ULTRASSONOGRAFIA COM DOPPLER E ESTUDO HISTOLÓGICO**

Uberlândia

2015

PADRÕES HEMODINÂMICOS HEPÁTICOS NA ESTEATOSE NÃO ALCÓOLICA:  
AVALIAÇÃO PELA ULTRASSONOGRAFIA COM DOPPLER E ESTUDO HISTOLÓGICO

Dissertação a ser apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

**Orientadora:** Prof. Dra. Angélica Lemos Debs Diniz

**Pesquisadora:** Maria Luiza Gonçalves dos Reis Monteiro

Uberlândia

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

M775p Monteiro, Maria Luiza Gonçalves dos Reis, 1987-  
2015 Padrões hemodinâmicos hepáticos na esteatose não alcoólica:  
avaliação pela ultrassonografia com doppler e estudo histológico / Maria  
Luiza Gonçalves dos Reis Monteiro. - 2015.  
156 f. : il.

Orientadora: Angélica Lemos Debs Diniz.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.  
Inclui bibliografia.

1. Ciências médicas - Teses. 2. Fígado - Doenças - Teses. 3. Fígado -  
Biopsia - Teses. 4. Doppler, Ultrassonografia - Teses. I. Diniz, Angélica  
Lemos Debs, 1966-. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa  
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

MARIA LUIZA GONÇALVES DOS REIS MONTEIRO

**Padrões hemodinâmicos hepáticos na esteatose não alcóolica:  
avaliação pela ultrassonografia com Doppler e estudo histológico**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

**Área de concentração:** Ciências da Saúde

**Orientadora:** Prof. Dra. Angélica Lemos Debs Diniz

Uberlândia, 25 de fevereiro de 2015.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Angélica Lemos Debs Diniz- UFU

---

Profa. Dra. Marlene Antônia dos Reis- UFTM

---

Prof. Dr. Túlio Augusto Alves Macedo- UFU

UBERLÂNDIA

2015

## AGRADECIMENTOS

À Deus, que guia meus passos e com Sua infinita misericórdia permitiu-me concluir esta tão sonhada etapa.

Aos meus pais, que são meu suporte e incentivo. Obrigada por sonharem comigo e pelo esforço de uma vida inteira em tornar possível a nossa realização pessoal e profissional.

Às minhas irmãs, companheiras queridas que tornam a caminhada mais leve e prazerosa. Obrigada pela compreensão e pela torcida constantes.

Ao Marco, que com amor e dedicação me apoiou em todos os momentos, incentivou a seguir em frente e fez dos meus sonhos os seus.

À D. Marise e Sr. João, pelo apoio, companheirismo e entendimento há tantos anos.

À Profa. Dra. Angélica Lemos Debs Diniz, pela oportunidade de me orientar nesta jornada, com competência ímpar. Por ensinar com atenção e carinho e corrigir com delicadeza. Obrigada por ter sido meu porto seguro nesta trajetória, pelas inúmeras vezes em que me tranquilizou e incentivou, reforçando que era possível. Por ter realizado com empenho todas as ultrassonografias deste estudo. Pelo exemplo de profissional e de vida. Pela amizade que construímos. Pelo trabalho que executamos.

À Dra. Valéria Ferreira de Almeida e Borges, por ter sido precursora deste projeto, estar sempre à disposição para ajudar com gentileza e por ter me incentivado em sua continuação.

À Profa. Dra. Tânia Machado de Alcântara pelo inestimável auxílio no estudo histológico deste trabalho, pela disposição contínua em ajudar, pelos valorosos ensinamentos durante a graduação e a residência médica.

Aos pacientes dos ambulatórios de fígado gorduroso e de cirurgia bariátrica do Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) que despojados de qualquer outro interesse permitiram a realização deste estudo.

Aos voluntários do grupo controle que gentilmente dispensaram seu tempo e boa vontade no intuito de contribuir para o estudo.

À Dra. Conceição de Fátima Pinheiro e toda a equipe de cirurgiões bariátricos e residentes de Cirurgia Geral do HC-UFU que se propuseram a colaborar com a pesquisa no âmbito ambulatorial e no centro cirúrgico.

Aos colaboradores do Serviço de Ultrassonografia do HC-UFU, pela participação essencial.

À Profa. Dra. Ana Cristina Araújo Lemos da Silva, pelo exemplo, incentivo e amizade.

À chefia do Laboratório de Anatomia Patológica do HC-UFU, Dra. Aparecida Helena Baldo Guimarães, que possibilitou os meios e recursos necessários para que a análise histológica fosse realizada.

A todos os profissionais do Laboratório de Anatomia Patológica do HC-UFU que com esmero e prestatividade confeccionaram as lâminas histológicas.

Aos colegas residentes do Serviço de Anatomia Patológica do HC-UFU, em especial os amigos Bruno de Carvalho Dornelas e Patrícia Bernadelle, pelo companheirismo e apoio.

Ao Prof. Dr. Arnaldo Moreira da Silva, pelos ensinamentos durante a residência médica, em especial, em Patologia Hepática, o que despertou meu interesse para esta área.

Aos patologistas colaboradores do Serviço de Anatomia Patológica do HC-UFU Houlétia Barbosa Gomes, Juliana Mota Pereira, Henrique Borges da Silva e João Pablo Ferraz de Abreu pelo aprendizado na convivência diária e pela amizade.

À Profa. Dra. Marlene Antônia dos Reis, por ser a inspiração que aumenta ainda mais em mim o desejo de seguir carreira docente universitária e científica. Pela disposição e ânimo inabalável diante dos percalços do caminho. Pela amizade natural. Por ter aceitado o convite para participar da banca de defesa.

À Profa. Dra. Juliana Reis Machado que tanto tem contribuído para o meu crescimento científico na prática. Obrigada pelas inestimáveis contribuições para a construção deste texto e pela amizade.

À Profa. Dra. Rosana Rosa Miranda Corrêa, pela leitura e interesse em contribuir para este trabalho.

À Dra. Laura Penna Rocha, pelo que me auxiliou no uso do EndNote e pela prestatividade em trocar idéias para melhoria do texto final.

Ao Dr. Marcos Vinícius da Silva pelo incentivo e dedicação à ciência.

À Crislaine Silva e Fernanda Helmo, que auxiliaram na formatação.

Aos professores e amigos da Disciplina de Patologia Geral da Universidade Federal do Triângulo Mineiro pela compreensão, apoio e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique Alves de Rezende que tão gentilmente aceitou o convite para participar da banca de qualificação com valiosas contribuições. Por aceitar o convite também para a banca de defesa. Por ter acompanhado e auxiliado os primeiros passos que me levariam à carreira docente/científica, no grupo PET Medicina UFU. Por fazer parte da minha história.

Ao Prof. Dr. Túlio Augusto Alves Macedo pelas grandes contribuições na banca de qualificação e por ter aceitado o convite para a banca de defesa.

À Profa. Dra. Maria Luíza Mendonça Pereira Jorge, pela disponibilidade e carinho.

Ao Prof. Dr. Lúcio Borges de Araújo pelo auxílio e prestatividade na análise estatística deste estudo.

Aos professores das disciplinas do Mestrado, pela competência e seriedade em transmitir os ensinamentos.

Aos colegas do Mestrado da Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PGCS) da UFU pelas experiências e aprendizados inesquecíveis deste período.

Às secretárias da PGCS da UFU, Gisele de Melo Rodrigues e Viviane Gonçalves pela prestatividade e gentileza.

Aos colaboradores das bibliotecas da UFU.

Aos colaboradores do Ambulatório Central “Amélio Marques” pela disposição em ajudar.

Aos amigos sinceros, de alma, que são apoio e alegria para a caminhada da vida.

À toda a instituição Universidade Federal de Uberlândia, por ter aberto as portas para o meu desenvolvimento profissional na graduação, residência médica e agora, no

Mestrado. Por ter sido o cenário de tantos momentos produtivos, de relacionamentos essenciais para a minha vida e de recordações preciosas.

**Agradecimentos especiais**

*Aos meus pais Carlos e Dalma,  
Às minhas irmãs Fabiana e Letícia,  
Ao meu companheiro Marco,  
À minha orientadora, Profa. Dra. Angélica.*

*“Cada dia que amanhece assemelha-se a uma página em branco, na qual gravamos os nossos pensamentos, ações e atitudes. Na essência, cada dia é a preparação de nosso próprio amanhã.”*

*Francisco Cândido Xavier*

## RESUMO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é prevalente e frequentemente diagnosticada à ultrassonografia (US). A gradação da esteatose pela US bidimensional é subjetiva e sujeita à variabilidade inter e intra-observador. A biópsia hepática é o método diagnóstico padrão, havendo, porém, controvérsias sobre sua indicação. É necessária, para a prática clínica, a quantificação não invasiva, objetiva e reprodutível da esteatose. O objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho dos índices do Doppler hepático dos três principais vasos no diagnóstico e gradação da esteatose, comparando-se com análise histológica.

US com Doppler foi realizada em 98 voluntários, entre os quais 49, com DHGNA, foram submetidos à biópsia. Os demais 49, sem esteatose à US e sem fatores risco para DHGNA foram incluídos como controles e não submetidos à biópsia por motivos éticos. O índice de pulsatilidade venosa portal (IVP) foi calculado subtraindo-se o pico mínimo de velocidade portal do pico máximo e dividindo-se pelo pico máximo. A onda de velocidade de fluxo (OVF) da veia hepática direita foi classificada em monofásica, bifásica e trifásica. O índice de resistividade (IR) da artéria hepática foi calculado subtraindo-se a velocidade diastólica final do pico de velocidade sistólica e dividindo-se pelo pico de velocidade sistólica. O índice de pulsatilidade (IP) da artéria hepática foi calculado subtraindo-se a velocidade diastólica final do pico de velocidade sistólica e dividindo-se pela velocidade média. Os espécimes obtidos por biópsia hepática por agulha foram classificados em esteatose discreta (até 33% dos hepatócitos infiltrados por gordura), moderada (de 33 a 66%) e acentuada (mais de 66%). A fibrose e a inflamação foram classificadas segundo sua intensidade e localização no ácino hepático.

O IVP apresentou correlação inversa e significativa com a presença de esteatose à biópsia ( $r = -0,69$ ;  $p < 0,0001$ ). A distribuição do padrão da OVF da veia hepática direita foi predominantemente trifásico nos controles e no subgrupo com esteatose discreta enquanto o padrão monofásico foi mais frequente na esteatose moderada e acentuada. IR e IP da artéria hepática não distinguiram grupo controle do grupo com esteatose. Nenhum dos índices correlacionou-se significativamente com a gradação da esteatose.

As alterações hemodinâmicas das veias porta e hepática permitem o diagnóstico não invasivo da esteatose. Para melhorar a capacidade diagnóstica obteve-se uma função discriminante com estes dois parâmetros, que aumentou especificidade, sensibilidade e acurácia do Doppler para o diagnóstico de esteatose, com uma análise de simples realização e passível de aplicabilidade clínica.

Os parâmetros hemodinâmicos estudados mostraram limitações para diagnóstico de inflamação, fibrose e para a gradação da esteatose.

**Palavras-chave:** *Esteatose hepática não alcoólica. Ultrassonografia. Doppler. Biópsia hepática.*

## ABSTRACT

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a prevalent condition and frequently diagnosed in ultrasonography (US). Bidimensional ultrasonography steatosis grading is subjective and subject to interobserver and intraobserver variability. Hepatic biopsy is the standard diagnostic method, but its indication has some controversies. For clinical practice, noninvasive, objective and reproducible steatosis quantification is necessary. The aim of this study is to assess the performance of Doppler US indices of the three major hepatic vessels in steatosis diagnosis and grading, having histological study as reference.

Doppler US was performed in 98 volunteers, including 49, with NAFLD who were submitted to liver biopsy. The other 49, without steatosis in US and without risk factors for NAFLD, were included as the healthy group and were not submitted to biopsy due to ethical reasons. Portal venous pulsatility index (PVI) was calculated by subtracting the minimal peak of portal velocity from the maximum peak and dividing the result by the maximum peak. Right hepatic vein waveform pattern (HVWP) was classified as monophasic, biphasic or triphasic. Hepatic artery resistance index (HARI) was calculated by subtracting end diastolic velocity from systolic peak velocity and dividing the result by systolic peak velocity. Hepatic artery pulsatility index (HAPI) was calculated subtracting end diastolic velocity from systolic peak velocity and dividing the result by mean velocity. Hepatic biopsy specimens were classified in mild steatosis (less than 33% of fatty hepatocytes), moderate (33 to 66%) and severe (more than 66%). Inflammation and fibrosis were classified according to intensity and localization in hepatic acini.

PVI had inverse and significant correlation with steatosis presence in biopsy ( $r = -0.69$ ;  $p < 0.0001$ ). PVI media and standard deviation in healthy group was  $0.35 \pm 0.08$  and in steatosis group was  $0.21 \pm 0.10$  ( $p < 0.0001$ ). HVWP was predominantly triphasic in healthy group and in mild steatosis subgroup while monophasic pattern was the most frequent in moderate and severe steatosis. HARI and HAPI did not distinguish healthy from steatosis group. None of the indices significantly correlated with steatosis grading.

Hemodynamic changes in portal and hepatic veins allow noninvasive steatosis diagnoses. In order to improve diagnostic capacity, a discriminant function was obtained using these two parameters, resulting in improvement of Doppler specificity, sensibility and accuracy for steatosis diagnostic. This is a simple and clinical applicable analysis.

Doppler indices have limitations in quantifying steatosis as in diagnosing inflammation and fibrosis.

**KEY WORDS:** Nonalcoholic hepatic steatosis. Doppler ultrasonography. Liver biopsy.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Biópsia hepática analisada em grande aumento (40X) à esquerda e em pequeno aumento (4X) à direita, corada por Hematoxilina-Eosina, mostrando esteatose discreta (esquerda) e acentuada (direita).....13
- Figura 2-** Fluxograma da inclusão de sujeitos da pesquisa.....29
- Figura 3–** A- Doppler espectral portal com padrão normal de pulsatilidade da veia porta (índice de pulsatilidade venosa portal de 0,56). B- Baixa pulsatilidade (índice de pulsatilidade venosa portal de 0,18).....34
- Figura 4–** A- Doppler espectral da veia hepática direita com padrão trifásico. B- Padrão bifásico. C- Padrão monofásico.....35/36
- Figura 5–** Doppler espectral da artéria hepática com padrão normal de pulsatilidade e IR de 0,87.....38
- Figura 6–** Gráfico *box-plot* do índice de massa corporal (IMC) de acordo com o grau de esteatose à histologia. A linha horizontal dividindo cada *box* representa a mediana. (Coeficiente de correlação de Spearman;  $p < 0,0001$ ) .....44
- Figura 7-** Biópsia hepática analisada em grande aumento (40X obj.), corada por Hematoxilina-Eosina, mostrando inclusões nucleares de glicogênio (setas) e alguns hepatócitos esteatóticos (cabeças de setas).....47
- Figura 8-** Biópsia hepática analisada em grande aumento (40X obj.), corada por Hematoxilina-Eosina, mostrando foco de inflamação lobular (seta) e hepatócitos balonizados contendo corpúsculos de Mallory no citoplasma (cabeça de setas).....48

**Figura 9**– Gráfico *box-plot* do índice de pulsatilidade venosa portal (IVP) de acordo com o grau de esteatose na histologia. Os limites superior e inferior de cada *box* representam o quartil superior e inferior, enquanto a linha horizontal, dividindo cada *box*, a mediana. As barras horizontais representam o percentil 25 e o percentil 75. As chaves de associação expressam a diferença estatística entre os grupos controle e com esteatose. Os valores especificados se referem aos *outliers* (teste de Kruskal-Wallis com pós- teste de Dunn; \* $p < 0,05$ ).....51

**Figura 10**- Gráfico da curva *receiver operating characteristic* (ROC) da sensibilidade plotada contra 1- especificidade do índice de pulsatilidade venosa portal (IVP) para diagnóstico da esteatose à biópsia.....54

**Figura 11** – Gráfico *box-plot* do índice de resistividade (IR) de acordo com o grau de esteatose à histologia. A linha horizontal dividindo cada *box* representa a média. Os valores descritos referem-se aos *outliers* (teste t de Student;  $p > 0,05$ ).....58

**Figura 12** – Curva ROC para a sensibilidade plotada contra 1- especificidade da variável IR.....59

**Figura 13** – Gráfico *box-plot* do índice de pulsatilidade (IP) de acordo com o grau de esteatose à histologia. A linha horizontal dividindo cada *box* representa a média. Os valores descritos referem-se aos *outliers*. (teste de Kruskal-Wallis;  $p = 0,70$ ).....61

**Figura 14** – Curva ROC para a sensibilidade plotada contra 1- especificidade da variável IP.....62

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1-</b> Valores do índice de pulsatilidade venosa portal expressos como média, desvio padrão, intervalo de confiança (IC), mediana e valores mínimo e máximo para cada grupo.....                      | 52 |
| <b>Tabela 2-</b> Correlação de Spearman do grau de esteatose, inflamação e fibrose com o índice de pulsatilidade venosa portal (IVP).....   | 53 |
| <b>Tabela 3-</b> Distribuição do padrão de fluxo da veia hepática direita ao Doppler, nos grupos controle e com esteatose à biópsia, expressas em frequências absoluta e percentual.....                        | 56 |
| <b>Tabela 4-</b> Índice de resistividade da artéria hepática, expressa em média, desvio padrão, intervalo de confiança (IC), mediana e valores mínimo e máximo de acordo com o grau de esteatose à biópsia..... | 57 |
| <b>Tabela 5-</b> Índice de pulsatilidade da artéria hepática, expressa em média, desvio padrão, intervalo de confiança (IC), mediana e valores mínimo e máximo de acordo com o grau de esteatose à biópsia..... | 60 |
| <b>Tabela 6-</b> Resumo do desempenho da função discriminante linear do IVP e padrão de OVf da veia hepática para diagnóstico de esteatose hepática de acordo com o diagnóstico histológico.....                | 64 |

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**AASLD**- *American Association for Study of Liver Diseases*

**ALT**- Alanina aminotransferase

**AST**- Aspartato aminotransferase

**cm**- centímetros

**CRN**- *Clinical Research Network*

**DHA** - Doença hepática alcoólica

**DHGNA** – Doença hepática gordurosa não alcoólica

**DM 2** – Diabetes *mellitus* tipo 2

**EDV**- *End diastolic velocity*

**EENA** – esteatohepatite não alcoólica

**g**- gramas

**g/dl**- gramas/decilitro

**GGT**- gama glutamil transferase

**HC-UFU** – Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia

**HDL** – *High density lipoprotein*

**HIV**- *human immunodeficiency vírus*

**Hz**- hertz

**IC** – *Intervalo de confiança*

**IMC** – Índice de massa corporal

**IP**- Índice de pulsatilidade

**IR**- Índice de resistividade

**IST**- Índice de saturação de transferrina

**IVP** – Índice de pulsatilidade venosa portal

**Kg/m<sup>2</sup>**- quilogramas/metro quadrado

**kHz**- quilo-hertz

**mg/dl**- miligramas/decilitro

**MHz**- mega-hertz

**mmHg**- milímetros de mercúrio

**mm**- milímetros

**MnV**- *Mean velocity*

**n**- número de sujeitos

**NAFLD**- *nonalcoholic fatty liver disease*

**NAS**- *NAFLD activity score*

**NCEP/ATPIII**— *National Cholesterol Education Program/ Adult Treatment Panel III*

**Ng/ml**- nanogramas/mililitros

**OVF** - Onda de velocidade do fluxo

**p**- p valor (estatística)

**PAS**- Periodic acid-Schiff

**SAS**- *Statistical Analysis System*

**SPSS**- *Statistical Package for the Social Sciences*

**r**- coeficiente de correlação

**RM**- ressonância magnética

**ROC**- *receiver operating characteristic*

**TC**- *Tomografia computadorizada*

**UFU** – Universidade Federal de Uberlândia

**US** – Ultrassonografia

**Vmin**- Velocidade mínima

**Vmáx**- Velocidade máxima

**SUMÁRIO**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1- INTRODUÇÃO.....</b>                                  | <b>1</b>  |
| 1.1- Conceito e epidemiologia.....                         | 1         |
| 1.2- Espectro de apresentação da DHGNA.....                | 3         |
| 1.3- DHGNA e sua relação com a Síndrome Metabólica.....    | 5         |
| 1.4- Óbito nos pacientes com DHGNA.....                    | 6         |
| 1.5- Diagnóstico.....                                      | 6         |
| 1.5.1- Biópsia hepática.....                               | 7         |
| 1.5.1.1- Vantagens da biópsia.....                         | 7         |
| 1.5.1.2- Desvantagens da biópsia.....                      | 9         |
| 1.5.1.3- Histologia da DHGNA em adultos.....               | 12        |
| 1.5.1.4- Gradação e estadiamento histológico da DHGNA..... | 15        |
| 1.5.1.5- Biópsia hepática e a cirurgia bariátrica.....     | 17        |
| 1.5.2- Exames de imagem.....                               | 17        |
| 1.5.2.1- Ultrassonografia.....                             | 18        |
| <b>2- JUSTIFICATIVA.....</b>                               | <b>22</b> |
| <b>3- HIPÓTESE.....</b>                                    | <b>24</b> |
| <b>4- OBJETIVOS.....</b>                                   | <b>25</b> |
| 4.1- Geral.....  | 25        |
| 4.2- Específicos.....                                      | 25        |
| <b>5- CASUÍSTICA E MÉTODOS.....</b>                        | <b>26</b> |
| 5.1- Considerações Éticas.....                             | 26        |
| 5.2- Casuística.....                                       | 26        |
| 5.3- Critérios de inclusão.....                            | 28        |
| 5.4- Critérios de exclusão.....                            | 28        |
| 5.5- Métodos.....  | 29        |

|   |           |
|---|-----------|
| 5.5.1- Desenho do estudo.....   | 29        |
| 5.5.2- Avaliação clínica.....   | 30        |
| 5.5.3- Avaliação laboratorial.....  | 32        |
| 5.5.4- Avaliação ecográfica e pelo método Doppler.....  | 32        |
| 5.5.4.1- Avaliação do índice de pulsatilidade da veia porta.....                                    | 33        |
| 5.5.4.2- Avaliação do padrão de fluxo da veia hepática direita.....                                 | 35        |
| 5.5.4.3- Avaliação do índice de resistividade e do índice de pulsatilidade da artéria hepática..... | 37        |
| 5.5.5- Avaliação histológica.....   | 39        |
| 5.5.5.1- Caracterização do perfil histopatológico hepático.....                                     | 39        |
| 5.5.5.2- Variáveis histopatológicas.....  | 40        |
| 5.5.6- Análise discriminante linear para diagnóstico de esteatose.....                              | 41        |
| 5.5.7- Análise estatística.....   | 41        |
| <b>6- RESULTADOS.....</b>   | <b>42</b> |
| 6.1- Características clínico-laboratoriais dos grupos com esteatose e controle.....                 | 42        |
| 6.2- Avaliação histológica.....   | 46        |
| 6.3- Avaliação ultrassonográfica.....   | 50        |
| 6.3.1- Ultrassonografia bidimensional.....  | 50        |
| 6.3.2- Ultrassonografia com Doppler.....  | 51        |
| 6.3.2.1- Doppler da veia porta- Índice de pulsatilidade venosa portal.....                          | 51        |
| 6.3.2.2- Doppler da veia hepática.....  | 55        |
| 6.3.2.3- Índice de resistividade da artéria hepática.....   | 57        |
| 6.3.2.4- Índice de pulsatilidade da artéria hepática.....   | 60        |
| 6.4- Técnica multivariada de análise discriminante linear para diagnóstico de esteatose.....        | 63        |
| <b>7- DISCUSSÃO.....</b>  | <b>65</b> |

|                            |           |
|----------------------------|-----------|
| <b>8- CONCLUSÃO.....</b>   | <b>77</b> |
| <b>9- REFERÊNCIAS.....</b> | <b>78</b> |

## 1- INTRODUÇÃO

---

### 1.1- Conceito e Epidemiologia

A Doença Hepática Gordurosa Não-Alcólica (DHGNA) é caracterizada por um contínuo de lesões hepáticas que inclui esteatose e esteatohepatite não-alcólica (EENA) na ausência de ingestão alcólica representativa (Hebbard e George, 2011), devido à desregulação do metabolismo de lipídeos e glicose, que resulta em estresse oxidativo e lesão hepática (Triverdi e Rinella, 2014).

Recomendações recentes definem o limite de ingestão alcólica como 20g/d para homens (140g/semana) e 10g/d para mulheres (70g/semana) (Farrell e Larter, 2006; Farrell *et al.*, 2007). Ingestões de bebidas alcólicas superiores a estes limites poderiam ser responsáveis pela DHGNA.

A DHGNA foi descrita em 1980 em um grupo de 20 mulheres obesas e diabéticas, com achados histológicos semelhantes aos da doença hepática alcoólica (DHA), porém sem história de ingestão significativa de bebidas alcólicas (Ludwig *et al.*, 1980).

Para o diagnóstico de DHGNA é necessário excluir-se outras causas de esteatose hepática além do uso de álcool, como infecção pelo genótipo 3 do vírus da hepatite C e HIV; cirurgia de *bypass* intestinal; uso de medicamentos tais como prednisona, amiodarona, tamoxifeno, metotrexate; toxinas; nutrição parenteral total e caquexia (Leite *et al.*, 2014).

Na atualidade, a DHGNA representa a doença hepática crônica mais comum no mundo ocidental (Clark, 2006; Younossi *et al.*, 2011), com prevalência de 10-30% nesta população (Takuma e Nouse, 2010).

A DHGNA é considerada a manifestação hepática da síndrome metabólica (Hamaguchi *et al.*, 2005) e correlaciona-se com resistência a insulina, obesidade visceral e hipertensão arterial sistêmica. Devido a esta forte associação com a síndrome metabólica, as perspectivas são de aumento ainda maior da prevalência devido à epidemia de obesidade (Chen *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2010). Em pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) ou obesos, a prevalência de esteatose hepática varia entre 50-90% (Lemoine e Serfaty, 2012).

Dados sobre a prevalência da DHGNA no Brasil são escassos. Um levantamento ultrassonográfico realizado em 217 mulheres obesas no nordeste brasileiro mostrou prevalência de 41,5% (Araújo, 1998) . No Sudeste, a prevalência da doença em 1804 ultrassonografias abdominais foi de 19,2% (Parise *et al.*, 2003)

Já a prevalência da EENA é pouco conhecida, pois ainda depende de diagnóstico histológico, o que é impraticável em todos os portadores de DHGNA. Um estudo recente que realizou ultrassonografia e biópsia hepática, mostrou prevalência de DHGNA de 46% e destes indivíduos, 30% eram portadores de EENA, com prevalência geral de EENA de 12% (Williams *et al.*, 2011).

## 1.2- Espectro de apresentação da DHGNA

A DHGNA engloba esteatose, inflamação lobular e balonização, com graus variáveis de fibrose, que classicamente se inicia ao redor da veia centrolobular (Leite *et al.*, 2014) e pode culminar no desenvolvimento de cirrose.

A fibrose é o principal componente da doença hepática crônica que se relaciona com a gravidade e prognóstico do quadro, independente da etiologia de base (Kim, Jeong e Baik, 2014). Cirrose é definida histologicamente como fibrose com formação de nódulos regenerativos no parênquima hepático (Kim, Jeong e Baik, 2014). Entre todos os pacientes com alguma forma de fígado gorduroso, 3-5% vão desenvolver cirrose (Farrell e Larter, 2006). Dentre estes, os pacientes portadores de esteatose simples desenvolvem fibrose em 1% a 4 % dos casos; no entanto a EENA leva à cirrose em 15-25% dos casos (Rafiq *et al.*, 2009; Ekstedt *et al.*, 2006; Musso *et al.*, 2011). Cirrose foi demonstrada em 20% dos pacientes com EENA comprovada histologicamente, o que corrobora esta estatística (McCullough, 2006).

Etilismo e hepatites virais ainda são as principais causas mundiais de cirrose hepática, mas com o aumento da prevalência de EENA, esta é hoje uma das principais causas de cirrose (Gerstenmaier e Gibson, 2014). Atualmente, a cirrose decorrente da EENA é a terceira causa de transplante hepático nos EUA, atrás da hepatite C e doença hepática alcóolica; no entanto é a única causa de transplante fígado-relacionada que continua a aumentar (Charlton *et al.*, 2011). A previsão é que próximo a 2020, a DHGNA seja a principal causa de transplante ortotópico de fígado naquele país (Charlton, 2004).

Na chamada cirrose criptogenética, aquela em que não é mais possível definir a causa devido ao estágio terminal do fígado, 70% dos pacientes são obesos e/ou diabéticos, o que sugere EENA como uma etiologia provável (Caldwell e Crespo, 2004).

O carcinoma hepatocelular é uma das possíveis complicações da DHGNA (Cohen, Horton e Hobbs, 2011) e pode ocorrer no estágio de cirrose ou mesmo antes desta (Lemoine e Serfaty, 2012), como mostrou um estudo em que 116 casos de hepatocarcinoma ocorreram no estágio pré-cirrótico de DHGNA ou em doentes sem nenhum grau de fibrose (Baffy, Brunt e Caldwell, 2012).

É comum o conceito de que a esteatose simples teria poucas implicações clínicas, porém alguns dados apontam o contrário. Em pacientes com hepatite C, que é a doença hepática crônica mais comumente diagnosticada juntamente com a EENA (em 5-10% dos casos) (Brunt *et al.*, 2003; Ong *et al.*, 2001; Sanyal *et al.*, 2003; Bedossa *et al.*, 2007), a esteatose reduz as possibilidades de uma resposta virológica sustentada (Poynard *et al.*, 2003) e acelera a progressão da doença (Moucari *et al.*, 2008; Conjeevaram *et al.*, 2007). Em pacientes no período pós-operatório de ressecção hepática, a esteatose aumenta o risco de complicações e morte (De Meijer *et al.*, 2010). Nos fígados transplantados, o grau da esteatose macrovesicular está diretamente relacionado com a disfunção pós-transplante (Lee *et al.*, 2013) que pode atingir até 80% dos casos de enxertos com esteatose acentuada (Markin *et al.*, 1993). Dessa forma, o diagnóstico de esteatose é um fator importante na seleção de doadores.

### 1.3- DHGNA e sua relação com a Síndrome Metabólica

Na presença de obesidade e síndrome metabólica sem outros fatores que gerem alterações da função hepática, o diagnóstico de DHGNA/EENA deve ser considerado mesmo que exames de imagem não evidenciem gordura hepática (Sumida, Nakajima e Itoh, 2014).

Estudos prospectivos evidenciam a diabetes como fator de risco independente para a progressão da DHGNA, para a mortalidade relacionada ao fígado e para o surgimento de carcinoma hepatocelular (Porepa *et al.*, 2010). A relação entre estas duas doenças parece ser ainda mais intensa, uma vez que a presença de DHGNA pode prever o surgimento de diabetes mellitus tipo 2 (Willner *et al.*, 2001; Musso *et al.*, 2011).

Foi sugerido que a biópsia hepática deve ser realizada em todos os pacientes portadores de diabetes mellitus e com evidências de esteatose na ultrassonografia (Leite *et al.*, 2011)

Evidências crescentes mostram que a EENA é um fator de risco independente para doença cardiovascular (Triverdi e Rinella, 2014). A EENA comprovada histologicamente tem correlação positiva com o aumento da espessura íntima-média das carótidas aferida pela ultrassonografia, independente da síndrome metabólica e dos outros fatores de risco cardiovasculares clássicos (Targher *et al.*, 2006) como idade, hipertensão, dislipidemia, diabetes e tabagismo. Além disso, a DHGNA relaciona-se também com um aumento do escore de cálcio na artéria coronária aferida por tomografia, independente dos outros fatores de risco cardiovasculares clássicos (Santos *et al.*, 2007; Jung *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012; Sung *et al.*, 2012). Há evidências de que a DHGNA contribui para o remodelamento cardíaco, com aumento da espessura

ventricular na sístole e na diástole e diminuição do encurtamento longitudinal (Hallsworth *et al.*, 2013).

#### **1.4- Óbito nos pacientes com DHGNA**

As doenças cardiovasculares, especialmente a doença coronariana e a cerebrovascular, são as causas primárias de óbito mais comuns em pacientes com EENA (Ekstedt *et al.*, 2006), seguido de neoplasias malignas e, em terceiro lugar, complicações diretas da doença hepática (Ong, Pitts e Younossi, 2008).

Assim, a doença hepática é a terceira causa de óbito nos pacientes portadores de DHGNA (Adams *et al.*, 2005; Ekstedt *et al.*, 2006), sendo o hepatocarcinoma a causa mais frequente de morte relacionada ao fígado (Hashimoto *et al.*, 2009).

#### **1.5- Diagnóstico**

De acordo com as recomendações recentes da Associação Americana para o Estudo das Doenças Hepáticas (AASLD), o diagnóstico de DHGNA deve ser feito quando há os quatro critérios seguintes: (1) esteatose hepática histologicamente ou em exames de imagem; (2) ingestão alcóolica inexpressiva; (3) ausência de outros fatores que gerem esteatose hepática e (4) nenhum fator concomitante que gere doença hepática crônica (Chalasani *et al.*, 2012).

A DHGNA é uma afecção subdiagnosticada, pois na maioria das vezes tem curso clínico assintomático (Hernaez *et al.*, 2011). Quando apresenta sinais e sintomas, os mais comuns são dor no quadrante superior direito do abdome, fadiga e lesões dermatológicas do tipo acantose *nigricans* (mais comuns na população pediátrica) (Leite *et al.*, 2014).

Usualmente, a suspeita da doença baseia-se no achado ultrassonográfico de hiperecogenicidade hepática ou em um discreto a moderado aumento das enzimas hepáticas (Bar\_Sic' *et al.*, 2012). Níveis normais de transaminases dificultam o diagnóstico de esteatohepatite (Ratziu *et al.*, 2012).

A ultrassonografia é o atual método de escolha para o rastreamento da DHGNA, no entanto, para o diagnóstico definitivo e estadiamento, a biópsia hepática mantém-se até os dias atuais como o exame padrão-ouro (Leite *et al.*, 2014).

### **1.5.1- Biópsia hepática**

#### **1.5.1.1-Vantagens da biópsia**

Uma das grandes vantagens da biópsia é confirmar o diagnóstico e avaliar de forma semi-quantitativa a atividade necroinflamatória e estimar a fibrose com remodelamento arquitetural.

Apenas a biópsia hepática é capaz de diferenciar esteatose simples de EENA; que deve ser diagnosticada quando três critérios estiverem presentes: esteatose

macrofotocitular, infiltração de células inflamatórias e balonização hepatocitária (Sumida, Nakajima e Itoh, 2014).

Os testes não invasivos, até o momento, tem sido eficazes apenas para a detecção de graus extremos de inflamação ou fibrose (Wieckowska, Mccullough e Feldstein, 2007).

A biópsia é o método considerado padrão-ouro no diagnóstico da gravidade da fibrose hepática. Alguns marcadores séricos e exames de imagem podem sugerir a gravidade da fibrose, mas nenhum desses é capaz de substituí-la (Suzuki *et al.*, 2006).

Para melhor utilidade clínica e predição de prognóstico, o estadiamento histológico da fibrose utiliza subclassificações (Kim, Jeong e Baik, 2014) e, devido a este maior detalhamento da classificação histológica, tem sido cada vez mais difícil que uma técnica não invasiva seja capaz de substituir a biópsia hepática (Ishak *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2011).

Inclusive, a acurada estimativa do grau de fibrose torna-se ainda mais importante tendo em vista que o excesso de tecido fibroso da cirrose pode regredir com o tempo e tratamento otimizado (Kim, Jeong e Baik, 2014).

Além disso, somente a avaliação anatomopatológica pode avaliar com precisão a resposta ao tratamento (Cotrim, 2006).

*Guidelines* recentes da AASLD recomendam que a biópsia hepática seja feita em casos de complicações da síndrome metabólica, altos níveis séricos de ferritina em pacientes com EENA e também naqueles suspeitos de serem portadores de fibrose avançada (Chalasani *et al.*, 2012).

### 1.5.1.2- Desvantagens da biópsia

As desvantagens do uso da biópsia hepática para avaliação da DHGNA são várias, dentre elas cita-se a invasividade, erro de amostragem e variabilidade intra e interobservador na análise histológica.

Quanto à invasividade, o procedimento contém riscos inerentes como dor leve e autolimitada após o procedimento, que ocorre em até 30% dos pacientes (Poynard, Ratziu e Bedossa, 2000). Em geral este sintoma é bem tolerado e localiza-se principalmente no local da punção e no ombro direito. Dor intensa pode ocorrer em 1,5 a 3,0% (Eisenberg *et al.*, 2003). O risco de hemorragia subclínica é de 0,35 a 1,6% e o risco de punção de órgãos adjacentes é de 0,01 a 0,1% (Terjung *et al.*, 2003). A taxa de mortalidade é de 0,01% (Poynard, Ratziu e Bedossa, 2000) nos estudos que incluíram pacientes com neoplasias e insuficiência hepática com distúrbios da coagulação. Infere-se que, em pacientes sem estas comorbidades, esta taxa seja menor.

Tais riscos são minimizados quando a biópsia hepática é realizada sob visualização ultrassonográfica (Terjung *et al.*, 2003) ou direta do órgão, durante procedimentos cirúrgicos. Além disso, deve-se considerar o treinamento e a experiência do operador da biópsia (Friedman, 2004).

Assim, a biópsia hepática não se constitui ferramenta de rastreamento populacional como seria o desejado para uma doença com alta prevalência, pois além dos riscos, tem alto custo e não consiste em uma avaliação dinâmica que permita reavaliações periódicas após instituição do tratamento.

A biópsia hepática possui potencial erro de amostragem: mesmo uma biópsia adequada, representa apenas 1/50.000- 1/65.000 do fígado e, para ter qualidade, é necessário a utilização de agulha de tamanho apropriado, escolha cuidadosa da área a ser amostrada e primoroso processamento histológico (Brunt e Tiniakos, 2010).

Possivelmente há diferenças entre a amostragem obtida do lobo esquerdo e do direito e no que se refere à profundidade do espécime no parênquima. Os espécimes obtidos das regiões subcapsulares mostrarão maior quantidade de tecido fibroso (Kim, Jeong e Baik, 2014) do que aqueles localizados mais profundamente no parênquima (Brunt e Tiniakos, 2010). O lobo esquerdo é menor, com maior área recoberta por cápsula e deve ser evitado como sítio para a coleta do material.

O tamanho da amostra também se correlaciona com a acurácia da avaliação histológica na DHGNA. Biópsias maiores que 1,5 cm de comprimento tiveram maior proporção de diagnósticos definitivos para esteatohepatite (56%) do que aquelas menores que 1,0 cm (29%) (Vuppalanchi *et al.*, 2009). A espessura do fragmento também é importante, uma vez que a avaliação da arquitetura em uma amostra muito fina é dificultada (Colloredo *et al.*, 2003). O número ideal de espaços porta na amostra deve ser de seis a oito (Bravo, Sheth e Chopra, 2001).

Devido a erros de amostragem, a cirrose pode ser subdiagnosticada em 14,5% dos casos, como mostrado em um estudo com pacientes portadores de hepatite C (Regev *et al.*, 2002). Por vezes não é possível realizar o diagnóstico histológico de cirrose na biópsia hepática se os nódulos parenquimatosos forem grandes ou incompletos (Kim, Jeong e Baik, 2014).

O erro de amostragem pode ser reduzido se forem utilizadas agulhas com maior gauge (Larson *et al.*, 2007), se os fragmentos obtidos forem maiores que 1,5 cm [Brunt, 2008] e, se possível, mais de um fragmento tecidual (Vuppalanchi *et al.*, 2009).

Além disso, a avaliação histológica está sujeita a variabilidade intra e inter-observador entre os patologistas (Marsman *et al.*, 2004), uma vez que a experiência do profissional e o número de leituras influenciam nos achados (Vuppalanchi *et al.*, 2009). A concordância quanto à extensão da esteatose (Lee *et al.*, 2013), fibrose perisinusoidal e o estadiamento da fibrose é satisfatória; no entanto, a inflamação lobular é a característica que gera maior discrepância entre patologistas (Kleiner *et al.*, 2005; Younossi *et al.*, 1998; Fukusato *et al.*, 2005). A concordância intraobservador é maior do que a interobservador (Kleiner *et al.*, 2005).

Todas estas desvantagens justificam a busca por exames laboratoriais e de imagem que possam prever a presença de esteatohepatite, fibrose e/ou inflamação (Wieckowska, Mccullough e Feldstein, 2007; Ratziu *et al.*, 2005).

Atualmente tem havido uma crescente busca por métodos de diagnóstico com acurácia próxima à biópsia e que possam, ao menos parcialmente e em alguns casos, substituí-la. Esta busca tem sido estimulada pelos avanços diagnósticos das técnicas laboratoriais e de imagem.

Apesar disso, na atualidade, a biópsia hepática continua sendo o parâmetro confirmatório final para a correlação com os testes não invasivos (Brunt e Tiniakos, 2010).

### 1.5.1.3- Histologia da DHGNA em adultos

Histologicamente, a DHGNA é caracterizada pela esteatose, que consiste no acúmulo de triglicérides no citoplasma dos hepatócitos, até que representem mais de 5% do peso total do órgão (Rouvinen-Watt *et al.*, 2014), independente da localização destes hepatócitos no lóbulo hepático. A esteatose é um fenômeno degenerativo, ou seja, de caráter reversível.

O espectro histológico da DHGNA em adultos compreende variados graus de esteatose macrovacuolar de pequenas ou grandes gotas e a EENA, que além da esteatose é caracterizada por inflamação e dano celular (na forma de balonização, apoptose ou necrose lítica) (Brunt e Tiniakos, 2010). Raramente pode ser vista esteatose microvacuolar juntamente com a forma macrovacuolar, mas quando presente isoladamente pode corresponder a esteatose induzida por algumas medicações, esteatose na gestação ou síndrome de Reye (Vilgrain *et al.*, 2013).

A extensão da esteatose é avaliada por meio da divisão do parênquima em terços e da análise da porcentagem de envolvimento por hepatócitos esteatóticos (Figura 1): 0-33% discreta, 33-66% moderada e > 66% acentuada (Brunt *et al.*, 1999; Kleiner *et al.*, 2005). Normalmente em adultos, a esteatose inicia-se na zona 3 do ácino hepático (perivenular) (Brunt e Tiniakos, 2010).

Núcleos glicogenados apresentam-se vacuolados, geralmente estão localizados nos hepatócitos periportais e quando presentes em quadros de esteatohepatite favorecem a etiologia não-alcóolica (Pinto *et al.*, 1996).

A inflamação lobular é geralmente leve e consiste em infiltrado inflamatório misto com linfócitos, neutrófilos e eosinófilos (Brunt e Tiniakos, 2010). Podem ser vistos microgranulomas (agregados de células de Kupffer) e lipogranulomas (Hübscher, 2006; Brunt, 2005).

A presença de mononucleares nos espaços-porta é comum, geralmente discreta e proporcional às lesões acinares (Brunt e Tiniakos, 2010). O aumento da inflamação portal parece correlacionar-se com a gravidade da doença, com o desenvolvimento de fibrose (Brunt *et al.*, 2009) e com o diagnóstico de esteatohepatite (Kang *et al.*, 2006).

A maioria dos pacientes biopsiados tem algum grau de fibrose (Goodman, 2014). A fibrose classicamente inicia-se na zona 3 ao longo dos sinusóides e ao redor dos hepatócitos (Brunt e Tiniakos, 2010), devido a ativação das células estreladas (Washington *et al.*, 2000; Cortez-Pinto *et al.*, 2001). No entanto, em pacientes obesos mórbidos pode ocorrer nos espaços porta na ausência de fibrose perisinusoidal/pericelular (Ratzu *et al.*, 2000; Dixon, Bhathal e O'brien, 2001).

O diagnóstico diferencial das causas subjacentes à esteatohepatite necessita correlação clínica, uma vez que a histologia pode ser semelhante (Brunt e Tiniakos, 2010). As possíveis etiologias incluem esteatohepatite alcóolica, toxicidade a drogas, doenças metabólicas, lipodistrofia, procedimentos cirúrgicos, nutrição parenteral e desnutrição (Brunt *et al.*, 2009). Dentre estas, a esteatohepatite alcóolica destaca-se como um dos diagnósticos diferenciais mais comuns e possui algumas características histológicas ainda não descritas na EENA, o que facilita a diferenciação, como lesões

veno-oclusivas, esteatose microvacuolar na zona 3, necrose hialina esclerosante na zona 3 e colestase (Brunt *et al.*, 2009).

#### **1.5.1.4- Gradação e estadiamento histológico da DHGNA**

Desde a sua descrição, numerosos sistemas de gradação histológica surgiram para o diagnóstico da DHGNA.

Em 1999, foi proposto um sistema que classifica a DHGNA em quatro tipos: deposição isolada de gordura (tipo 1); deposição de gordura e infiltrado inflamatório no parênquima (tipo 2); deposição de gordura e balonização hepatocitária (tipo 3) e os critérios do tipo 3 acrescidos da presença de corpúsculos de Mallory-Denk ou fibrose (tipo 4) (Matteoni *et al.*, 1999).

Brunt e colaboradores utilizaram a gradação das lesões necroinflamatórias e dos graus de fibrose em sua classificação de 1999 (Brunt *et al.*, 1999).

O sistema de gradação mais utilizado na atualidade é o do *NASH Clinical Research Network* (CRN), publicado em 2005, uma vez que foi validado por meio de revisões cegas realizadas por nove patologistas; aplica-se a todo o espectro morfológico da DHGNA e gera um escore numérico de atividade, o *NAFLD activity score* (NAS) (Kleiner *et al.*, 2005).

O NAS é a soma dos escores individuais para esteatose, balonização e inflamação lobular e varia de 0 a 8, sendo que um escore de 1 a 2 corresponde a definitivamente não EENA, 3 a 4 seria *borderline* e 5 a 8 corresponde a definitivamente EENA. Portanto, a

caracterização histológica de EENA baseia-se na presença de certos achados e não na sua intensidade (Leite *et al.*, 2014).

No entanto, há muitos portadores de EENA com NAS <4. Assim, este escore não deve ser utilizado como substituto para o diagnóstico histológico; deve ser calculado após a conclusão do patologista (Brunt e Tiniakos, 2010). Algumas de suas vantagens são ser uma boa ferramenta para avaliar resposta ao tratamento (Leite *et al.*, 2014), altamente reprodutível, não requerer colorações especiais e poder ser aplicado na população pediátrica (Sumida, Nakajima e Itoh, 2014).

Há indícios de que o sistema de Matteoni reflita mais verdadeiramente o diagnóstico e prognóstico nos casos de EENA do que o NAS (Kistler *et al.*, 2011). Assim, futuramente o NAS poderá ficar restrito à função de avaliar resposta terapêutica e não de diagnóstico.

No sistema do CRN, para a gradação da fibrose, foi feito um refinamento da proposta de Brunt e colaboradores (Brunt *et al.*, 1999). O estágio 1 foi subdividido em 1A para fibrose perisinusoidal discreta, 1B para moderada e 1C para fibrose portal/periportal exclusivamente (Kleiner *et al.*, 2005). O estágio 2 corresponde a fibrose perisinusoidal/pericelular e com fibrose periportal extensa ou focal, o estágio 3 corresponde a fibrose perisinusoidal/pericelular e portal com fibrose em ponte e o estágio 4 à cirrose (Brunt *et al.*, 1999). O estágio 1c é padrão de fibrose normalmente encontrado em obesos mórbidos (Brunt e Tiniakos, 2010).

### **1.5.1.5- Biópsia hepática e a cirurgia bariátrica**

A maioria dos pacientes submetidos à cirurgia bariátrica tem graus variáveis de esteatose (Pillai e Rinella, 2009) e em pacientes com índice de massa corporal (IMC) maior que 30 durante cerca de 15 anos, o risco de fibrose avançada está aumentado (Riley, Taheri e Schreiber, 2009).

A visualização intra-operatória do fígado a olho nu realizada pelos cirurgiões durante as gastroplastias redutoras mostrou-se comumente incorreta para a predição de esteatose ou fibrose avançada (Teixeira *et al.*, 2009), não sendo reproduzível (Dolce *et al.*, 2009).

Portanto a biópsia hepática tem sido atualmente recomendada no momento da cirurgia bariátrica para a população de obesos mórbidos (Teixeira *et al.*, 2009).

Nesta situação, o fragmento deve ser obtido no tempo cirúrgico mais precoce possível para evitar afluxo de polimorfonucleares neutrófilos aos lóbulos hepáticos no processo chamado hepatite cirúrgica, o que prejudicaria a gradação da inflamação lobular (Bruno e Tiniakos, 2010).

### **1.5.2- Exames de imagem**

Os exames de imagem frequentemente utilizados para o diagnóstico de DHGNA são a ultrassonografia (US), tomografia computadorizada (TC), ressonância magnética (RM) e mais recentemente, a elastografia.

A TC expõe o paciente à radiação, tem baixa acurácia para detectar graus discretos de esteatose e está sujeita a variabilidade entre os equipamentos (Schwenzer *et al.*, 2009).

A RM, apesar da alta acurácia para detecção de esteatose, tem altos custos, pouca disponibilidade e falta padronização (Guiu *et al.*, 2009; Nouredin *et al.*, 2013).

As técnicas de elastografia, que envolvem a avaliação ultrassonográfica da atenuação do parênquima hepático, têm mostrado resultados promissores no diagnóstico de esteatose discreta e sua gradação (De Lédinghen *et al.*, 2012), mas ainda são pouco disponíveis.

A ultrassonografia disponibiliza um diagnóstico imediato e consequente instituição rápida do tratamento, apresenta maior disponibilidade, facilidade de utilização e menores custos (Khov, Sharma e Riley, 2014), sendo a técnica mais utilizada para o diagnóstico de DHGNA.

No entanto, nenhum método de imagem é capaz de diferenciar esteatose simples de EENA (Sumida, Nakajima e Itoh, 2014).

### **1.5.2.1- Ultrassonografia**

A sensibilidade da ultrassonografia bidimensional para rastreamento de graus moderados a acentuados de DHGNA é comparável a outras técnicas não invasivas de imagem (Khov, Sharma e Riley, 2014). Em geral, a sensibilidade da ultrassonografia bidimensional para o diagnóstico de DHGNA (detecção de esteatose) é de 60-94% e especificidade de 85-95% (Joy, Thava e Scott, 2003).

As características ecográficas da DHGNA na ultrassonografia bidimensional estão bem estabelecidas e são hiperecogenicidade do parênquima (“brilho” hepático); aumento da razão hepatorenal; borramento vascular (veias hepáticas e veia porta) (Khov, Sharma e Riley, 2014), da cápsula de Glisson e da vesícula biliar devido à diminuição da impedância acústica entre o parênquima e estas estruturas; hepatomegalia em graus variados; atenuação das áreas subcapsulares e aparente dilatação dos vasos, principalmente veias hepáticas e dos ductos biliares (Goldberg e Petterson, 1996; Badea *et al.*, 2000). O valor preditivo positivo de todas estas características em conjunto para o diagnóstico de esteatose é de 0,94 (Mathiesen *et al.*, 2002).

Para avaliar a acurácia da ultrassonografia na esteatose hepática, um estudo prospectivo realizou biópsia hepática após a ecografia e verificou que quando a porcentagem de esteatose era maior que 20% no exame histológico as características ecográficas prediziam a DHGNA com sensibilidade de 90%. (Dasarathy *et al.*, 2009). No entanto, com níveis inferiores de conteúdo gorduroso, há queda da sensibilidade (Dasarathy *et al.*, 2009).

A avaliação do acúmulo de gordura hepática pela ultrassonografia é subjetiva e qualitativa (Topal *et al.*, 2014), além de operador dependente. Em um estudo retrospectivo, três radiologistas avaliaram 168 pacientes e repetiram o exame após um mês. A média de concordância intra e inter-observador para a presença de esteatose foi de 72% e 76%, respectivamente; já a concordância intraobservador quanto ao grau de esteatose foi de 55% a 68% (Strauss *et al.*, 2007).

Outra limitação é sua baixa capacidade de predizer fibrose quando correlacionado com os achados histológicos (Chen *et al.*, 2008; Mishra e Younossi, 2007), uma vez que fibrose, hemocromatose e glicogenoses também podem levar a um aumento da

ecogenicidade hepática, o que, potencialmente, diminui sua especificidade (Valls *et al.*, 2006).

Uma das situações em que a detecção de esteatose de forma não invasiva é de suma importância é no transplante hepático, em que o diagnóstico de esteatose no doador vivo e aparentemente saudável permite intervenções precoces e posterior reavaliação para doação (Khov, Sharma e Riley, 2014).

A combinação de múltiplos parâmetros ultrassonográficos aumenta a acurácia diagnóstica (Kim, Jeong e Baik, 2014), o que é altamente desejável. A utilização conjunta da ultrassonografia bidimensional e da técnica de Doppler é segura, barata e de simples realização.

A metodologia Doppler é muito útil na avaliação não invasiva da dinâmica vascular hepática, não envolve exposição à radiação, é amplamente disponível e de baixo custo. Além disso, prolonga a duração do exame ultrassonográfico rotineiro em apenas um a dois minutos (Ulusan, Yakar e Koc, 2011), características importantes na prática clínica diária.

O conhecimento atual sugere que a esteatose causa aumento do volume da massa celular hepática, com diminuição do espaço sinusoidal em até 50% (Balci *et al.*, 2008). Devido à limitada distensibilidade da cápsula do órgão, esse aumento volumétrico gera compressão e diminuição da complacência venosa intra-hepática (Mohammadi, Afshin *et al.*, 2011). Como consequência, há redução do fluxo no sistema porta e aumento compensatório do fluxo no sistema arterial (Topal *et al.*, 2014).

A avaliação hemodinâmica hepática envolve a realização do Doppler espectral com estudo dos parâmetros das ondas de fluxo dos três principais vasos hepáticos: veia porta, veia hepática e artéria hepática. Estudos recentes mostraram resultados

significativos sobre a relação entre o grau de esteatose e a hemodinâmica da artéria hepática, veia hepática e veia porta (Topal *et al.*, 2014).

Em adultos normais o fluxo venoso portal é hepatopetal/anterógrado com variações mínimas durante a respiração e de acordo com o ciclo cardíaco (Mcnaughton e Abu-Yousef, 2011). A avaliação dopplervelocimétrica da veia porta pode ser realizada por meio do índice de pulsatilidade venosa portal (IVP), calculado subtraindo-se o pico mínimo de velocidade portal do pico máximo e dividindo-se pelo pico máximo. Este parâmetro é similar ao índice de resistividade utilizado para caracterizar as ondas de fluxo das artérias (Balci *et al.*, 2008).

As veias hepáticas normalmente mostram um padrão trifásico de pulsatilidade que reflete as variações de pressão na veia cava inferior e átrio direito, com dois picos de fluxo anterógrado e um pico retrógrado, correspondente à sístole atrial direita (Mcnaughton e Abu-Yousef, 2011). Este padrão pode ser influenciado pela complacência do parênquima hepático, pressão venosa central e movimentos respiratórios (Topal *et al.*, 2014). Poucos estudos dedicaram-se a avaliar a relação entre a esteatose e o padrão de onda das veias hepáticas (Shapiro *et al.*, 1993; Dietrich *et al.*, 1998; Oguzkurt *et al.*, 2005).

Na artéria hepática, os índices de resistividade (IR) e de pulsatilidade (IP) estão relacionados com a distensibilidade local do vaso e resistência periférica (Topal *et al.*, 2014).

## 2- JUSTIFICATIVA

---

O uso da ultrassonografia com Doppler como método não invasivo para a avaliação de pacientes portadores de doença hepática gordurosa não alcóolica poderá reduzir o número de biópsias no futuro. Isto seria benéfico já que essa é uma afecção muito prevalente e de relevância clínica, sendo a biópsia um procedimento não isento de riscos.

A ultrassonografia pode ser realizada múltiplas vezes, devido a seu baixo custo, alta disponibilidade e ausência de riscos para o paciente. Dessa forma, o acompanhamento da evolução e possível surgimento de complicações poderão ser mais rigorosos.

Portanto, são necessários estudos que avaliem a capacidade do exame ultrassonográfico de predizer os diversos espectros da doença hepática gordurosa não-alcóolica, comparando seus resultados com o método padrão ouro da atualidade, a biópsia hepática.

Estudos prévios mostraram boa correlação entre a alteração do fluxo da veia porta ao Doppler e o grau de esteatose (Balci *et al.*, 2008; Erdogmus *et al.*, 2008), porém aqueles que avaliaram parâmetros da veia hepática (Mohammadi, Afshin *et al.*, 2011; Topal *et al.*, 2014) e artéria hepática (Mihmanli *et al.*, 2005; Topal *et al.*, 2014) ainda exibem divergências de resultados, sem consenso na literatura. Além disso, a maioria desses estudos possuem características metodológicas que podem comprometer suas conclusões como a ausência de referência histológica, desenho retrospectivo e grupo de estudo heterogêneo, formado por pacientes com doenças hepáticas crônicas de etiologias diferentes.

O nosso estudo exclui pacientes com outras doenças do parênquima hepático que não a DHGNA, como alguns trabalhos na literatura (Karabulut *et al.*, 2004; Solhjoo *et al.*, 2011; Aslan *et al.*, 2014; Borges *et al.*, 2011; Topal *et al.*, 2014; Mihmanli *et al.*, 2005) e avalia vários parâmetros hemodinâmicos do fígado correspondentes a seus três principais vasos, da mesma forma como realizado em alguns trabalhos (Mohammadi, Afshin *et al.*, 2011; Topal *et al.*, 2014).

Pelo nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo a correlacionar os dados obtidos nos três vasos hepáticos com os achados histológicos da biópsia em todos os pacientes portadores de DHGNA e a fazer uma análise discriminante com proposição de uma equação que utilize os parâmetros hemodinâmicos mais relevantes para, em conjunto, diagnosticar de forma mais assertiva a esteatose.

### **3- HIPÓTESE**

---

O uso da ultrassonografia com Doppler é um método não invasivo que permite o diagnóstico e gradação da esteatose em pacientes portadores de doença hepática gordurosa não alcoólica. A avaliação hemodinâmica dos pacientes com esteatose mostra, na veia porta, redução do índice de pulsatilidade venosa portal, na veia hepática direita, predominância dos padrões anormais de onda de velocidade de fluxo (padrão bifásico e monofásico) e, na artéria hepática, redução dos índices de resistividade e de pulsatilidade.

## 4- OBJETIVOS

---

### 4.1- Geral

Correlacionar parâmetros hemodinâmicos hepáticos de pacientes portadores de doença gordurosa não alcoólica, com achados histológicos de espécimes obtidos por biópsia.

### 4.2- Específicos

1. Avaliar os padrões Doppler na veia porta por meio do índice de pulsatilidade venosa portal e da veia hepática direita por meio de análise do padrão de onda de velocidade de fluxo;
2. Avaliar o padrão Doppler na artéria hepática quantificado pelos índices de resistividade e pulsatilidade;
3. Avaliar histologicamente a presença e a gradação da esteatose hepática, inflamação e fibrose nos pacientes portadores de doença hepática gordurosa não alcoólica;
4. Correlacionar os parâmetros hemodinâmicos obtidos por meio do Doppler espectral hepático com o diagnóstico e gradação da esteatose e com a inflamação e fibrose em pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica;
5. Propor uma função discriminante que utilize em conjunto os parâmetros hemodinâmicos de maior relevância para o diagnóstico de esteatose para aumentar a capacidade diagnóstica do método Doppler.

## **5- CASUÍSTICA E MÉTODOS**

---

### **5.1- Considerações éticas**

O protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia, sob o parecer número 379.516 (Anexo A). Foram incluídos somente aqueles voluntários que assinaram termo de consentimento livre e esclarecido após esclarecimento verbal.

### **5.2- Casuística**

Trata-se de estudo de diagnóstico aplicado com delineamento transversal, natureza observacional, quantitativa e analítica. Foram incluídos 40 pacientes provenientes do ambulatório de fígado gorduroso do Hospital de Clínicas da UFU e 10 pacientes provenientes do ambulatório de cirurgia bariátrica do mesmo hospital, portadores de DHGNA. Esses pacientes foram avaliados clinicamente, laboratorialmente, por ultrassonografia e biópsia hepática e constituíram o grupo com esteatose. A inclusão destes pacientes foi feita consecutivamente. Um indivíduo foi excluído devido à dificuldade técnica na análise Doppler da artéria hepática, constituindo uma amostra de 49 sujeitos no grupo com esteatose.

Foram incluídos, também, outros 49 voluntários, saudáveis, sem fatores de risco para DHGNA, ingestão alcoólica nenhuma ou mínima, sem diabetes ou obesidade, os quais constituíram o grupo controle (saudável, sem esteatose à ultrassonografia

bidimensional), selecionados por amostra de conveniência. O grupo controle foi submetido à mesma avaliação do grupo com esteatose, exceto biópsia hepática, por motivos éticos.

Todos os voluntários do grupo com esteatose seguiram os critérios de inclusão e exclusão específicos para o estudo, descritos a seguir. Os voluntários do grupo controle seguiram os mesmos critérios de inclusão (exceto a presença de esteatose hepática à ultrassonografia) e exclusão. Também foram critérios de exclusão para o grupo controle qualquer evidência de resistência insulínica ou fator de risco para DHGNA.

Os dois grupos deste estudo foram pareados quanto ao gênero, mas não quanto à idade.

### 5.3- Critérios de inclusão

- a) Presença de esteatose verificada por ultrassonografia
- b) Idade de 18-70 anos, ambos os gêneros
- c) Consentimento por escrito após esclarecimento verbal

### 5.4- Critérios de exclusão

- a) Ingestão de álcool > 140g/semana para homens e > 70g/semana para mulheres (GEORGE e FARRELL, 2005)
- b) Uso de medicações conhecidamente hepatotóxicas como, por exemplo, tetraciclina, amiodarona, alfametildopa e tamoxifeno
- c) Hepatites virais crônicas B ou C
- d) Hemocromatose
- e) Outras hepatopatias crônicas, hipertensão portal, cirrose, ascite e insuficiência hepática
- f) Qualquer distúrbio da coagulação sanguínea
- g) Cardiopatias, isquemia aguda coronariana, cerebral ou periférica
- h) Insuficiência respiratória
- i) Lesões hepáticas focais, inclusive esteatose focal
- j) Gravidez e lactação
- k) Recusa em participar da pesquisa

### 5.5.2- Avaliação clínica

Os dados demográficos e as medidas antropométricas como altura e peso foram obtidos durante consultas ambulatoriais. O índice de massa corporal (IMC) foi calculado pela fórmula de Quetlet:  $IMC = \text{peso em kg} / (\text{altura em m})^2$ .

A presença de comorbidades orgânicas foi avaliada ambulatorialmente. Hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus, hipertrigliceridemia e síndrome metabólica foram definidas de acordo com os critérios do *Third Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults final report* (NCEP-ATP III), 2002 modificado quanto ao ponto de corte da glicemia de 110mg/dL para 100mg/dL e quanto à circunferência da cintura (Quadro 1).

| <b>Critérios</b>                    | <b>Pontos de corte</b>  |
|-------------------------------------|---|
| Circunferência da cintura aumentada | ≥90 cm em homens<br>≥80 cm em mulheres  |
| Hipertrigliceridemia                | ≥150 mg/dl<br>ou em tratamento com medicações para hipertrigliceridemia   |
| HDL-colesterol baixo                | <40 mg/dl em homens<br><50 mg/dl em mulheres<br>ou em uso de medicações para HDL-C baixo  |
| Pressão arterial elevada            | ≥130 mmHg de pressão sistólica<br>≥85 mmHg de pressão diastólica<br>ou em uso de drogas anti-hipertensivas em um paciente com história prévia de hipertensão. |
| Glicemia de jejum elevada           | ≥100 mg/dl<br>ou em tratamento com drogas para glicemia elevada por diagnóstico prévio de diabetes  |

**Quadro 1 - Critérios diagnósticos para síndrome metabólica**

Fonte: (Duseja et al., 2007).

### **5.5.3- Avaliação laboratorial**

Os seguintes exames foram realizados: hemograma completo, lipidograma plasmático, coagulograma, albumina, aspartato aminotransferase, alanino aminotransferase, fosfatase alcalina, gama-glutamil transferase, bilirrubina total e frações, glicemia, marcadores para hepatite B e C e perfil do ferro.

### **5.5.4- Avaliação ecográfica e pelo método Doppler**

Todos os 98 voluntários foram examinados por ultrassonografia em modo bidimensional e com Doppler, utilizando-se dois equipamentos de ultrassom (*Voluson 730 Expert, General Electric, Milwaukee, USA* e *Siemens Acuson X150, Washington, USA*), ambos com transdutor convexo multifrequencial de 2 a 5 MHz, filtro de 50 Hz, amostra volume de 2 mm e pulso de repetição de frequência de 2,0 kHz. Os pacientes encontravam-se em jejum de 8 a 12 horas, em decúbito dorsal, com os braços estendidos ao lado da cabeça e o exame foi executado pela manhã.

Todos os exames foram realizados por um único ultrassonografista experiente, sem conhecimento dos dados clínico-laboratoriais.

Todos os segmentos do fígado e baço foram examinados e malformações vasculares, cistos, lesões focais dos parênquimas, excluídos.

Primeiramente, o exame foi realizado sob o modo bidimensional e os achados de infiltração gordurosa do fígado incluíram aumento difuso da ecogenicidade, aumento da

atenuação acústica, apagamento do diafragma e *borramento* das margens vasculares (Charatcharoenwitthaya e Lindor, 2007).

Em seguida, com o paciente em apnéia, foi feita a análise Doppler arterial e venosa, com emprego do ângulo abaixo de 30° e registro de pelo menos cinco ondas com o mesmo padrão. As análises da veia porta e artéria hepática foram feitas no hilo, imediatamente na chegada das mesmas na superfície hepática e a análise da veia hepática direita foi a 2,0 cm distal à confluência das veias hepáticas.

#### **5.5.4.1- Avaliação do índice de pulsatilidade da veia porta**

As medidas da veia porta foram realizadas durante apnéia, no início da inspiração, para evitar modificações causadas por inspiração profunda, e uma análise espectral da onda de velocidade do fluxo venoso portal foi gravada por, pelo menos, cinco segundos de pausa inspiratória (Scatarige *et al.*, 1984; Karabulut *et al.*, 2004).

O ponto de medição da veia porta foi na porção extra-hepática, proximal à bifurcação. A janela foi ajustada em 6-10 mm, de acordo com o diâmetro do vaso, e o Doppler foi registrado por aproximadamente 5 segundos em ângulo inferior a 30°. A velocidade máxima do pico de fluxo (VMáx) e a velocidade mínima de pico (VMín) foram registradas para cada voluntário e documentadas em foto (Figura 3). O índice venoso portal (IVP) foi obtido em todos os pacientes e controles por meio da subtração VMín da VMáx e divisão do resto pela VMáx [IVP=(VMáx-VMín)/VMáx].

Devido às alterações no diâmetro do vaso, de até 2 mm por ciclo cardíaco durante a sístole e diástole, e direções diferentes do fluxo, não foi calculada a velocimetria nas veias hepáticas.

#### **5.5.4.3- Avaliação do índice de resistividade e de pulsatilidade da artéria hepática**

As medidas da artéria hepática foram realizadas durante apnéia, no início da inspiração e uma análise espectral da onda de velocidade do fluxo arterial foi gravada por, pelo menos, cinco segundos de pausa inspiratória (Figura 5).

O índice de resistividade (IR) foi calculado após obtenção do pico de velocidade sistólica (PSV) e velocidade diastólica final (EDV) por meio da fórmula:  $IR = \frac{PSV - EDV}{PSV}$ .

O índice de pulsatilidade (IP) foi calculado após obtenção dos mesmos parâmetros e também da velocidade média (MnV) por meio da fórmula:  $IP = \frac{PSV - EDV}{MnV}$ .

### **5.5.5- Avaliação histológica**

A biópsia hepática foi realizada por agulha de “Tru-cut” de 16 Gauge. O material foi coletado do lobo direito do fígado, no segmento 6, durante a ultrassonografia nos pacientes provenientes do ambulatório de fígado gorduroso e durante a cirurgia de gastroplastia redutora, logo após a exposição do fígado, nos pacientes provenientes do ambulatório de cirurgia bariátrica. A biópsia foi realizada com intervalo máximo de uma semana após o exame ultrassonográfico. O fragmento hepático de cerca de 10 mm foi fixado em solução de formalina a 10% e processado histologicamente. Os cortes histológicos foram confeccionados com espessura de 3 µm, com 6 cortes em cada lâmina e submetidos às seguintes colorações: hematoxilina-eosina, tricrômico de Masson, reticulina, PAS com diastase, PAS sem diastase e Ziehl alongado. Dois patologistas sem conhecimento dos dados clínico-laboratoriais e ultrassonográficos, procederam à avaliação do material individualmente. Em seguida, reuniram-se para estabelecer consenso.

#### **5.5.5.1- Caracterização do perfil histopatológico hepático**

A avaliação histopatológica baseou-se na classificação padronizada por meio da revisão do *Pathology Committee of the NASH Clinical Research Network* (Kleiner *et al.*, 2005), que designou e validou as características histológicas e um sistema de escore de atividade da DHGNA para estudos clínicos.

### 5.5.5.2- Variáveis histopatológicas

As variáveis histopatológicas foram descritas e subdivididas em alterações hepatocelulares, infiltrado inflamatório e fibrose (Anexo B). As alterações hepatocelulares procuradas sistematicamente foram: esteatose, balonização hepatocelular, corpúsculo hialino de Mallory, inclusão nuclear de glicogênio nos hepatócitos e apoptose. A esteatose foi classificada como discreta (até 33% dos hepatócitos), moderada (de 33 a 66%) e acentuada (mais de 66% de infiltração gordurosa em hepatócitos) e sua localização no ácino hepático foi descrita (Brunt et al., 1999; Brunt, 2005). Os infiltrados inflamatórios tanto lobulares quanto portais, quando existentes, foram discriminados em intensidade discreta, moderada e acentuada, segundo a interpretação do patologista. A fibrose, que caracteriza o estadiamento da biópsia, foi descrita segundo a localização no ácino hepático, o aspecto e a intensidade. Assim, estágio 0= fibrose ausente, 1 a= fibrose perissinusoidal discreta, 1b= fibrose perissinusoidal moderada, 1c= apenas fibrose portal/perportal, 2= fibrose perissinusoidal e portal/perportal, 3= fibrose em ponte, 4= cirrose. O escore de NAS (Non-alcoholic fatty liver disease Activity Score) foi calculado para cada amostra. Este combina a soma de três critérios histológicos semi-quantitativos: esteatose (0–3), inflamação lobular (0–3) e balonização hepatocitária (0–2).

### **5.5.6- Análise discriminante linear para diagnóstico de esteatose**

Utilizou-se a Análise Discriminante (Johnson e Wichern, 2007), uma técnica multivariada, para criar uma regra de classificação dos pacientes nos grupos controle e com esteatose. Para a criação da regra de classificação, utilizaram-se dados obtidos dos 98 pacientes (49 controles e 49 com esteatose) e das variáveis que se mostraram significantes para separar os grupos.

A partir dos valores destas variáveis, o modelo classifica o paciente e o resultado é comparado com o estudo histológico (padrão ouro).

### **5.5.7- Análise estatística**

Para a análise estatística foi utilizado o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). O teste de Lilliefors foi utilizado para avaliar a normalidade dos dados. De acordo com a normalidade e a homocedasticidade dos dados, o teste de Mann-Whitney ou o teste t foram usados para a comparação de dois grupos independentes. O teste de Kruskal-Wallis foi realizado para comparar mais de dois grupos, com pós-teste de Dunn para comparações múltiplas aos pares (análise pós-hoc). A estatística descritiva foi apresentada como mediana, mínimo e máximo, média e desvio padrão. Dados categóricos foram apresentados como frequência absoluta (n) e frequência relativa (%) e analisados com teste de Fisher. Para estudar a relação entre as variáveis utilizou-se o coeficiente de correlação de Spearman. Para determinar sensibilidade e especificidade utilizou-se a curva ROC- *receiver operating characteristic curve*. Para todos os testes foi adotada uma significância de 5%. Para a realização da técnica multivariada da análise discriminante e construção da equação foi utilizado o software *Statistical Analysis System* (SAS).

## 6- RESULTADOS

---

### 6.1- Características clínico-laboratoriais dos grupos com esteatose e controle

O grupo controle constituiu-se de 14 indivíduos do gênero masculino e 35 do gênero feminino enquanto o grupo com esteatose constituiu-se de 8 pacientes do gênero masculino e 41 do gênero feminino. Não se observou diferença significativa entre estas proporções ( $p=0,149$ ; teste de Fisher).

A idade dos voluntários do grupo controle variou de 23 a 70 anos, com média  $41,00 \pm 12,15$ . A idade dos pacientes do grupo com esteatose variou de 27 a 64 anos e a média foi  $46,58 \pm 10,11$  anos. Houve diferença significativa entre as médias de idade ( $p=0,011$ ; teste t de Student).

Não houve diferença significativa entre os grupos (teste de Mann-Whitney) com relação ao nível de albumina sérica, bilirrubinas, número de plaquetas e índice de saturação da transferrina (Quadro 2).

Os pacientes com DHGNA apresentaram índices de obesidade, dislipidemia, glicemia de jejum, enzimas hepáticas e níveis de ferritina significativamente alterados e elevados em relação aos controles, conforme teste de Mann-Whitney (Quadro 2).

|                                  | <b>Esteatose (n=49)</b> | <b>Controle (n=49)</b> | <b>P</b>          |
|----------------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------|
| <b>Gênero masculino (%)</b>      | 8 (16,32%)              | 14 (28,57%)            | 0,149             |
| <b>Idade (anos)</b>              | 50(27-64)               | 45(23-70)              | <b>0,0032</b>     |
| <b>Albumina (g/dL)</b>           | 4,47±0,66               | 4,60±0,40              | 0,678             |
| <b>Plaquetas /1000</b>           | 260,73±80,68            | 252,65±46,86           | 0,440             |
| <b>IST</b>                       | 29,80±13,17             | 32,57±12,08            | 0,344             |
| <b>Bilirrubina Total (mg/dL)</b> | 0,57 (0,22-3,81)        | 0.64 (0.25-2.90)       | 0,084             |
| <b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>    | 35,05±8,76              | 22,49(17,75-26,71)     | <b>&lt;0,0001</b> |
| <b>Glicemia de jejum (mg/dL)</b> | 108,55±24,03            | 86,00(70,00-101,00)    | <b>&lt;0,0001</b> |
| <b>Colesterol total (mg/dL)</b>  | 192,04±39,85            | 187,54±30,84           | 0,554             |
| <b>Triglicérides (mg/dL)</b>     | 157,65±83,03            | 96,00(38,00-224,00)    | <b>&lt;0,0001</b> |
| <b>HDL (mg/dL)</b>               | 43,78±10,15             | 59,77±12,48            | <b>&lt;0,0001</b> |
| <b>Aspartato amino</b>           | 19,50(9,00-             | 12,50(9,00- 4,20)      | <b>&lt;0,0001</b> |
| <b>Alanino amino transferase</b> | 42,50(12,00-            | 16,00(8,00-57,00)      | <b>&lt;0,0001</b> |
| <b>Gama-glutamil transferase</b> | 45,50(16,00-            | 16,00(8,00-63,00)      | <b>&lt;0,0001</b> |
| <b>Fosfatase alcalina</b>        | 99,50(42,00-            | 63,00(27,00-135,00)    | <b>&lt;0,0001</b> |
| <b>Ferritina (ng/mL)</b>         | 192,90(16,40-           | 117,47±127,35          | <b>&lt;0,0001</b> |

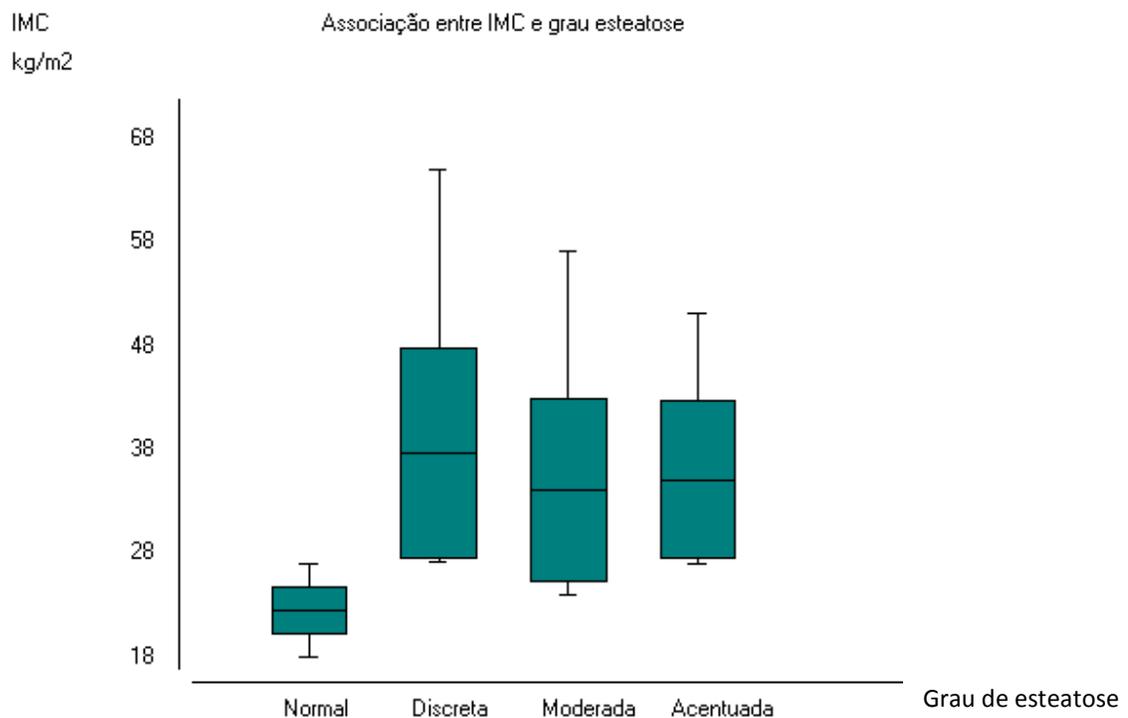
**Quadro 2 - Características clínicas e laboratoriais dos grupos com esteatose e controle, expressas em média ± desvio padrão e mediana (mínimo- máximo) exceto para as variáveis categóricas, expressas, quando indicado, em frequências absoluta e percentual.**

*IMC: índice de massa corporal; IST: índice de saturação da transferrina em porcentagem; HDL: High density lipoprotein; TGO: transaminase glutâmico-oxalacética; TGP: transaminase glutâmico-pirúvica.*

Com relação ao IMC no grupo com esteatose, 2 (4,08%) pessoas eram eutróficas, 15 (30,61%) com sobrepeso, 14 (28,57%) com obesidade grau I, 6 (12,24%) com obesidade grau II e 12 (24,48%) com obesidade grau III. Assim, 65,29% do grupo com esteatose era portador de algum grau de obesidade.

Houve correlação forte e positiva entre o grau de esteatose e o IMC ( $r= 0,77$ ;  $p<0,0001$ ; coeficiente de correlação de Spearman).

O gráfico tipo *box-plot* a seguir (Figura 6) ilustra as medianas e valores mínimos e máximos do IMC em todos os grupos com relação ao grau de esteatose.



**Figura 6 – Gráfico *box-plot* do índice de massa corporal (IMC) de acordo com o grau de esteatose à histologia. Os limites superior e inferior de cada *box* representam os valores mínimo e máximo. As linhas horizontais delimitam os quartis e a linha**

**horizontal que divide cada box expressa a mediana (Coeficiente de correlação de Spearman;  $p < 0,0001$ ).**

Doze pacientes do grupo com esteatose eram portadores de obesidade mórbida/grau III ( $\text{IMC} \geq 40 \text{ kg/m}^2$ ). A média do IMC neste subgrupo específico de pacientes com esteatose foi  $49,38 \pm 6,68 \text{ kg/m}^2$ . Destes pacientes, 7 (58,33%) apresentavam esteatose discreta, 4 (33,33%) esteatose moderada e apenas 1 (8,33%) esteatose acentuada. Não houve correlação entre o grau de esteatose e o IMC ( $r = -0,05$ ;  $p = 0,85$ ; coeficiente de correlação de Spearman) neste subgrupo.

Dos nove pacientes que foram submetidos à cirurgia bariátrica, 8 (88,88%) apresentavam obesidade grau III e 1 (11,11%) obesidade grau I. Neste subgrupo, 4 (44,4%) apresentavam esteatose discreta, 4 (44,4%) esteatose moderada e 1 (11,1%) esteatose acentuada.

No grupo com esteatose, 15 (30,61%) pacientes eram portadores de diabetes mellitus tipo 2 e 37 (75,51%) dislipidêmicos.

Todos os participantes do grupo com esteatose possuíam ao menos um fator etiológico- obesidade, dislipidemia ou diabetes mellitus- para a esteatose hepática.

## 6.2- Avaliação histológica

A avaliação histológica se refere somente ao grupo com esteatose, o qual foi constituído por pacientes em que a biópsia confirmou a presença de esteatose em todos, sendo que 22 (44,89%) apresentaram esteatose discreta, ou seja, até 33% dos hepatócitos acometidos; 19 (38,77%) sujeitos apresentaram esteatose moderada (33-66% de hepatócitos esteatóticos) e em 8 (16,32%) foi diagnosticada esteatose acentuada, com mais de 66% de hepatócitos infiltrados por gotículas de gordura.

Balonização celular foi identificada em 44 (89,8%) pacientes do grupo com esteatose. Foram encontrados corpúsculo hialinos de Mallory (Figura 8) à coloração de rotina (hematoxilina e eosina) em 4 casos (8,16%). Lipogranulomas estavam presentes em 14 casos (28,57%). Inclusões nucleares de glicogênio (Figura 7) foram encontradas em 34 casos (69,38%) e corpos acidófilos, que caracterizam apoptose, foram vistos em 8 pacientes (16,32%).

Em relação à representatividade dos fragmentos analisados histologicamente, 68,29% das biópsias apresentavam mais de seis espaços-porta, característica de amostras representativas.

### **6.3- Avaliação ultrassonográfica**

#### **6.3.1- Ultrassonografia bidimensional**

Por meio da ultrassonografia no modo bidimensional, nos pacientes selecionados para constituírem o grupo com esteatose, não foi encontrada esteatose hepática em um caso; o grau de esteatose foi estimado como leve em 13 (26,53%) casos, moderada em 16 (32,65%) e acentuada em 19 (38,77%) pacientes. Quando comparado aos achados da biópsia para os mesmos pacientes, houve diferença estatisticamente significativa ( $p= 0,03$ ; teste de Mann-Whitney). Nenhum paciente do grupo com esteatose era portador de esteatose focal.

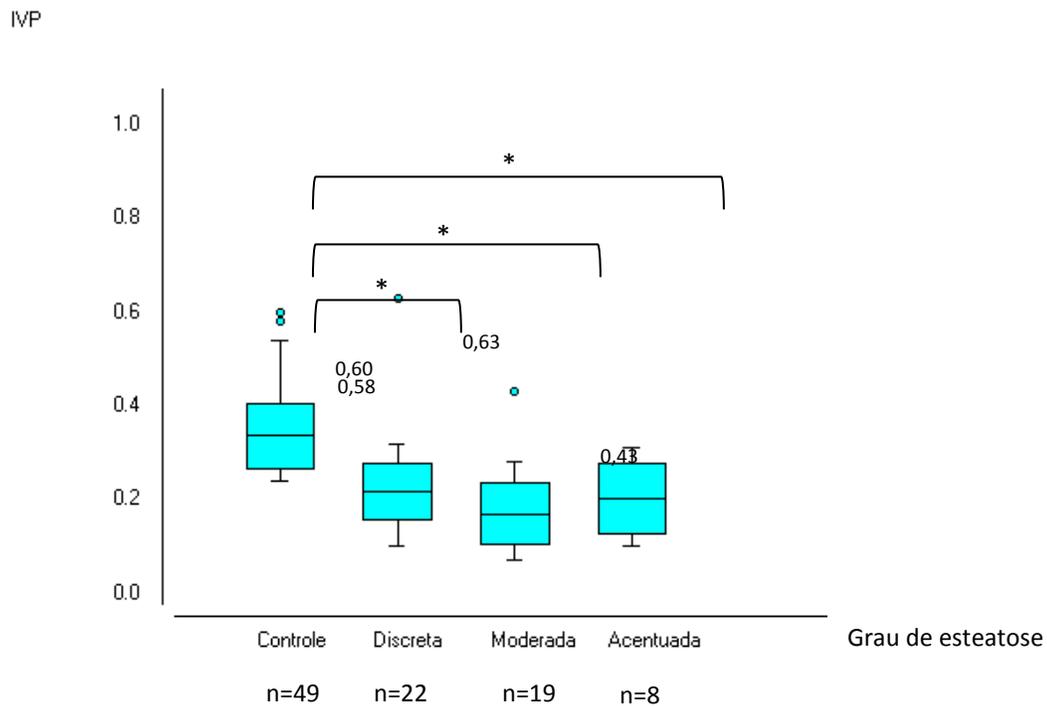
No grupo de pacientes com esteatose, o lobo direito do fígado apresentou, em média, comprimento de  $17,34 \pm 2,26$  cm e o lobo esquerdo  $10,36 \pm 2,62$  cm. No grupo controle, o lobo direito mediu em média  $14,69 \pm 1,40$  cm e o lobo esquerdo  $9,23 \pm 1,45$  cm. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para o tamanho do lobo direito ( $p < 0,0001$ ; teste de Mann-Whitney) e para o lobo esquerdo ( $p < 0,011$ ; teste de Mann-Whitney).

## 6.3.2- Ultrassonografia com Doppler

### 6.3.2.1- Doppler da veia porta – Índice de pulsatilidade venosa portal

A onda de velocidade de fluxo da veia porta mostrou-se mais fásica no grupo controle do que no grupo de voluntários com esteatose.

Os valores da mediana do IVP foram 0,32 no grupo controle e 0,21 nos voluntários com esteatose ( $p < 0,0001$ ; teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn) (Figura 9).



**Figura 9 – Gráfico *box-plot* do índice de pulsatilidade venosa portal (IVP) de acordo com o grau de esteatose na histologia. Os limites superior e inferior de cada *box* representam o quartil superior e inferior, enquanto a linha horizontal, dividindo cada *box*, a mediana. As barras horizontais representam o percentil 25 e o percentil 75. As chaves de associação expressam a diferença estatística entre os grupos controle e com esteatose. Os valores especificados se referem aos *outliers* (teste de Kruskal-Wallis com pós- teste de Dunn; \* $p < 0,05$ ).**

A média do IVP, desvio padrão, intervalo de confiança, mediana e valores mínimo e máximo para cada grupo, com a diferença estatística entre estes, estão demonstrados na tabela 1.

**Tabela 1 - Valores do índice de pulsatilidade venosa portal expressos como média, desvio padrão, intervalo de confiança (IC), mediana e valores mínimo e máximo para cada grupo**

|               |            | IVP   |                  |           |         |                  |
|---------------|------------|-------|------------------|-----------|---------|------------------|
|               |            | Média | Desvio<br>padrão | IC 95%    | Mediana | Mínimo<br>Máximo |
| <b>Grupos</b> | Controle*  | 0,35  | 0,08             | 0,33-0,37 | 0,32    | 0,24-0,60        |
|               | Esteatose  | 0,21  | 0,10             | 0,19-0,23 | 0,21    | 0,07-0,63        |
|               | Discreta†  | 0,24  | 0,16             | 0,14-0,34 | 0,22    | 0,1- 0,63        |
|               | Moderada†  | 0,18  | 0,09             | 0,14-0,22 | 0,17    | 0,07-0,43        |
|               | Acentuada† | 0,20  | 0,07             | 0,15-0,25 | 0,21    | 0,10-0,31        |

**\* o grupo controle foi diferente ( $p < 0,05$ ) de todos os grupos por comparação múltipla utilizando-se análise de variância (Kruskal-Wallis) com teste Dunn para análise pós Hoc.**

**† os subgrupos portadores de esteatose foram diferentes do controle, mas não diferiram entre si significativamente utilizando os mesmos testes descritos.**

Houve correlação entre o índice de pulsatilidade venosa portal e a presença de esteatose à biópsia. O coeficiente de correlação de Spearman entre o IVP e a presença de esteatose foi -0,69 ( $p < 0,0001$ ), demonstrando correlação inversa e significativa. Além

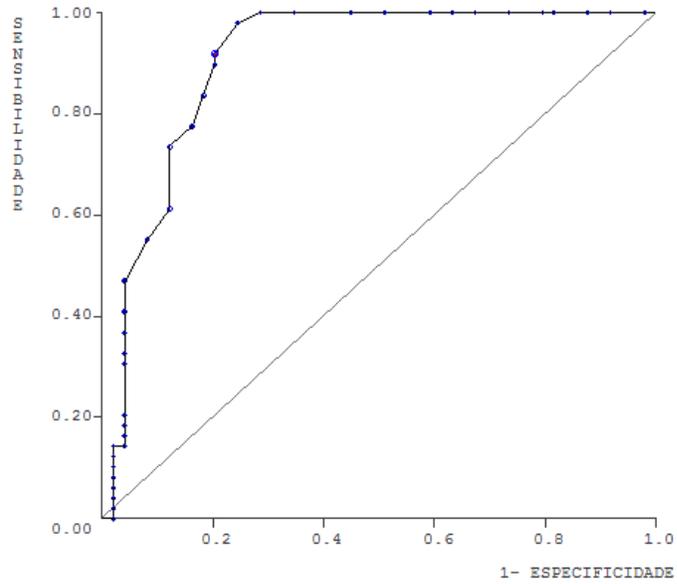
disto, notou-se que a correlação foi maior com a esteatose do que com a inflamação ou fibrose (Tabela 2).

**Tabela 2 - Correlação de Spearman entre a presença de esteatose, inflamação e fibrose e o índice de pulsatilidade venosa portal (IVP).**

| Variável | Presença de esteatose | Presença de inflamação | Presença de fibrose |
|----------|-----------------------|------------------------|---------------------|
| IVP      | -0,69*                | -0,17                  | -0,13               |

**\*p= significativo**

Os dados da curva ROC para a variável IVP, podem ser observados na Figura 10. O ponto de corte (*cutoff*) do IVP 0,26 apresentou-se válido nesta amostra para distinguir o grupo controle do grupo com esteatose, com sensibilidade de 91,00%, especificidade de 79,60% e acurácia de 85,70%. O valor preditivo positivo calculado foi de 81,82% e o valor preditivo negativo de 90,66%. A área sob a curva ROC encontrada foi de 0,9058 que é estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ).



**Figura 10-** Gráfico da curva *receiver operating characteristic* (ROC) da sensibilidade plotada contra 1- especificidade do índice de pulsatilidade venosa portal (IVP) para diagnóstico da esteatose à biópsia.

### 6.3.2.2- Doppler da veia hepática

O padrão da onda de velocidade de fluxo (OVF) na veia hepática ao Doppler foi diferente entre os grupos com esteatose e o controle. No grupo controle, o padrão de OVF predominante foi o trifásico, enquanto no grupo com esteatose o padrão trifásico predominou no subgrupo com esteatose discreta e o padrão monofásico nos subgrupos com esteatose moderada e acentuada. Trinta de 48 pacientes (62,5%) com esteatose apresentaram padrão anormal da veia hepática, sendo 22 (45,83%) com padrão monofásico e 8 (16,66%) com padrão bifásico.

A diferença da frequência do padrão anormal de OVF na veia hepática entre os grupos controle e esteatose foi significativa ( $p < 0,0001$ ; teste de Mann-Whitney).

A correlação entre o grau de infiltração gordurosa e o padrão de OVF da veia hepática foi inversa e significativa ( $r = -0,61$ ,  $p < 0,0001$ ; coeficiente de correlação de Spearman).

A diferença da frequência do padrão anormal de OVF na veia hepática entre os subgrupos de pacientes portadores de esteatose não foi significativa ( $p = 0,67$ ; teste de Kruskal-Wallis).

A tabela 4 demonstra a distribuição dos padrões de OVF de acordo com o grau de esteatose à histologia.

**Tabela 3 - Distribuição do padrão de fluxo da veia hepática direita ao Doppler, nos grupos controle e com esteatose à biópsia, expressas em frequências absoluta e percentual.**

|               |           | Monofásico n(%) | Bifásico n(%) | Trifásico n(%) | Total |
|---------------|-----------|-----------------|---------------|----------------|-------|
| <b>Grupos</b> | Controle  | 1 (2,04)        | 2 (4,08)      | 46 (93,87)     | 49,0  |
|               | Esteatose | 22 (45,83%)     | 8 (16,66%)    | 18 (37,5%)     | 48,0* |
|               | Discreta  | 8 (38,09)       | 3 (14,28)     | 10 (47,61)     | 21,0* |
|               | Moderada  | 8 (42,10)       | 4 (21,05)     | 7 (36,84)      | 19,0  |
|               | Acentuada | 6 (75,00)       | 1 (12,5)      | 1 (12,5)       | 8,0   |

\* Em um paciente obeso com esteatose discreta não foi possível avaliar o padrão de fluxo da veia hepática por dificuldades técnicas.

Baseada nestes resultados, a sensibilidade do padrão de OVF da veia hepática para o diagnóstico de esteatose foi 63,26%, com especificidade de 93,61%. O valor preditivo positivo foi 91,17% e o valor preditivo negativo 70,96%. A acurácia foi 78,12%.

O coeficiente de correlação de Spearman não mostrou correlação entre a presença de inflamação e o padrão de OVF da veia hepática ( $r = -0,18$ ;  $p = 0,19$ ) e a presença de algum grau de fibrose apresentou correlação fraca com este parâmetro ( $r = -0,29$ ;  $p = 0,04$ ).

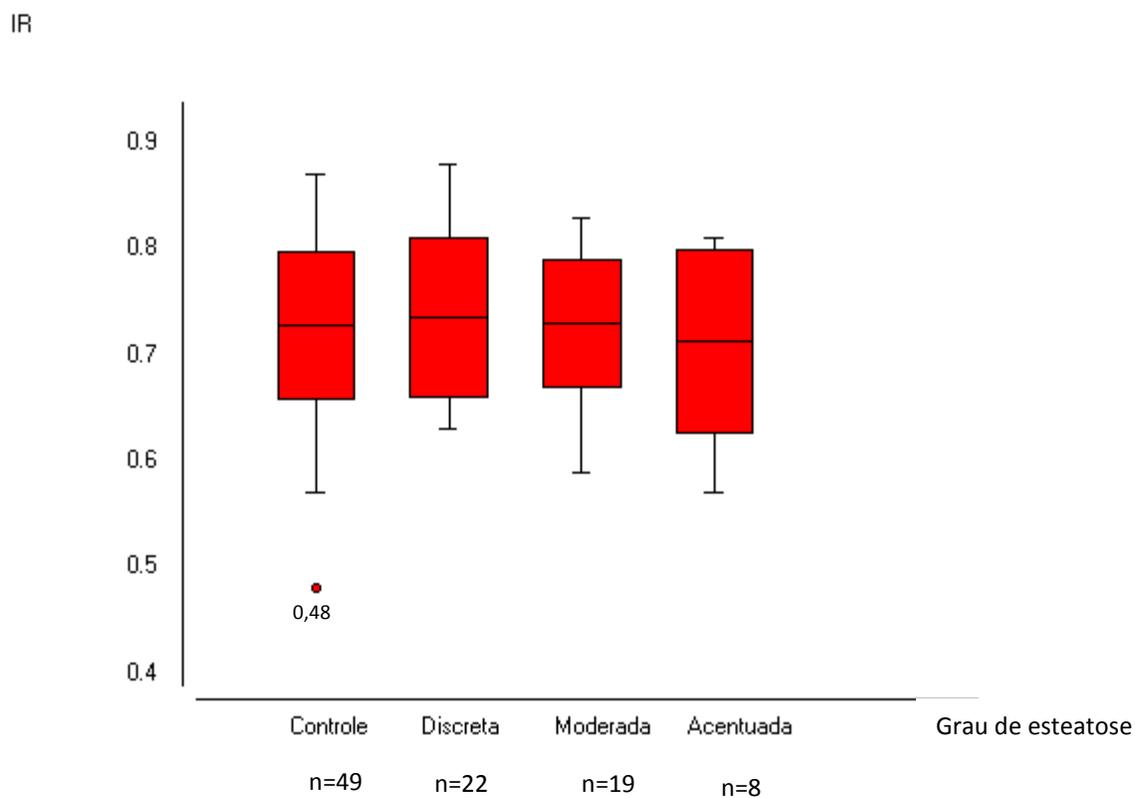
### 6.3.2.3- Índice de resistividade da artéria hepática

A média do índice de resistividade da artéria hepática do grupo controle foi  $0,72 \pm 0,08$  e do grupo com esteatose foi de  $0,73 \pm 0,07$  ( $p = 0,71$ ; teste t de Student), conforme a tabela 4.

**Tabela 4 – Índice de resistividade da artéria hepática, expressa em média, desvio padrão, intervalo de confiança (IC), mediana e valores mínimo e máximo de acordo com o grau de esteatose à biópsia**

|                  |           | Média | Desvio<br>padrão | IC 95%    | Mediana | Mínimo<br>Máximo |
|------------------|-----------|-------|------------------|-----------|---------|------------------|
| <b>Grupos</b>    | Controle  | 0,72  | 0,08             | 0,7-0,74  | 0,74    | 0,48<br>0,87     |
|                  | Esteatose | 0,73  | 0,07             | 0,71-0,75 | 0,73    | 0,57<br>0,88     |
| <b>Subgrupos</b> | Discreta  | 0,73  | 0,07             | 0,70-0,76 | 0,73    | 0,63<br>0,88     |
|                  | Moderada  | 0,74  | 0,13             | 0,65-0,83 | 0,72    | 0,59<br>0,83     |
|                  | Acentuada | 0,71  | 0,08             | 0,65-0,77 | 0,74    | 0,57<br>0,81     |

O gráfico tipo *box-plot* a seguir (Figura 11) ilustra as medianas em todos os grupos com relação ao IR. Não houve diferença estatística comparando-se os grupos entre si pelo teste t de Student.



**Figura 11 – Gráfico *box-plot* do índice de resistividade (IR) de acordo com o grau de esteatose à histologia. A linha horizontal dividindo cada box representa a mediana. Os valores descritos referem-se aos *outliers* (teste t de Student;  $p>0,05$ ).**

A análise do emprego do IR da artéria hepática para o diagnóstico de esteatose foi feita utilizando-se a curva ROC (*receiver operating characteristic*), que pode ser observada na Figura 12. O ponto de corte corresponde ao valor 0,71; que apresenta uma sensibilidade de 46,9% e especificidade de 57,8%. A área abaixo da curva é 0,5099 que é estatisticamente igual a 0,5 ( $p = 0,4352$ ).

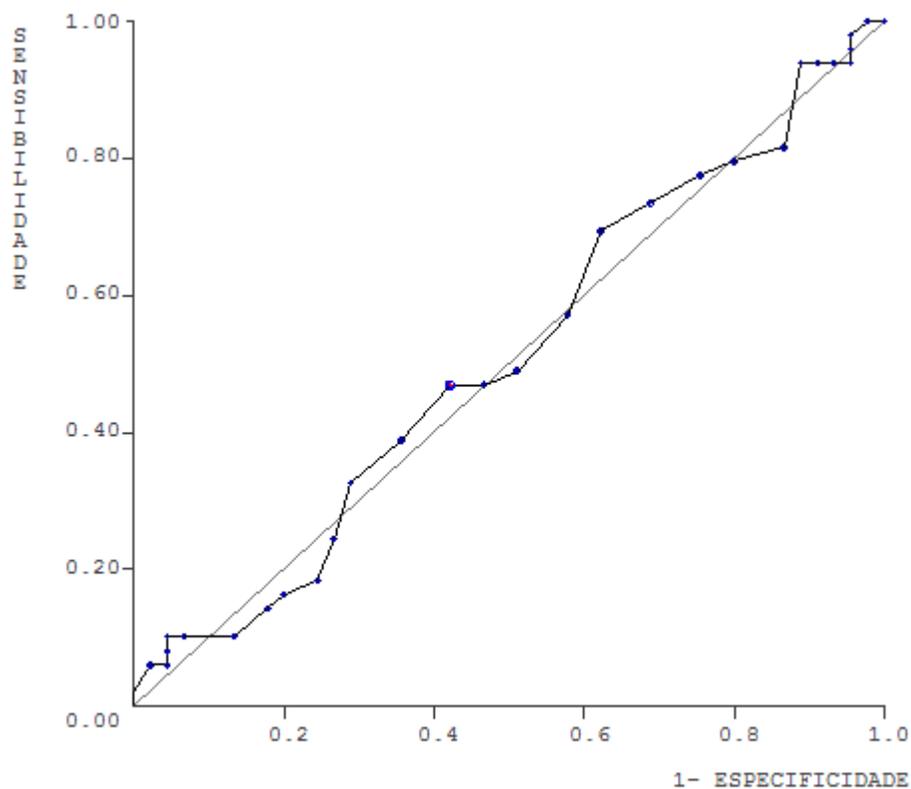


Figura 12 – Curva ROC para a sensibilidade plotada contra 1- especificidade da variável IR.

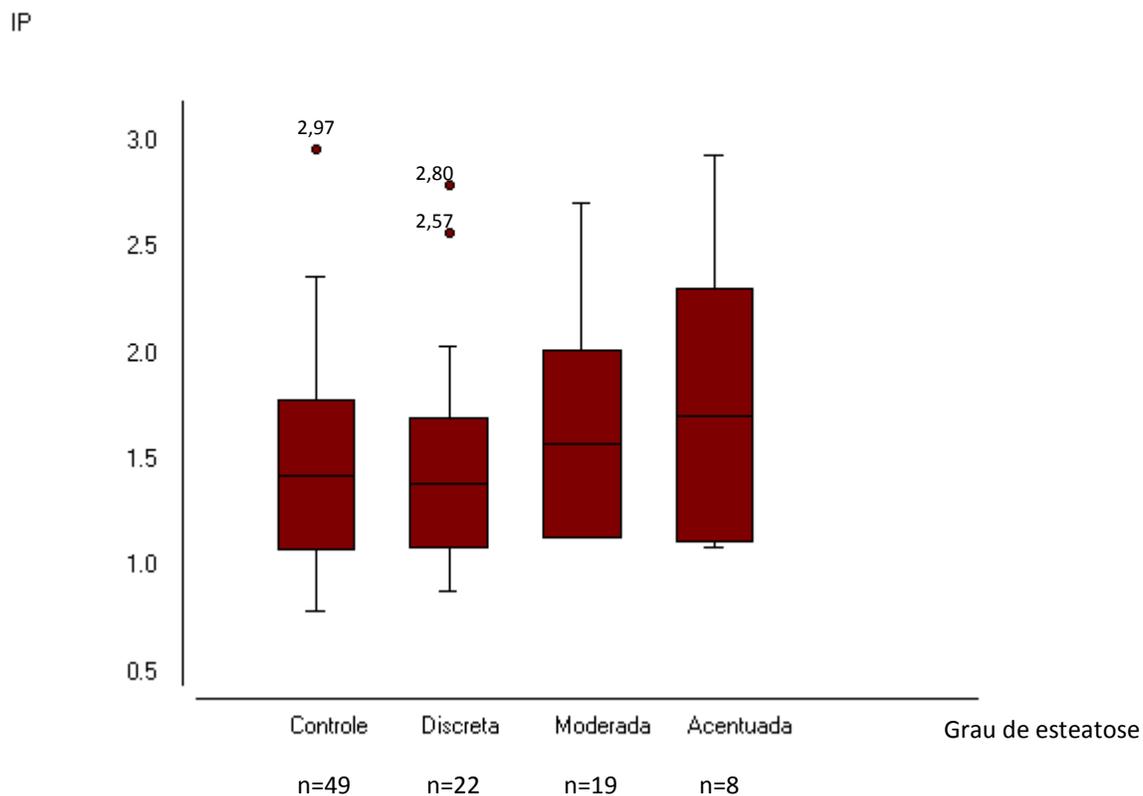
### 6.3.2.4- Índice de pulsatilidade da artéria hepática

A mediana do índice de pulsatilidade da artéria hepática do grupo controle foi 1,43 e do grupo com esteatose foi de 1,47 ( $p=0,43$ ; teste de Mann-Whitney), conforme mostra a tabela 5.

**Tabela 5 – Índice de pulsatilidade da artéria hepática, expressa em média, desvio padrão, intervalo de confiança (IC), mediana e valores mínimo e máximo de acordo com o grau de esteatose à biópsia**

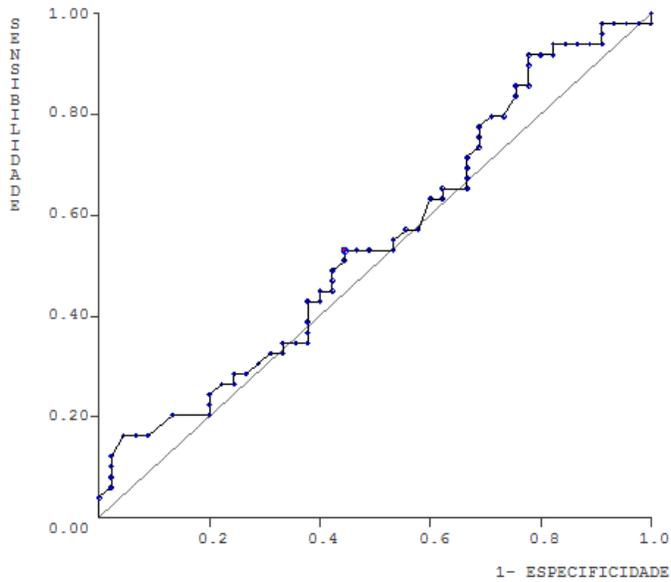
|                  |           | Média | Desvio<br>padrão | IC 95%     | Mediana | Mínimo-Máximo |
|------------------|-----------|-------|------------------|------------|---------|---------------|
| <b>Grupos</b>    | Controle  | 1,46  | 0,41             | 1,35-1,57  | 1,43    | 0,59-2,97     |
|                  | Esteatose | 1,57  | 0,48             | 1,43-1,71  | 1,47    | 0,88-2,94     |
| <b>Subgrupos</b> | Discreta  | 1,52  | 0,47             | 1,32-1,72  | 1,47    | 0,88-2,80     |
|                  | Moderada  | 1,58  | 0,43             | 1,37- 1,79 | 1,41    | 1,14-2,71     |
|                  | Acentuada | 1,71  | 0,56             | 1,32-2,10  | 1,60    | 1,09-2,94     |

O gráfico tipo *box-plot* a seguir (Figura 13) ilustra as medianas em todos os grupos em relação ao IP. Não houve diferença estatística comparando-se os grupos entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p=0,70$ ).



**Figura 13 – Gráfico *box-plot* do índice de pulsatilidade (IP) de acordo com o grau de esteatose à histologia. A linha horizontal dividindo cada box representa a mediana. Os valores descritos referem-se aos *outliers* (teste de Kruskal-Wallis;  $p=0,70$ ).**

Os dados da curva ROC para a variável IP, podem ser observados na Figura 14. O ponto de corte corresponde ao valor 1,44, que apresenta uma sensibilidade de 53,1% e especificidade de 55,6%. A área abaixo da curva é 0,5467 que é estatisticamente igual a 0,5 ( $p = 0,2188$ ).



**Figura 14 – Curva ROC para a sensibilidade plotada contra 1- especificidade da variável IP.**

#### **6.4- Técnica multivariada de análise discriminante linear para diagnóstico de esteatose**

A análise discriminante foi realizada com as variáveis IVP e padrão de OVF da veia hepática, que se mostraram significativas para diagnosticar a presença de esteatose.

Assim, obteve-se a seguinte função discriminante:

$$D = 16,15IVP + 1,96Veia\ Hepatica$$

em que, se  $D > 9,20$  o indivíduo pertence ao grupo controle, caso contrário ( $D < 9,20$ ) o indivíduo pertence ao grupo com esteatose. Em outras palavras, com a redução dos valores do IVP e com a diminuição da fasciculação da veia hepática houve a tendência de diagnosticar a presença da esteatose.

A estatística do teste de lambda de Wilks foi 0,4799 e o valor  $p < 0,0001$ , o que mostra que esta função foi significativa.

O resumo do desempenho da função discriminante D é apresentado na tabela 6.

A probabilidade de a função classificar uma pessoa saudável como portadora de esteatose é 2,04% e a probabilidade de classificar uma pessoa com esteatose como saudável é 28,57%, com índice geral de erro de 15,31% (15 em 98 pessoas).

Já as classificações corretas foram 97,96% (especificidade) para pessoas saudáveis e 71,43% (sensibilidade) para pessoas com esteatose e o índice geral de acerto (acurácia da função discriminante) foi 84,69% (83 em 98 pessoas).

**Tabela 6– Resumo do desempenho da função discriminante linear do IVP e padrão de OVF da veia hepática para diagnóstico de esteatose hepática de acordo com o diagnóstico histológico.**

| Grupos originais (biópsia) | Resultados obtidos pela função discriminante |                 |
|----------------------------|--|-----------------|
|                            | CONTROLE- n(%)                               | ESTEATOSE- n(%) |
| CONTROLE                   | 48 (97.96)                                   | 1 (2.04)        |
| ESTEATOSE                  | 14 (28.57)                                   | 35 (71.43)      |

## 7- DISCUSSÃO

---

A DHGNA possui um espectro de apresentação que vai desde a esteatose podendo evoluir para esteatohepatite, fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular (Charlton, 2008). O método diagnóstico mais frequente é pelo achado de aspecto sugestivo de esteatose à US (Wieckowska e Feldstein, 2008).

Neste estudo foi utilizado um grupo controle para comparação, sem fatores de risco para DHGNA, e este se confirmou saudável, com diferenciação satisfatória em relação ao grupo com esteatose.

Nesta amostra, de forma geral, as médias das enzimas hepáticas foram mais elevadas nos pacientes portadores de DHGNA do que nos controles. Isto foi observado mesmo quando essas médias mantiveram-se dentro dos limites da normalidade nos pacientes portadores de esteatose, como ocorreu com os níveis de AST, o que está de acordo com a literatura (Prashanth *et al.*, 2009).

O fato de alguns pacientes com DHGNA apresentarem níveis normais de enzimas hepáticas, mesmo com comprovação histológica de esteatohepatite, reafirma dados da literatura, de que as enzimas hepáticas estariam falsamente normais na maior parte destes pacientes (Browning *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2006). Portanto, o uso isolado destes índices não é suficiente para o diagnóstico da DHGNA.

No entanto, a DHGNA, devido a sua elevada prevalência, continua como a causa mais comum de alteração nos testes de função hepática em adultos (Angulo, 2002).

A DHGNA é considerada a manifestação hepática da síndrome metabólica (Hamaguchi *et al.*, 2005)

Todos os participantes do grupo com esteatose possuíam ao menos um fator etiológico- obesidade, dislipidemia ou diabetes mellitus- para a esteatose hepática.

A presença concomitante de múltiplos componentes da síndrome metabólica está associada com a gravidade da DHGNA (Marchesini *et al.*, 2003). Além disso, a prevalência da DHGNA também aumenta de acordo com o número de componentes da síndrome metabólica presentes (Leite *et al.*, 2014)

Em nosso estudo, 37 (75,51%) pacientes do grupo com esteatose eram dislipidêmicos. Sabe-se que em pacientes dislipidêmicos, a prevalência de DHGNA eleva-se para 50% (Hamer *et al.*, 2006).

Os níveis de triglicérides mostraram-se significativamente aumentados no grupo com esteatose em comparação ao grupo controle, concomitantemente a uma queda significativa dos níveis de HDL no grupo com esteatose, assim como na literatura (Karasin *et al.*, 2014).

Esses resultados eram esperados, uma vez que a dislipidemia está intimamente relacionada à esteatose hepática, inclusive como um de seus fatores de risco (Perazzo, Poynard e Dufour, 2014).

Neste estudo, 65,29% do grupo com esteatose era portador de algum grau de obesidade. A prevalência da DHGNA aumenta para cerca de 75% na população obesa (IMC $\geq$ 30 kg/m<sup>2</sup>) (Hamer *et al.*, 2006; Gaba *et al.*, 2012).

Apesar da patogênese da esteatose hepática relacionar-se a diversos fatores genéticos, ambientais e possuir ampla variabilidade entre os indivíduos, o índice de massa corporal parece correlacionar-se com a gravidade do acúmulo de gordura hepática (Goodman, 2014). Os resultados do presente estudo corroboram esta hipótese, uma vez

que houve uma correlação forte e positiva entre o grau de esteatose e o IMC ( $r= 0,77$ ;  $p<0,0001$ ) no grupo portador de esteatose.

Em contrapartida, a literatura mostra que nos pacientes obesos mórbidos, o grau de esteatose não se relaciona significativamente com o IMC (Dixon, Bhathal e O'brien, 2001), em concordância com os resultados deste estudo, em que no subgrupo de 12 pacientes portadores de esteatose e com obesidade grau III, não houve correlação entre o grau de esteatose e o IMC ( $r= - 0,05$ ;  $p=0,85$ ). Uma explicação plausível para este fenômeno seria de que neste subgrupo de pacientes, tanto o peso corporal quanto a esteatose estejam muito elevados (Goodman, 2014), porém isso não justifica os resultados no nosso restrito subgrupo de pacientes obesos mórbidos, pois sete (58,33%) pacientes apresentavam esteatose discreta, quatro (33,33%) esteatose moderada e apenas um (8,33%) esteatose acentuada. Mais estudos com maior número de pacientes neste subgrupo seriam necessários para conclusões adequadas.

Em nosso estudo, todos os nove pacientes que se submeteram a cirurgia bariátrica apresentavam algum grau de infiltração gordurosa hepática, sendo que quatro (44,4%) apresentavam esteatose discreta, quatro (44,4%) esteatose moderada e um (11,1%) esteatose acentuada. A literatura relata que 90% das biópsias hepáticas realizadas durante cirurgias bariátricas evidenciam algum grau de esteatose (Goodman, 2014; Mottin *et al.*, 2004).

Sabe-se que a resistência à insulina tem papel muito mais proeminente na patogênese da DHGNA do que a obesidade isoladamente (Bugianesi, Mccullough e Marchesini, 2005), uma vez que a resistência a insulina no adipócito parece ser o evento primário no desenvolvimento da DHGNA, com aumento da lipólise (Leite *et al.*, 2014).

Em nosso estudo, no grupo com esteatose, 15 (30,61%) pacientes eram portadores de diabetes mellitus tipo 2, em concordância com a literatura. Em estudos que avaliaram o papel do diabetes mellitus tipo 2 na esteatohepatite em pacientes obesos mórbidos, a prevalência de DM2 variou entre 14 a 28% (Boza *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2005).

O exame ultrassonográfico bidimensional convencional tem bom desempenho para detectar esteatose moderada e acentuada, com sensibilidade de 60-94% e especificidade de 85-95% (Joy, Thava e Scott, 2003), valores comparáveis a outras técnicas não invasivas de imagem (Khov, Sharma e Riley, 2014).

No entanto, o diagnóstico de esteatose discreta pode ser difícil sem um método computadorizado.

Neste estudo, houve diferenças estatisticamente significantes ( $p= 0,03$ ) no que se refere à gradação da esteatose pela ultrassonografia bidimensional quando comparado aos achados histológicos nos pacientes portadores de DHGNA: a avaliação realizada pela ultrassonografia bidimensional mostrou uma tendência em classificar a grande maioria dos pacientes como portadores de esteatose moderada e acentuada (71,42%). Já o estudo histológico classificou 55,09% dos pacientes do grupo com esteatose nesta subcategoria.

Estes resultados podem advir da subjetividade dos parâmetros para avaliação dos graus de esteatose pela ecografia bidimensional, apesar destes critérios estarem bem estabelecidos na literatura (Khov, Sharma e Riley, 2014; Goldberg e Petterson, 1996; Badea *et al.*, 2000). Outra hipótese é que a presença de fibrose, encontrada na maioria dos pacientes deste estudo, assim como na literatura (Goodman, 2014) possa ter levado

a uma superestimação da gradação da esteatose, uma vez que a hiperecogenicidade é parâmetro para os dois diagnósticos, o que diminui sua especificidade (Valls *et al.*, 2006).

Tal fato reforça a necessidade de utilização conjunta da ultrassonografia convencional e outras técnicas não invasivas, de baixo custo e alta disponibilidade, como o método Doppler, na tentativa de gradação mais acurada da esteatose hepática.

No presente estudo, avaliaram-se parâmetros hemodinâmicos dos três principais vasos hepáticos a fim de medir o impacto da esteatose, no contexto da DHGNA, na impedância vascular (artéria hepática por meio do índice de resistividade e índice de pulsatilidade e veia porta por meio do índice venoso portal) e no padrão de onda na veia hepática, em seu ramo direito.

O valor clínico do Doppler na hemodinâmica hepática nos quadros de hipertensão portal está bem estabelecido. Já a contribuição da esteatose, inflamação e fibrose na DHGNA para alterar os parâmetros hemodinâmicos hepáticos venosos e arteriais é foco de interesse mais atual.

O conhecimento atual sugere que a esteatose causa aumento do volume da massa celular hepática e, devido à limitada distensibilidade da cápsula do órgão, geraria compressão e diminuição da complacência venosa intra-hepática (Mohammadi, Afshin *et al.*, 2011; Karabulut *et al.*, 2004). Portanto, na esteatose avançada, haveria compressão e redução do fluxo no sistema porta, com conseqüente aumento compensatório do fluxo no sistema arterial (Kakkos *et al.*, 2000).

A veia porta foi avaliada hemodinamicamente pelo cálculo do índice de pulsatilidade venosa portal (IVP). Este parâmetro tem como principal vantagem não depender da angulação para obtenção de velocidades reais, o que o torna mais reprodutível (Rocha *et al.*, 2012). O fato de o paciente interromper os movimentos

respiratórios durante o exame da veia porta previne as flutuações da onda devido a respiração o que proporciona medidas mais acuradas (Karasin *et al.*, 2014).

Observou-se diminuição do IVP quando se compara o grupo controle com o grupo com esteatose, sendo as médias de cada grupo  $0,35 \pm 0,08$  e  $0,21 \pm 0,10$  e as medianas  $0,32$  e  $0,21$ ; respectivamente. Um estudo que avaliou pacientes com DHGNA encontrou valores semelhantes a estes, com médias de  $0,42 \pm 0,92$  para o grupo controle e  $0,25 \pm 0,50$  para o grupo com esteatose (Solhjo *et al.*, 2011). Achados semelhantes foram descritos também em publicações que abordaram outras doenças hepáticas crônicas. Um estudo que avaliou a influência da fibrose sobre o IVP em pacientes portadores de hepatite C encontrou média de  $0,33 \pm 0,07$  para o grupo controle e  $0,23 \pm 0,09$  para o grupo com esteatose (Rocha *et al.*, 2012). Em outra publicação que avaliou pacientes com hipertensão portal foram encontradas  $0,39 \pm 0,10$  e  $0,23 \pm 0,08$  com médias para o grupo controle e grupo com esteatose, respectivamente (Barakat, 2002). Isto significa que a onda de fluxo tornou-se menos fásica na presença da esteatose, o que reflete a diminuição da complacência do vaso. Estes achados podem ser resultados da compressão sinusoidal tanto por hepatócitos repletos de gordura quanto por fibrose e proliferação de fibroblastos no espaço perissinusoidal (Solhjo *et al.*, 2011). No entanto, a correlação do IVP com a presença de fibrose e de inflamação não foi estatisticamente significativa neste estudo; portanto tais resultados podem ser atribuíveis ao efeito da esteatose sobre a fasicidade da veia porta.

Os achados de não correlação dos valores de IVP e a gradação da esteatose no atual estudo estão de acordo com algumas publicações (Ulusan, Yakar e Koc, 2011; Solhjo *et al.*, 2011). No entanto, outras mostraram diminuição do IVP à medida que o grau de esteatose aumentou (Balci *et al.*, 2008; Erdogmus *et al.*, 2008). Em todos os estudos citados, a gradação da esteatose foi baseada na avaliação ecográfica

bidimensional do fígado, sendo que em um deles, dos 31 pacientes do grupo com esteatose, apenas 11 foram submetidos à biópsia hepática (Solhjoo *et al.*, 2011), o que torna estes achados mais vulneráveis a erro. A presente investigação, por basear-se nos achados histológicos como parâmetro de comparação para todos os 49 pacientes, permite uma avaliação mais fidedigna da gradação da esteatose e da presença de inflamação e fibrose. Além disso, a análise histológica foi feita por dois patologistas com posterior discussão e consenso em relação aos achados. No entanto, o número reduzido de pacientes com esteatose acentuada (oito pacientes) pode constituir um fator limitador deste estudo e futuras análises com maior número de pacientes no referido subgrupo são necessárias.

O desempenho do IVP como teste diagnóstico foi testado por meio da construção da curva ROC (*receiver operating characteristic*), que reforçou o IVP como um parâmetro de alta sensibilidade (91,00%) para o diagnóstico de esteatose; especificidade de 79,60% e acurácia de 85,70%, quando comparado ao padrão-ouro, o estudo histológico. O melhor valor de *cutoff* do IVP foi 0,26. O valor preditivo positivo foi de 81,82% e o valor preditivo negativo 90,66%; índices adequados para a sua aplicação na prática clínica como ferramenta de rastreamento.

Poucos estudos na literatura realizaram análise semelhante. Em um estudo no qual o IVP foi avaliado como método não invasivo para o diagnóstico de fibrose em pacientes com hepatite C, o *cutoff* ideal foi 0,28 com sensibilidade de 73,5% e especificidade de 71,1% (Rocha *et al.*, 2012). Esses resultados sugerem que o IVP seja um índice mais adequado para o diagnóstico de esteatose do que de fibrose.

Ainda há controvérsias acerca dos efeitos da DHGNA no padrão de onda da veia hepática (Aslan *et al.*, 2014). Há muitos estudos que avaliam este parâmetro em doenças parenquimatosas crônicas, principalmente na hipertensão portal, mas poucos que o fazem

no cenário da doença hepática gordurosa não-alcóolica (Dietrich *et al.*, 1998; Oguzkurt *et al.*, 2005).

No presente estudo, esta avaliação foi feita na veia hepática direita, uma vez que os movimentos cardíacos frequentemente geram artefatos no Doppler da veia hepática esquerda e a avaliação da veia hepática média frequentemente mostra artefatos advindos dos movimentos respiratórios (Dietrich *et al.*, 1998).

O padrão trifásico constitui o padrão regular normal da veia hepática, possui dois picos anterógrados e um curto fluxo reverso devido à sístole atrial; no padrão bifásico há diminuição da amplitude de oscilação e perda do fluxo reverso e no padrão monofásico a onda é contínua e achatada, sem periodicidade (Karabulut *et al.*, 2004). Na esteatose, o aumento do volume dos hepatócitos gera compressão da veia hepática, uma vez que a distensibilidade da cápsula hepática é restrita (Karabulut *et al.*, 2004). A literatura tem mostrado que na esteatose o padrão de onda da veia hepática é mais frequentemente anormal, bifásico ou monofásico, do que em voluntários saudáveis (Mohammadi, A. *et al.*, 2011; Karabulut *et al.*, 2004; Solhjoo *et al.*, 2011; Dietrich *et al.*, 1998; Oguzkurt *et al.*, 2005; Borges *et al.*, 2011; Topal *et al.*, 2014). Os achados do presente estudo corroboram estes dados, uma vez que 30 de 48 pacientes (62,5%) com esteatose apresentaram padrão anormal da veia hepática, sendo 22 (45,83%) com padrão monofásico e 8 (16,66%) com padrão bifásico, em comparação com apenas 3 (6,37%) voluntários saudáveis. Em concordância, um estudo com 40 pacientes portadores de esteatose hepática, 43% mostravam padrões anormais de OVF da veia hepática e 2% dos indivíduos saudáveis (Oguzkurt *et al.*, 2005).

No entanto, não houve diferença significativa da frequência do padrão anormal entre os subgrupos de pacientes portadores de esteatose, em concordância com vários estudos na literatura (Solhjoo *et al.*, 2011; Aslan *et al.*, 2014; Oguzkurt *et al.*, 2005; Borges

*et al.*, 2011). Pode-se inferir que o padrão de onda da veia hepática é um parâmetro hemodinâmico adequado para detecção de esteatose, mas não distingue entre os graus de infiltração gordurosa. Além disso, o fato de haver pacientes sem esteatose que possuem padrão anormal de onda, como no presente estudo e na literatura, (Mohammadi, A. *et al.*, 2011; Oguzkurt *et al.*, 2005; Borges *et al.*, 2011; Topal *et al.*, 2014) gera a possibilidade de diagnósticos falso-positivos, com diminuição da especificidade.

Os estudos que abordaram este tema na literatura, utilizaram como parâmetro comparativo métodos de imagem como a ultrassonografia bidimensional (Mohammadi, A. *et al.*, 2011; Karabulut *et al.*, 2004; Aslan *et al.*, 2014), tomografia computadorizada (Oguzkurt *et al.*, 2005) ou ressonância magnética (Topal *et al.*, 2014), exceto um estudo que, assim como este, utilizou achados histológicos (Borges *et al.*, 2011).

A presença de inflamação não mostrou correlação com o padrão de OVF da veia hepática e a presença de fibrose correlacionou-se fracamente com este parâmetro. Portanto, no presente estudo, a análise dopplervelocimétrica da veia hepática direita mostrou-se mais correlacionada com a esteatose, com acurácia de 78,12% para o diagnóstico de DHGNA.

O suprimento sanguíneo para o fígado é de cerca de 1450 ml/min e provém tanto da veia porta, responsável por 1100 ml/min, quanto da artéria hepática que contribui com 350 ml/min (Ac e Je, 1996). No jejum, a artéria hepática possui baixa resistividade, uma vez que o fígado requer fluxo sanguíneo contínuo (Mcnaughton e Abu-Yousef, 2011). Historicamente, a resistência arterial tem sido analisada quantitativamente por meio dos índices de resistividade (IR) e de pulsatilidade (IP), sendo o primeiro o mais utilizado.

Os valores normais do IR estão entre 0,6-0,7 (Ma, 2000), mas podem variar em uma faixa mais ampla de 0,55-0,81 (Mcnaughton e Abu-Yousef, 2011). Os valores do IR

no grupo controle relatados na literatura corroboram esta faixa mais ampla:  $0,65\pm 0,07$  (Aslan *et al.*, 2014)  $0,77\pm 0,03$  (Mohammadi, A. *et al.*, 2011);  $0,81\pm 0,04$  (Mihmanli *et al.*, 2005);  $0,82\pm 0,4$  (Topal *et al.*, 2014), assim como o valor encontrado no presente estudo, de  $0,72\pm 0,08$ .

A literatura é extensamente controversa em relação às alterações hemodinâmicas da artéria hepática secundárias à esteatose, mas vários estudos mostram uma diminuição do IR com o aumento da gradação da esteatose, em relação inversa e significativa (Mohammadinia *et al.*, 2010; Mihmanli *et al.*, 2005; Mohammadi, A. *et al.*, 2011). Em concordância com estes achados, há estudo que demonstrou aumento significativo do IR da artéria hepática após o tratamento da DHGNA (Tarzamni *et al.*, 2014).

Na presença de inflamação e fibrose este mesmo fenômeno verificado na esteatose pode ocorrer (Mohammadinia *et al.*, 2010; Bayard, Holt e Boroughs, 2006). Sem a análise histológica como parâmetro comparativo, não é possível certificar-se de que a alteração do IR foi devido à esteatose ou a outra lesão hepática. As presenças de inflamação e de fibrose, no presente estudo, não se correlacionaram aos valores de IR ou de IP.

O mecanismo subjacente tanto na esteatose, como na inflamação e fibrose seria a compressão das estruturas da tríade portal, que compromete mais precocemente a veia porta, com conseqüente redução do seu fluxo e aumento compensatório do fluxo diastólico na artéria hepática, que gera redução do índice de resistividade (Mihmanli *et al.*, 2005). A própria estrutura da parede venosa, menos espessa e mais complacente do que a parede das artérias pode ser a base deste fenômeno.

No entanto, outros estudos mostraram resultados opostos, com aumento do IR no grupo com DHGNA em comparação ao grupo controle (Hizli *et al.*, 2010; Topal *et al.*,

2014), o que foi justificado pelo aumento da resistência periférica na microcirculação arterial devido a progressão da fibrose.

Já neste estudo, os parâmetros hemodinâmicos da artéria hepática, representados pelo IR e IP não se mostraram capazes de distinguir o grupo controle do grupo com esteatose, nem tampouco diferenciar os graus de esteatose hepática. Com relação ao IR, resultados semelhantes a estes foram encontrados em um estudo no qual não houve diferença significativa entre o grupo controle e o portador de esteatose, nem tampouco entre os subgrupos da esteatose (Aslan *et al.*, 2014).

Estas variações encontradas nos valores dos parâmetros hemodinâmicos da artéria hepática nos diferentes estudos podem advir da técnica utilizada para obtenção da onda espectral do Doppler, uma vez que o local de posicionamento do transdutor influencia os resultados e pode ser em segmentos arteriais intra-hepáticos (Hizli *et al.*, 2010); no hilo hepático (Mohammadi, A. *et al.*, 2011; Topal *et al.*, 2014; Aslan *et al.*, 2014), como neste estudo; ou no cruzamento da artéria hepática com o ramo principal da veia porta (Mihmanli *et al.*, 2005; Popov *et al.*, 2012; Hizli *et al.*, 2010). Além disso, a etnia, o gênero, a idade (Yazdi e Sotoudeh, 2006) e as configurações dos equipamentos de ultrassonografia (Hizli *et al.*, 2010) podem ser fatores influenciadores.

Poucos estudos avaliaram o IP e ainda mais raros são aqueles que analisaram o seu papel na avaliação da esteatose e, portanto, os dados acerca de seus valores normais são restritos. Descreveu-se 1,82 como a mediana do IP do grupo controle (Topal *et al.*, 2014) e o presente estudo mostrou média de  $1,46 \pm 0,41$  e mediana de 1,43; sem diferença significativa com o grupo portador de esteatose. Em uma das primeiras publicações que correlacionou o IP com o grau de esteatose, o valor mais baixo desse parâmetro foi encontrado no grupo com esteatose moderada (Topal *et al.*, 2014). Mais

estudos que avaliem o IP poderão contribuir para melhor entendimento de seu valor diagnóstico na DHGNA.

A obtenção de uma função discriminante tem como objetivo a melhoria diagnóstica por meio da conjugação de diversos parâmetros, antes utilizados isoladamente. Não é do nosso conhecimento um estudo na literatura que tenha realizado semelhante análise em portadores de DHGNA comparando-se com dados histológicos.

Neste estudo buscaram-se conjugar em uma mesma função os dois parâmetros que mostram, quando analisados isoladamente, capacidade de diferenciar o paciente saudável do portador de esteatose, ou seja, o IVP e o padrão de OVF da veia hepática.

Desta forma, conseguiu-se aumentar expressivamente a especificidade do método Doppler para 97,96% neste grupo de pacientes. Já o uso isolado do IVP obteve especificidade de 79,6% e do padrão de OVF da veia hepática de 93,61%.

Além disso, com a análise discriminante, houve um aumento importante da sensibilidade e acurácia do Doppler no diagnóstico da esteatose hepática quando comparado ao uso isolado do padrão de OVF da veia hepática.

Conclui-se que a análise discriminante proposta é um método de simples realização, passível de ser utilizado na prática clínica, que aumenta a sensibilidade, especificidade e acurácia da avaliação hemodinâmica hepática no diagnóstico da esteatose.

No entanto, na atualidade, o estudo histológico ainda mantém-se essencial para o diagnóstico de EENA e para a gradação da esteatose simples, uma vez que os parâmetros hemodinâmicos estudados mostraram-se limitados para estes fins.

## 8- CONCLUSÃO

---

A infiltração gordurosa dos hepatócitos causa alterações hemodinâmicas hepáticas que podem ser utilizadas para diagnóstico da DHGNA.

1. Os efeitos mais proeminentes foram encontrados na veia porta, por meio da diminuição do índice de pulsatilidade venosa portal e na veia hepática, com as alterações do padrão da onda de velocidade de fluxo.
2. Os índices de resistividade e de pulsatilidade da artéria hepática não se mostraram eficazes para detectar a esteatose.
3. Os índices hemodinâmicos hepáticos, de forma geral, possuem limitações para quantificar o conteúdo gorduroso hepatocitário quando comparados aos achados histológicos.
4. Os parâmetros do Doppler estudados, mostraram maior correlação com a esteatose do que com inflamação e fibrose.
5. A análise discriminante que utiliza as variáveis IVP e padrão de OVF da veia hepática aumenta expressivamente a acurácia, sensibilidade e especificidade do método Doppler para o diagnóstico de esteatose, com fácil aplicação na prática clínica.

## 9- REFERÊNCIAS

---

AC, G.; JE, H. **Textbook of Medical Physiology**. 9th. Philadelphia: WB Saunders Co, 1996.

ADAMS, L. A. et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. **Gastroenterology**, v. 129, n. 1, p. 113-21, Jul 2005. ISSN 0016-5085.

ANGULO, P. Nonalcoholic fatty liver disease. **N Engl J Med**, v. 346, n. 16, p. 1221-31, Apr 2002. ISSN 1533-4406.

ARAÚJO, L.M.B.; OLIVEIRA, D.A., NUNES, D.S. Liver and billiary ultrassonography in diabetic and non-diabetic obese women. **Diabetes & Metabolism**, v.24, p. 458-62, 1998.

ASLAN, A. et al. Effects of Nonalcoholic Fatty Liver Disease on the Hepatic Vein and Artery. **Journal of Medical Diagnostic Methods**, v. 3, n. 2, p. 4, 2014.

BADEA, R. et al. **Tratat de Ultrasonografie Clinică**. Medicală, București, 2000.

BAFFY, G.; BRUNT, E. M.; CALDWELL, S. H. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: An emerging menace. **Journal of Hepatology**, v. 56, n. 6, p. 1384–1391, 2012.

BALCI, A. et al. Effects of diffuse fatty infiltration of the liver on portal vein flow hemodynamics. **Journal of Clinical Ultrasound**, v. 36, n. 3, p. 134–140, 2008.

BARAKAT, M. Portal vein pulsatility and spectral width changes in patients with portal hypertension: relation to the severity of liver disease. **Br J Radiol**, v. 75, n. 893, p. 417-21, May 2002. ISSN 0007-1285.

BAR\_SIC', N., IVAN et al. Overview and developments in noninvasive diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 30, p. 3945–3954, 2012.

BAYARD, M.; HOLT, J.; BOROUGHS, E. Nonalcoholic fatty liver disease. **Am Fam Physician**, v. 73, n. 11, p. 1961-8, Jun 2006. ISSN 0002-838X.

BEDOSSA, P. et al. Evidence for a role of nonalcoholic steatohepatitis in hepatitis C: a prospective study. **Hepatology**, v. 46, n. 2, p. 380-7, Aug 2007. ISSN 0270-9139.

BORGES, V. F. D. A. E. et al. **Dopplerfluxometria da veia hepática em pacientes com esteatose não alcoólica**. **Radiologia Brasileira**, v. 44, n. 1, p. 1-6, 2011.

BOZA, C. et al. Predictors of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) in obese patients undergoing gastric bypass. **Obes Surg**, v. 15, n. 8, p. 1148-53, Sep 2005. ISSN 0960-8923.

BRAVO, A. A.; SHETH, S. G.; CHOPRA, S. Liver biopsy. **N Engl J Med**, v. 344, n. 7, p. 495-500, Feb 2001. ISSN 0028-4793.

BROWNING, J. D. et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. **Hepatology**, v. 40, n. 6, p. 1387-95, Dec 2004. ISSN 0270-9139.

BRUNT, E. M. Nonalcoholic steatohepatitis: pathologic features and differential diagnosis. **Semin Diagn Pathol**, v. 22, n. 4, p. 330-8, Nov 2005. ISSN 0740-2570.

BRUNT, E. M. et al. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. **Am J Gastroenterol**, v. 94, n. 9, p. 2467-74, Sep 1999. ISSN 0002-9270.

BRUNT, E. M. et al. Portal chronic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): a histologic marker of advanced NAFLD-Clinicopathologic correlations from the nonalcoholic steatohepatitis clinical research network. **Hepatology**, v. 49, n. 3, p. 809-20, Mar 2009. ISSN 1527-3350.

BRUNT, E. M. et al. Concurrence of histologic features of steatohepatitis with other forms of chronic liver disease. **Mod Pathol**, v. 16, n. 1, p. 49-56, Jan 2003. ISSN 0893-3952.

BRUNT, E. M.; TINIAKOS, D. G. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. **World J Gastroenterol**, v. 16, n. 42, p. 5286-96, Nov 2010. ISSN 2219-2840.

BUGIANESI, E.; MCCULLOUGH, A. J.; MARCHESINI, G. Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. **Hepatology**, v. 42, n. 5, p. 987-1000, Nov 2005. ISSN 0270-9139.

CALDWELL, S. H.; CRESPO, D. M. The spectrum expanded: cryptogenic cirrhosis and the natural history of non-alcoholic fatty liver disease. **J Hepatol**, v. 40, n. 4, p. 578-84, Apr 2004. ISSN 0168-8278.

CHALASANI, N. et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. **Hepatology**, v. 55, n. 2005-2023, 2012.

CHARATCHAROENWITTHAYA, P.; LINDOR, K. D. Role of radiologic modalities in the management of non-alcoholic steatohepatitis. **Clinics in Liver Disease**, v. 11, n. 1, p. 37-54, 2007.

CHARLTON, M. Nonalcoholic fatty liver disease: a review of current understanding and future impact. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 2, n. 12, p. 1048-58, Dec 2004. ISSN 1542-3565.

CHARLTON, M. Cirrhosis and liver failure in nonalcoholic fatty liver disease: Molehill or mountain? **Hepatology**, v. 47, n. 5, p. 1431-3, May 2008. ISSN 1527-3350.

CHARLTON, M. R. et al. Frequency and outcomes of liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis in the United States. **Gastroenterology**, v. 141, n. 4, p. 1249-53, Oct 2011. ISSN 1528-0012.

CHEN, C. H. et al. The accuracy of sonography in predicting steatosis and fibrosis in chronic hepatitis C. **Dig Dis Sci**, v. 53, n. 6, p. 1699-706, Jun 2008. ISSN 0163-2116.

CHEN, C. H. et al. Association between nonalcoholic fatty liver disease and coronary artery calcification. **Dig Dis Sci**, v. 55, n. 6, p. 1752-60, Jun 2010. ISSN 1573-2568.

CLARK, J. M. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. **J Clin Gastroenterol**, v. 40 Suppl 1, p. S5-10, Mar 2006. ISSN 0192-0790.

COHEN, J. C.; HORTON, J. D.; HOBBS, H. H. Human fatty liver disease: old questions and new insights. **Science**, v. 332, n. 6037, p. 1519-23, Jun 2011. ISSN 1095-9203.

COLLOREDO, G. et al. Impact of liver biopsy size on histological evaluation of chronic viral hepatitis: the smaller the sample, the milder the disease. **J Hepatol**, v. 39, n. 2, p. 239-44, Aug 2003. ISSN 0168-8278.

CONJEEVARAM, H. S. et al. Race, insulin resistance and hepatic steatosis in chronic hepatitis C. **Hepatology**, v. 45, n. 1, p. 80-7, Jan 2007. ISSN 0270-9139.

CORTEZ-PINTO, H. et al. Hepatic stellate cell activation occurs in nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatogastroenterology**, v. 48, n. 37, p. 87-90, 2001 Jan-Feb 2001. ISSN 0172-6390.

DASARATHY, S. et al. Validity of real time ultrasound in the diagnosis of hepatic steatosis: a prospective study. **J Hepatol**, v. 51, n. 6, p. 1061-7, Dec 2009. ISSN 1600-0641.

DE LÉDINGHEN, V. et al. Non-invasive diagnosis of liver steatosis using controlled attenuation parameter (CAP) and transient elastography. **Liver Int**, v. 32, n. 6, p. 911-8, Jul 2012. ISSN 1478-3231.

DE MEIJER, V. E. et al. Systematic review and meta-analysis of steatosis as a risk factor in major hepatic resection. **Br J Surg**, v. 97, n. 9, p. 1331-9, Sep 2010. ISSN 1365-2168.

DIETRICH, C. F. et al. Hepatic and portal vein flow pattern in correlation with intrahepatic fat deposition and liver histology in patients with chronic hepatitis C. **AJR Am J Roentgenol**, v. 171, n. 2, p. 437-43, Aug 1998. ISSN 0361-803X.

DIXON, J. B.; BHATHAL, P. S.; O'BRIEN, P. E. Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. **Gastroenterology**, v. 121, n. 1, p. 91-100, Jul 2001. ISSN 0016-5085.

DOLCE, C. J. et al. Does liver appearance predict histopathologic findings: prospective analysis of routine liver biopsies during bariatric surgery. **Surg Obes Relat Dis**, v. 5, n. 3, p. 323-8, 2009 May-Jun 2009. ISSN 1550-7289.

DUSEJA, A. et al. Insulin tolerance test is comparable to homeostasis model assessment for insulin resistance in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **Indian J Gastroenterol**, v. 26, n. 4, p. 170-3, 2007 Jul-Aug 2007. ISSN 0254-8860.

EISENBERG, E. et al. Prevalence and characteristics of pain induced by percutaneous liver biopsy. **Anesthesia & Analgesia**, v. 96, n. 5, p. 1392-1396, 2003.

EKSTEDT, M. et al. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. **Hepatology**, v. 44, n. 4, p. 865-73, Oct 2006. ISSN 0270-9139.

ERDOGMUS, B. et al. Portal vein hemodynamics in patients with non-alcoholic fatty liver disease. **Tohoku J Exp Med**, v. 215, n. 1, p. 89-93, May 2008. ISSN 1349-3329.

FARRELL, G. C. et al. Guidelines for the assessment and management of non-alcoholic fatty liver disease in the Asia-Pacific region: executive summary. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 22, n. 6, p. 775-7, Jun 2007. ISSN 0815-9319.

FARRELL, G. C.; LARTER, C. Z. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. **Hepatology**, v. 43, n. 2 Suppl 1, p. S99-S112, Feb 2006. ISSN 0270-9139.

FELDSTEIN, A. E.; GORES, G. J. Apoptosis in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. **Front Biosci**, v. 10, p. 3093-9, 2005. ISSN 1093-9946.

FREITAS, L. A. R.; COTRIM, H. P. **Atlas NASH: Guia fotográfico da Esteato-Hepatite Não Alcoólica**. 1.ed. São Paulo: 2006.

FRIEDMAN, L. Controversies in liver biopsy: who, where, when, how, why? **Current Gastroenterology Reports**, v. 6, n. 1, p. 30-36, 2004.

FUKUSATO, T. et al. Interobserver variation in the histopathological assessment of nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatol Res**, v. 33, n. 2, p. 122-7, Oct 2005. ISSN 1386-6346.

GABA, R. C. et al. Hepatic steatosis: correlations of body mass index, CT fat measurements, and liver density with biopsy results. **Diagn Interv Radiol**, v. 18, n. 3, p. 282-7, 2012 May-Jun 2012. ISSN 1305-3612.

GERSTENMAIER, J. F.; GIBSON, R. N. Ultrasound in chronic liver disease. **Insights Imaging**, v. 5, n. 4, p. 441-55, Aug 2014. ISSN 1869-4101.

GOLDBERG, B.; PETTERSON, H. **The Nicer Year Book 1996**. ISIS Medical Media, 1996.

GOODMAN, Z. D. The Impact of Obesity on Liver Histology. **Clinics in Liver Disease**, v. 18, p. 33-40, 2014.

GUIU, B. et al. Magnetic resonance imaging and spectroscopy for quantification of hepatic steatosis: urgent need for standardization! **J Hepatol**, v. 51, n. 6, p. 1082-3; author reply 1083-4, Dec 2009. ISSN 1600-0641.

HALLSWORTH, K. et al. Cardiac structure and function are altered in adults with non-alcoholic fatty liver disease. **J Hepatol**, v. 58, n. 4, p. 757-62, Apr 2013. ISSN 1600-0641.

HAMAGUCHI, M. et al. The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. **Ann Intern Med**, v. 143, n. 10, p. 722-8, Nov 2005. ISSN 1539-3704.

HAMER, O. W. et al. Fatty liver: imaging patterns and pitfalls. **Radiographics**, v. 26, n. 6, p. 1637-53, 2006 Nov-Dec 2006. ISSN 1527-1323.

HASHIMOTO, E. et al. Hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. **J Gastroenterol**, v. 44 Suppl 19, p. 89-95, 2009. ISSN 0944-1174.

HEBBARD, L.; GEORGE, J. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 8, n. 1, p. 35-44, Jan 2011. ISSN 1759-5053.

HERNAEZ, R. et al. Diagnostic accuracy and reliability of ultrasonography for the detection of fatty liver: a meta-analysis. **Hepatology**, v. 54, n. 3, p. 1082-90, Sep 2011. ISSN 1527-3350.

HIZLI, S. et al. Hepatic artery resistance in children with obesity and fatty liver. **Indian J Pediatr**, v. 77, n. 4, p. 407-11, Apr 2010. ISSN 0973-7693.

HÜBSCHER, S. G. Histological assessment of non-alcoholic fatty liver disease. **Histopathology**, v. 49, n. 5, p. 450-65, Nov 2006. ISSN 0309-0167.

ISHAK, K. et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. **J Hepatol**, v. 22, n. 6, p. 696-9, Jun 1995. ISSN 0168-8278.

JOHNSON, R. A.; WICHERN, D. W. **Applied Multivariate Statistical Analysis**. 6 th. Hardcover, 2007.

JOY, D.; THAVA, V. R.; SCOTT, B. B. Diagnosis of fatty liver disease: is biopsy necessary? **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 15, n. 5, p. 539-43, May 2003. ISSN 0954-691X.

JUNG, D. H. et al. Relationship of hepatic steatosis and alanine aminotransferase with coronary calcification. **Clin Chem Lab Med**, v. 48, n. 12, p. 1829-34, Dec 2010. ISSN 1434-6621.

KAKKOS, S. K. et al. Fatty liver in obesity: relation to Doppler perfusion index measurement of the liver. **Scand J Gastroenterol**, v. 35, n. 9, p. 976-80, Sep 2000. ISSN 0036-5521.

KANG, H. et al. Metabolic syndrome is associated with greater histologic severity, higher carbohydrate, and lower fat diet in patients with NAFLD. **Am J Gastroenterol**, v. 101, n. 10, p. 2247-53, Oct 2006. ISSN 0002-9270.

KARABULUT, N. et al. Doppler waveform of the hepatic veins in an obese population. **Eur Radiol**, v. 14, n. 12, p. 2268-72, Dec 2004. ISSN 0938-7994.

KARASIN, M. et al. The Doppler ultrasonographic evaluation of hemodynamic changes in hepatic vascular structures in patients with hepatosteatosi. **Pol J Radiol**, v. 79, p. 299-304, 2014. ISSN 1733-134X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25214932>>.

KHOV, N.; SHARMA, A.; RILEY, T. R. Bedside ultrasound in the diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 22, p. 6821-5, Jun 2014. ISSN 2219-2840.

KIM, M. Y. et al. Histological subclassification of cirrhosis using the Laennec fibrosis scoring system correlates with clinical stage and grade of portal hypertension. **J Hepatol**, v. 55, n. 5, p. 1004-9, Nov 2011. ISSN 1600-0641.

KIM, M. Y.; JEONG, W. K.; BAIK, S. K. Invasive and non-invasive diagnosis of cirrhosis and portal hypertension. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 15, p. 4300-15, Apr 2014. ISSN 2219-2840.

KISTLER, K. D. et al. Physical activity recommendations, exercise intensity, and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. **Am J Gastroenterol**, v. 106, n. 3, p. 460-8; quiz 469, Mar 2011. ISSN 1572-0241.

KLEINER, D. E. et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 41, n. 6, p. 1313-21, Jun 2005. ISSN 0270-9139.

LACKNER, C. et al. Ballooned hepatocytes in steatohepatitis: the value of keratin immunohistochemistry for diagnosis. **J Hepatol**, v. 48, n. 5, p. 821-8, May 2008. ISSN 0168-8278.

LARSON, S. P. et al. Histopathologic variability between the right and left lobes of the liver in morbidly obese patients undergoing Roux-en-Y bypass. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 5, n. 11, p. 1329-32, Nov 2007. ISSN 1542-7714.

LEE, M. J. et al. Liver steatosis assessment: Correlations among pathology, radiology, clinical data and automated image analysis software. **Pathology – Research and Practice**, v. 209, p. 371– 379, 2013.

LEE, S. S. et al. Non-invasive assessment of hepatic steatosis: prospective comparison of the accuracy of imaging examinations. **J Hepatol**, v. 52, n. 4, p. 579-85, Apr 2010. ISSN 1600-0641.

LEITE, N. C. et al. Non-alcoholic fatty liver disease and diabetes: from physiopathological interplay to diagnosis and treatment. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 26, p. 8377-92, Jul 2014. ISSN 2219-2840.

LEITE, N. C. et al. Histopathological stages of nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes: prevalences and correlated factors. **Liver Int**, v. 31, n. 5, p. 700-6, May 2011. ISSN 1478-3231.

LEMOINE, M.; SERFATY, L. [Nonalcoholic fatty liver disease]. **Presse Med**, v. 41, n. 2, p. 169-89, Feb 2012. ISSN 0755-4982.

LIMA, M. L. et al. Hepatic histopathology of patients with morbid obesity submitted to gastric bypass. **Obes Surg**, v. 15, n. 5, p. 661-9, May 2005. ISSN 0960-8923.

LIU, J. et al. Fatty liver, abdominal adipose tissue and atherosclerotic calcification in African Americans: the Jackson Heart Study. **Atherosclerosis**, v. 224, n. 2, p. 521-5, Oct 2012. ISSN 1879-1484.

LUDWIG, J. et al. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 55, n. 7, p. 434-438, 1980.

MA, P. **Doppler ultrasound of the liver**. London: Churchill Livingstone, 2000.

MARCHESINI, G. et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. **Hepatology**, v. 37, n. 4, p. 917-23, Apr 2003. ISSN 0270-9139.

MARKIN, R. S. et al. Frozen section evaluation of donor livers before transplantation. **Transplantation**, v. 56, n. 6, p. 1403-9, Dec 1993. ISSN 0041-1337.

MARSMAN, H. et al. Assessment of donor liver steatosis: pathologist or automated software? **Hum Pathol**, v. 35, n. 4, p. 430-5, Apr 2004. ISSN 0046-8177.

MATHIESEN, U. L. et al. Increased liver echogenicity at ultrasound examination reflects degree of steatosis but not of fibrosis in asymptomatic patients with mild/moderate abnormalities of liver transaminases. **Dig Liver Dis**, v. 34, n. 7, p. 516-22, Jul 2002. ISSN 1590-8658.

MATTEONI, C. A. et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. **Gastroenterology**, v. 116, n. 6, p. 1413-9, Jun 1999. ISSN 0016-5085.

MCCULLOUGH, A. J. Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis. **J Clin Gastroenterol**, v. 40 Suppl 1, p. S17-29, Mar 2006. ISSN 0192-0790.

MCNAUGHTON, D. A.; ABU-YOUSEF, M. M. Doppler US of the liver made simple. **Radiographics**, v. 31, n. 1, p. 161-88, 2011 Jan-Feb 2011. ISSN 1527-1323.

MIHMANLI, I. et al. Effect of diffuse fatty infiltration of the liver on hepatic artery resistance index. **J Clin Ultrasound**, v. 33, n. 3, p. 95-9, 2005 Mar-Apr 2005. ISSN 0091-2751.

MISHRA, P.; YOUNOSSI, Z. M. Abdominal ultrasound for diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Am J Gastroenterol**, v. 102, n. 12, p. 2716-7, Dec 2007. ISSN 0002-9270.

MOHAMMADI, A. et al. Effect of severity of steatosis as assessed ultrasonographically on hepatic vascular indices in non-alcoholic fatty liver disease. **Med Ultrason**, v. 13, n. 3, p. 200-6, Sep 2011. ISSN 2066-8643.

MOHAMMADINIA, A. R. et al. Correlation of hepatic vein Doppler waveform and hepatic artery resistance index with the severity of nonalcoholic fatty liver disease. **J Clin Ultrasound**, v. 38, n. 7, p. 346-52, Sep 2010. ISSN 1097-0096.

MOTTIN, C. C. et al. The role of ultrasound in the diagnosis of hepatic steatosis in morbidly obese patients. **Obes Surg**, v. 14, n. 5, p. 635-7, May 2004. ISSN 0960-8923.

MOUCARI, R. et al. Insulin resistance in chronic hepatitis C: association with genotypes 1 and 4, serum HCV RNA level, and liver fibrosis. **Gastroenterology**, v. 134, n. 2, p. 416-23, Feb 2008. ISSN 1528-0012.

MUSSO, G. et al. Meta-analysis: natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. **Ann Med**, v. 43, n. 8, p. 617-49, Dec 2011. ISSN 1365-2060.

NAGAI, S. et al. Mild hepatic macrovesicular steatosis may be a risk factor for hyperbilirubinaemia in living liver donors following right hepatectomy. **British Journal of Surgery**, v. 96, n. 4, p. 437–444, 2009.

NOUREDDIN, M. et al. Utility of magnetic resonance imaging versus histology for quantifying changes in liver fat in nonalcoholic fatty liver disease trials. **Hepatology**, v. 58, n. 6, p. 1930-40, Dec 2013. ISSN 1527-3350.

OGUZKURT, L. et al. Hepatic vein Doppler waveform in patients with diffuse fatty infiltration of the liver. **Eur J Radiol**, v. 54, n. 2, p. 253-7, May 2005. ISSN 0720-048X.

ONG, J. P.; PITTS, A.; YOUNOSSI, Z. M. Increased overall mortality and liver-related mortality in non-alcoholic fatty liver disease. **J Hepatol**, v. 49, n. 4, p. 608-12, Oct 2008. ISSN 0168-8278.

ONG, J. P. et al. Chronic hepatitis C and superimposed nonalcoholic fatty liver disease. **Liver**, v. 21, n. 4, p. 266-71, Aug 2001. ISSN 0106-9543.

PARISE, E. et al. Prevalence of liver steatosis in abdominal ultrasound. **Gastroenterologia e endoscopia digestiva**, v. 22, p. 235-237, 2003.

PERAZZO, H.; POYNARD, T.; DUFOUR, J. F. The interactions of nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular diseases. **Clin Liver Dis**, v. 18, n. 1, p. 233-48, Feb 2014. ISSN 1557-8224.

PILLAI, A. A.; RINELLA, M. E. Non-alcoholic fatty liver disease: is bariatric surgery the answer? **Clin Liver Dis**, v. 13, n. 4, p. 689-710, Nov 2009. ISSN 1557-8224.

PINTO, H. C. et al. Nonalcoholic steatohepatitis. Clinicopathological comparison with alcoholic hepatitis in ambulatory and hospitalized patients. **Dig Dis Sci**, v. 41, n. 1, p. 172-9, Jan 1996. ISSN 0163-2116.

POPOV, D. et al. Doppler parameters of hepatic and renal hemodynamics in patients with liver cirrhosis. **Int J Nephrol**, v. 2012, p. 961654, 2012. ISSN 2090-2158.

POREPA, L. et al. Newly diagnosed diabetes mellitus as a risk factor for serious liver disease. **CMAJ**, v. 182, n. 11, p. E526-31, Aug 2010. ISSN 1488-2329.

POYNARD, T.; RATZIU, V.; BEDOSSA, P. Appropriateness of liver biopsy. **Can J Gastroenterol**, v. 14, n. 6, p. 543-8, Jun 2000. ISSN 0835-7900.

POYNARD, T. et al. Effect of treatment with peginterferon or interferon alfa-2b and ribavirin on steatosis in patients infected with hepatitis C. **Hepatology**, v. 38, n. 1, p. 75-85, Jul 2003. ISSN 0270-9139.

PRASHANTH, M. et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus. **J Assoc Physicians India**, v. 57, p. 205-10, Mar 2009. ISSN 0004-5772.

RAFIQ, N. et al. Long-term follow-up of patients with nonalcoholic fatty liver. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 7, n. 2, p. 234-8, Feb 2009. ISSN 1542-7714.

RATZIU, V. et al. A survey of patterns of practice and perception of NAFLD in a large sample of practicing gastroenterologists in France. **J Hepatol**, v. 57, n. 2, p. 376-83, Aug 2012. ISSN 1600-0641.

RATZIU, V. et al. Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. **Gastroenterology**, v. 128, n. 7, p. 1898-906, Jun 2005. ISSN 0016-5085.

RATZIU, V. et al. Liver fibrosis in overweight patients. **Gastroenterology**, v. 118, n. 6, p. 1117-23, Jun 2000. ISSN 0016-5085.

REGEV, A. et al. Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection. **Am J Gastroenterol**, v. 97, n. 10, p. 2614-8, Oct 2002. ISSN 0002-9270.

RILEY, T. R.; TAHERI, M.; SCHREIBMAN, I. R. Does weight history affect fibrosis in the setting of chronic liver disease? **J Gastrointest Liver Dis**, v. 18, n. 3, p. 299-302, Sep 2009. ISSN 1841-8724.

ROCHA, H. L. et al. Assessment of portal venous index as a non-invasive method for diagnosing liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. **Arq Gastroenterol**, v. 49, n. 1, p. 14-8, 2012 Jan-Mar 2012. ISSN 1678-4219.

ROUVINEN-WATT, K. et al. **Evidence of endoplasmic reticulum stress and liver inflammation in the American mink *Neovison vison* with benign hepatic steatosis. Journal of Comparative Physiology B**, v. 184, n. 7, p. 913-927, 2014.

SANTOS, R. D. et al. Hepatic steatosis is associated with a greater prevalence of coronary artery calcification in asymptomatic men. **Atherosclerosis**, v. 194, n. 2, p. 517-9, Oct 2007. ISSN 1879-1484.

SANYAL, A. J. et al. Nonalcoholic fatty liver disease in patients with hepatitis C is associated with features of the metabolic syndrome. **Am J Gastroenterol**, v. 98, n. 9, p. 2064-71, Sep 2003. ISSN 0002-9270.

SCATARIGE, J. C. et al. Fatty infiltration of the liver: ultrasonographic and computed tomographic correlation. **Journal of Ultrasound in Medicine**, v. 3, n. 1, p. 9-14, 1984.

SCHWENZER, N. F. et al. Non-invasive assessment and quantification of liver steatosis by ultrasound, computed tomography and magnetic resonance. **J Hepatol**, v. 51, n. 3, p. 433-45, Sep 2009. ISSN 1600-0641.

SHAPIRO, R. S. et al. Variability of hepatic vein Doppler tracings in normal subjects. **J Ultrasound Med**, v. 12, n. 12, p. 701-3, Dec 1993. ISSN 0278-4297.

SOLHJOO, E. et al. Comparison of portal vein doppler indices and hepatic vein doppler waveform in patients with nonalcoholic fatty liver disease with healthy control. **Hepat Mon**, v. 11, n. 9, p. 740-4, Sep 2011. ISSN 1735-3408.

STRAUSS, S. et al. Interobserver and intraobserver variability in the sonographic assessment of fatty liver. **AJR Am J Roentgenol**, v. 189, n. 6, p. W320-3, Dec 2007. ISSN 1546-3141.

STUMPTNER, C. et al. Mallory body--a disease-associated type of sequestosome. **Hepatology**, v. 35, n. 5, p. 1053-62, May 2002. ISSN 0270-9139.

SUMIDA, Y.; NAKAJIMA, A.; ITOH, Y. Limitations of liver biopsy and non-invasive diagnostic tests for the diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease nonalcoholic steatohepatitis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 2, p. 475-485, 2014.

SUNG, K. C. et al. Fatty liver, insulin resistance, and features of metabolic syndrome: relationships with coronary artery calcium in 10,153 people. **Diabetes Care**, v. 35, n. 11, p. 2359-64, Nov 2012. ISSN 1935-5548.

SUZUKI, A. et al. Values and limitations of serum aminotransferases in clinical trials of nonalcoholic steatohepatitis. **Liver international**, v. 26, n. 10, p. 1209–1216, 2006.

TAKUMA, Y.; NOUSO, K. Nonalcoholic steatohepatitis-associated hepatocellular carcinoma: our case series and literature review. **World J Gastroenterol**, v. 16, n. 12, p. 1436-41, Mar 2010. ISSN 2219-2840.

TARGHER, G. et al. Relations between carotid artery wall thickness and liver histology in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. **Diabetes Care**, v. 29, n. 6, p. 1325-30, Jun 2006. ISSN 0149-5992.

TARZAMNI, M. K. et al. Hepatic Artery and Portal Vein Doppler Indexes in Non-alcoholic Fatty Liver Disease Before and After Treatment to Prevent Unnecessary Health Care Costs. **International Journal of Preventive Medicine**, v. 5, n. 4, p. 472–477, 2014.

TEIXEIRA, A. R. et al. The incapacity of the surgeon to identify NASH in bariatric surgery makes biopsy mandatory. **Obes Surg**, v. 19, n. 12, p. 1678-84, Dec 2009. ISSN 1708-0428.

TERJUNG, B. et al. Bleeding complications after percutaneous liver biopsy. An analysis of risk factors. **Digestion**, v. 67, n. 3, p. 138-45, 2003. ISSN 0012-2823.

TOPAL, N. B. et al. Effects of fat accumulation in the liver on hemodynamic variables assessed by doppler ultrasonography. **J Clin Ultrasound**, May 2014. ISSN 1097-0096.

TRIVERDI, I.; RINELLA, M. E. NAFLD and cardiovascular disease: can the real association be determined? **Current Hepatology**, v. 13, p. 130-141, 2014.

ULUSAN, S.; YAKAR, T.; KOC, Z. Evaluation of Portal Venous Velocity with Doppler Ultrasound in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Korean Journal of Radiology**, v. 12, n. 4, p. 450-455, 2011.

VALLS, C. et al. Fat in the liver: diagnosis and characterization. **Eur Radiol**, v. 16, n. 10, p. 2292-308, Oct 2006. ISSN 0938-7994.

VILGRAIN, V. et al. Hepatic steatosis: a major trap in liver imaging. **Diagn Interv Imaging**, v. 94, n. 7-8, p. 713-27, 2013 Jul-Aug 2013. ISSN 2211-5684.

VUPPALANCHI, R. et al. Effects of liver biopsy sample length and number of readings on sampling variability in nonalcoholic Fatty liver disease. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 7, n. 4, p. 481-6, Apr 2009. ISSN 1542-7714.

WASHINGTON, K. et al. Hepatic stellate cell activation in nonalcoholic steatohepatitis and fatty liver. **Hum Pathol**, v. 31, n. 7, p. 822-8, Jul 2000. ISSN 0046-8177.

WIECKOWSKA, A.; FELDSTEIN, A. E. Diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease: invasive versus noninvasive. **Seminars in Liver Disease**, v. 28, n. 4, p. 386-395, 2008.

WIECKOWSKA, A.; MCCULLOUGH, A. J.; FELDSTEIN, A. E. Noninvasive diagnosis and monitoring of nonalcoholic steatohepatitis: present and future. **Hepatology**, v. 46, n. 2, p. 582-9, Aug 2007. ISSN 0270-9139.

WILLIAMS, C. D. et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. **Gastroenterology**, v. 140, n. 1, p. 124-31, Jan 2011. ISSN 1528-0012.

WILLNER, I. R. et al. Ninety patients with nonalcoholic steatohepatitis: insulin resistance, familial tendency, and severity of disease. **Am J Gastroenterol**, v. 96, n. 10, p. 2957-61, Oct 2001. ISSN 0002-9270.

YAZDI, H. R.; SOTOUDEH, H. Assessment of Normal Doppler Parameters of Portal Vein and Hepatic Artery in 37 Healthy Iranian Volunteers. **Iranian Journal of Radiology**, v. 3, n. 4, p. 213-216, 2006a.

YOUNOSSI, Z. M. et al. Nonalcoholic fatty liver disease: assessment of variability in pathologic interpretations. **Mod Pathol**, v. 11, n. 6, p. 560-5, Jun 1998. ISSN 0893-3952.

YOUNOSSI, Z. M. et al. Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver diseases in the United States from 1988 to 2008. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 9, n. 6, p. 524-530.e1; quiz e60, Jun 2011. ISSN 1542-7714.

## 10-ANEXOS

### 10.1-ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ESTUDO DOS ÍNDICES DOPPLERVELOCIMÉTRICOS DOS VASOS HEPÁTICOS E SUA RELAÇÃO COM O GRAU DE ESTEATOSE EM PACIENTES PORTADORES DE DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA

**Pesquisador:** ANGÉLICA LEMOS DEBZ DINIZ

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 13469413.6.0000.5152

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Uberlândia/ UFU/ MG

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 379.516

**Data da Relatoria:** 30/08/2013

##### Apresentação do Projeto:

Segundo apresenta o protocolo:

A esteatose é definida histologicamente quando 5% ou mais dos hepatócitos contêm triglicérides. A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) se relaciona diretamente com a síndrome metabólica e foi descrita por Ludwig e colaboradores (1980), em 20 mulheres obesas e diabéticas, com achados histológicos semelhantes aos da doença hepática alcoólica (DHA), sem história de ingestão significativa de bebidas alcoólicas (LUDWIG; VIGGIANO; MCGILL et al., 1980). Embora os achados histológicos da DHGNA possam se apresentar semelhantes aos observados na doença hepática alcoólica, por definição, esta doença ocorre em pacientes sem consumo abusivo de álcool, ou seja, inferior a 70 gramas de álcool por semana para mulheres e 140 g/semana se homens (GEORGE e FARRELL, 2005). A esteatose é um achado obrigatório para o diagnóstico da DHGNA e o diagnóstico nem sempre é feito porque a maioria dos pacientes é assintomática e menos de 50% têm enzimas hepáticas elevadas (CLARK, BRANCATI e DIEHL, 2003). A biópsia hepática é determinante na caracterização dos diferentes espectros da DHGNA. É um procedimento que, além de confirmar a suspeita clínica, fornece informação quanto à intensidade da inflamação e da fibrose, além de avaliar a coexistência com outras doenças (BRUNT, 2009). A biópsia hepática atualmente é método diagnóstico padrão, porém com limitações: procedimento

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica  
 Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144  
 UF: MG Município: UBERLÂNDIA  
 Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 379.518

invasivo que impõe riscos, sujeito a erro amostral, variabilidade interobservador e avaliação não dinâmica (RATZIU, CHARLOTTE, HEUTIER, et al., 2005). Estas limitações têm estimulado a procura de métodos não invasivos para avaliação da esteatose, da inflamação e da fibrose na DHGNA (SAADEH, YOUNOSSI, REMER et al., 2002; WIECKOWSKA e FELDSTEIN, 2008). A ultrassonografia (USG) é a modalidade de imagem mais frequentemente indicada no diagnóstico e avaliação da esteatose hepática por tratar-se de um método não invasivo, amplamente disponível e de baixo custo (SAADEH, YOUNOSSI, REMER et al., 2002; HAMAGUCHI, KOJIMA, ITOH, 2007; HARATCHAROENWITTHAYA e LINDOR, 2007). A USG bidimensional convencional é uma ferramenta de uso estabelecido para rastreamento, com sensibilidade e especificidade aceitáveis na detecção da esteatose. Contudo as limitações são a baixa acurácia em diferir esteatose de fibrose e baixa reprodutibilidade na quantificação do grau de esteatose, por tratar-se de método examinador dependente e com avaliação muitas vezes subjetiva (SAADEH, YOUNOSSI, REMER et al., 2002; CHARATCHAROENWITTHAYA e LINDOR, 2007). O uso da USG com Doppler é outra modalidade que pode ser útil no diagnóstico de infiltração gordurosa (OH, WINN, POORDAD, 2008), com avaliação das alterações dos padrões de fluxo sanguíneo portal, nas veias hepáticas e na artéria hepática. O conhecimento atual sugere que a esteatose causa aumento do volume da massa celular hepática e, devido a limitada distensibilidade da cápsula do órgão, gera compressão e diminuição da com placência venosa intra-hepática (MOHHAMMADI, GASEMI-RAD, ZAHEDI et al., 2011). A metodologia da dopplervelocimetria não envolve exposição à radiação, é amplamente disponível e de baixo custo. Além disso, prolonga a duração do exame ultrassonográfico rotineiro em apenas um a dois minutos (SERIFE, TOLGA, ZAFER, 2011), características altamente desejáveis na prática clínica diária.

Este estudo será realizado no Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), que oferece cerca de 500 leitos e assistência terciária à população da cidade de Uberlândia e região. Desta instituição, estarão envolvidos o Ambulatório Específico de Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica (DHGNA), localizado no Ambulatório Central Amélio Marques, o Laboratório de Patologia Clínica, o serviço de Anatomia Patológica e o serviço de Ultra-sonografia. Complementarmente, alguns pacientes poderão ser selecionados do Serviço de Cirurgia Bariátrica do Hospital Santa Clara e terão o exame ultrassonográfico realizado no CDE (Centro de Diagnósticos Especializados), ambos os serviços localizados na cidade de Uberlândia. Tal fato justifica-se na tentativa de obtenção de pacientes portadores de DHGNA com esteatose acentuada. A obtenção de dados demográficos, das medidas antropométricas como altura e peso e a avaliação

**Endereço:** Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica  
**Bairro:** Santa Mônica **CEP:** 38.408-144  
**UF:** MG **Município:** UBERLÂNDIA  
**Telefone:** (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
UBERLÂNDIA/MG



Continuação do Parecer: 379.516

de possíveis comorbidades orgânicas serão realizadas durante consultas ambulatoriais. Os seguintes exames serão realizados: hemograma completo, lipidograma plasmático, coagulograma, proteínas totais e frações, aspartato aminotransferase, alanino aminotransferase, fosfatase alcalina, gama-glutamil transferase, bilirrubina total e frações, glicemia, insulinemia, marcadores para hepatite B e C, autoanticorpos, cobre e ceruloplasmina séricos, perfil de ferro. Todos os voluntários serão examinados por USG em modo B (modo britho) e com Doppler, utilizando-se transdutor convexo multifrequencial de 2 a 5 MHz (Voluson 730 PRO V, General Electric, Milwaukee, USA). O Doppler será acionado sobre a veia porta, veia hepática e artéria hepática. A biópsia hepática por agulha de Tru-cut será colhida do lobo direito do fígado durante a ultrassonografia. A avaliação do material será realizada por dois patologistas, sem conhecerem os dados ultrassonográficos correspondentes. O intervalo entre a realização do exame ultrassonográfico e a biópsia será de, no máximo, trinta dias. A esteatose será classificada como discreta (até 33% dos hepatócitos infiltrados por gotículas de gordura), moderada (de 33 a 66%) e acentuada (mais de 66% de infiltração gordurosa em hepatócitos). O infiltrado inflamatório será discriminado em intensidade discreta, moderada e acentuada. A fibrose será descrita segundo a localização no ácino hepático, o aspecto e a intensidade. Serão incluídos, também, outros 40 voluntários, saudáveis, sem fatores de risco para DHGNA, ingestão alcoólica nenhuma ou mínima, sem diabetes ou obesidade, os quais constituirão o grupo controle (sem esteatose). O grupo controle será submetido à mesma avaliação do grupo doente, exceto biópsia hepática, por motivos éticos. Serão utilizados dados de 40 pacientes e 40 voluntários saudáveis já coletados pela orientadora em trabalho anterior sobre DHGNA, realizado no HC-UFU e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP). Esses dados serão analisados segundo a metodologia descrita acima, reavaliados histologicamente pelos dois patologistas e acrescidos aos dados a serem coletados, compondo a amostragem total. A análise estatística será realizada usando o software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS para Windows, versão 16.0; Chicago; IL). A distribuição dos dados será analisada usando o teste de normalidade de Lilliefors. As variáveis contínuas serão expressas como média  $\pm$  desvio padrão, mediana e quartis, quando apropriado, e comparadas utilizando análise de variância entre médias (ANOVA) e teste de Tukey para análise pós Hoc. As variáveis categóricas serão expressas por frequência absoluta (n) e relativa (%) e analisadas utilizando os testes de Mann-Whitney e Fischer. As análises de correlação serão realizadas utilizando o coeficiente de Spearman. Todos os testes de significância serão bilaterais, com adoção do nível de significância de 0,05 e níveis descritivos (P) inferiores a esse valor foram considerados significantes.

**Endereço:** Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica  
**Bairro:** Santa Mônica **CEP:** 38.408-144  
**UF:** MG **Município:** UBERLÂNDIA  
**Telefone:** (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
UBERLÂNDIA/MG



Continuação do Parecer: 379.516

**Critério de Inclusão:** a) Presença de esteatose verificada por ultrassonografia; b) Idade de 18-70 anos, ambos os sexos; c) Consentimento por escrito após esclarecimento verbal informado.

**Critério de Exclusão:** a) Ingestão de álcool > 140g/semana para homens e > 70g/semana para mulheres; b) Uso de medicações conhecidamente hepatotóxicas como, por exemplo, tetraciclina, amiodarona, alfametilidopa e tamoxifeno; c) Hepatites virais crônicas B ou C; d) Hemocromatose; e) Doença de Wilson; f) Deficiência de alfa 1-antitripsina; g) Hepatite autoimune; h) Outras hepatopatias crônicas, hipertensão portal, cirrose, ascite e insuficiência hepática; i) Qualquer distúrbio de coagulação sanguínea, por mínimo que fosse; j) Cardiopatias, isquemia aguda coronariana, cerebral ou periférica; k) Insuficiência respiratória; l) Lesões hepáticas focais; m) Gravidez e lactação; n) Recusa em participar da pesquisa.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo primário:**

Avaliar a correlação entre os padrões hemodinâmicos da veia porta, veia hepática direita e artéria hepática, calculados pela dopplervelocimetria, com graus de esteatoepatite e fibrose hepáticas, previamente determinadas pelo estudo histológico.

**Objetivo Secundário:**

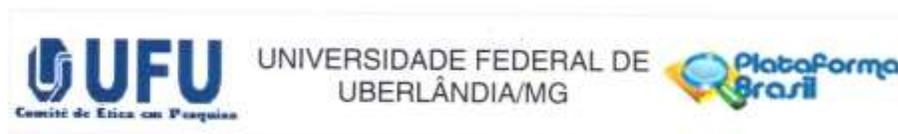
Analisar o grau de associação das alterações histológicas (esteatose, fibrose e inflamação) com os índices dopplervelocimétricos da veia porta no grupo de pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Segundo os pesquisadores:

**Riscos:** A biópsia hepática percutânea é um procedimento seguro, sendo descrita uma taxa de mortalidade de 0,01% (POYNARD, 2000) nos estudos que incluíram pacientes com neoplasias e insuficiência hepática com distúrbios da coagulação. Conforme já citado nos critérios de exclusão, pacientes/voluntários com neoplasia, insuficiência hepática ou distúrbios de coagulação serão excluídos da pesquisa. Dentre os sujeitos da pesquisa é esperada complicação menor com dor leve e autolimitada, que é frequente, ocorrendo em até 30% (POYNARD, 2000), mas geralmente bem tolerada e localiza-se principalmente no local da punção e no ombro direito. Dor intensa pode

**Endereço:** Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica  
**Bairro:** Santa Mônica **CEP:** 38.408-144  
**UF:** MG **Município:** UBERLÂNDIA  
**Telefone:** (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 379/516

ocorrer em 1,5 a 3,0% (EISENBERG, 2003). O risco de hemorragia subclínica é de 0,35 a 1,6% e o risco de punção de órgãos adjacentes é de 0,01 a 0,1% (TERJUNG et al, 2003) O paciente/voluntário passará por monitoração rigorosa e repouso após a coleta da biópsia (mínimo de 4 horas). Esta monitoração tem objetivo de detectar complicações precocemente para tratá-las da forma mais adequada, por meio de observação intra-hospitalar caso seja necessária no período após a biópsia (mínimo de 24 horas) (JACOBS, 1989). A literatura é clara no julgamento que a realização da biópsia sob visão ultra-sonográfica é um procedimento que minimiza riscos (TERJUNG et al, 2003). São considerados como fatores de risco no procedimento a experiência do médico, a técnica utilizada (preferencialmente guiada por ultra-som) e o número de passagens (ou tentativas). Nesta pesquisa serão feitas 1 ou 2 passagens apenas. A biópsia hepática percutânea guiada por ultra-som é, portanto, segura em pacientes selecionados, ou seja, excluídos aqueles com condições que aumentem o risco de hemorragia (6 a 10 vezes), a saber, encefalopatia, ascite, insuficiência hepática, icterícia grave e evidência de obstrução biliar extrahepática, coagulopatia significativa, doenças graves em outros órgãos (como insuficiência cardíaca congestiva) ou idade avançada. Voluntários com estes fatores de risco não serão incluídos, até mesmo porque a cirrose hepática, que é a hepatopatia que se manifesta com estes sinais de gravidade, não é objeto deste estudo (FIRPI, 2005). Com relação à experiência do médico, a pesquisadora, Dra. Angélica Lemos Debs Diniz é médica especialista pelo Colégio Brasileiro de Radiologia e habilitada a realizar procedimentos invasivos guiados por ultra-sonografia segundo as normas desta entidade. Este protocolo está de acordo com as recomendações de segurança preconizadas em todo o mundo, inclusive porque a biópsia guiada por ultra-sonografia tem a grande vantagem em relação à biópsia às cegas por detectar complicações possíveis muito precocemente, a tempo de serem contornadas.

Os benefícios serão o diagnóstico mais específico da hepatopatia e melhor estadiamento da DHGNA já que alguns marcadores séricos de fibrose hepática e exames de imagem podem sugerir a gravidade da fibrose, mas nenhum desses é capaz de substituir a biópsia, método este considerado padrão ouro no diagnóstico da gravidade da fibrose hepática. Os pacientes que se recusarem a participar do estudo terão a mesma assistência, mesmo acompanhamento, orientação e atendimentos necessários ao seu tratamento, não havendo nenhum prejuízo para o mesmo.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa apresenta grande relevância clínico-científica.

**Endereço:** Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica  
**Bairro:** Santa Mônica **CEP:** 38.408-144  
**UF:** MG **Município:** UBERLÂNDIA  
**Telefone:** (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
UBERLÂNDIA/MG



Continuação do Parecer: 373.516

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Apresenta todos os documentos obrigatórios.

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de inadequações:**

Todas as pendências listadas no parecer nº 345.736, de 19 de Julho de 2013, foram atendidas.

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Data para entrega de Relatório Final ao CEP/UFU: setembro de 2014.

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 466/12, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 466/12/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Orientações ao pesquisador:

∟ O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS

**Endereço:** Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica  
**Bairro:** Santa Mônica **CEP:** 38.408-144  
**UF:** MG **Município:** UBERLÂNDIA  
**Telefone:** (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
UBERLÂNDIA/MG



Continuação do Parecer: 379.518

466/12 ) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.

¿ O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS ), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.

¿ O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária ¿ ANVISA ¿ junto com seu posicionamento.

¿ Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res.251/97, item III,2.e). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma.

UBERLÂNDIA, 30 de Agosto de 2013

Assinador por:  
Sandra Terezinha de Farias Furtado  
(Coordenador)

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica  
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144  
UF: MG Município: UBERLÂNDIA  
Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br

## 10.2-ANEXO B                      Análise histológica

Data \_\_\_\_\_

NÚMERO DO PACIENTE \_\_\_\_\_

### 1. ESPECIFICAÇÃO DA BIÓPSIA

Tamanho Biopsia |\_\_\_\_|mm

Nº fragmentos |\_\_\_\_| Nº tratos portais |\_\_\_\_| Nº veias centrais |\_\_\_\_|

### 2. ESTEATOSE (macro vacuolar)

Intensidade ( 0 ) ausente ( 1 ) até 33% ( 2 ) 33% a 66% ( 3 ) > 6%

Localização ( 1 ) zona 1 ( 2 ) zonas 2 e 3

### 3. ESTEATOSE (micro vacuolar)

Intensidade ( 0 ) ausente ( 1 ) presente

Localização ( 1 ) zona 1 ( 2 ) zonas 2 e 3

### 4. BALONIZAÇÃO HEPATOCELULAR

Intensidade ( 0 ) ausente ( 1 ) ocasional ( 2 ) freqüente

Localização ( 1 ) zona 1 ( 2 ) zonas 2 e 3

### 5. INFLAMAÇÃO LOBULAR - focos inflamatórios 20 X 20

Intensidade ( 0 )ausente( 1 ) 1-2 focos( 2 ) 3-4 focos ( 3 ) + 4 focos

Fenótipo celular ( 1 ) mono. ( 2 ) granulo. ( 3 ) misto ( ) lipogranulomas

### 6. INFLAMAÇÃO DO TRATO PORTAL

Intensidade ( 0 ) ausente ( 1 )discreta ( 2 ) moderada ( 3 )acentuada

Fenótipo celular ( 1 ) mononuclear (2) granulocitário ( 3 ) misto

## 7. HIALINO DE MALLORY

( 0 ) ausente ( 1 ) presente

## 8. APOPTOSE

( 0 ) ausente ( 1 ) presente

## 9. INCLUSÃO NUCLEAR DE GLICOGÊNIO

Intensidade ( 0 ) ausente ( 1 ) ocasional ( 2 ) freqüente

Localização ( 1 ) zona 1 ( 2 ) zonas 2 e 3

## 10. FIBROSE

PERI-SINUSOIDAL/PERI-VENULAR( 0 ) ausente ( 1 ) até 33% ( 2 ) 33% a 66% ( 3 ) >66%

PORTAL ( 0 ) ausente ( 1 ) expansão do trato portal ( 2 ) fibrose peri-portal

SEPTAL ( 0 ) ausente ( 1 ) raros septos ( 2 ) diversos sem nodularidade ( 3 ) cirrose

## 11. CONCLUSÃO

- **Diagnóstico:** ( ) Esteatose ( ) Esteatohepatite

- Escore de atividade da DHGNA (**NAS**): esteatose + inflamação + balonização (0-8): \_\_\_\_\_

Esteatose: 0 (<5%); 1 (5- 33%); 2 (33- 66%); 3 ( > 66%)

Inflamação lobular: 0; 1 (<2 focos); 2 ( 2-4 focos); 3 ( >4 focos)

Balonização: 0; 1 (poucos); 2 (muitos)

### - Fibrose

Estágio 0 – ausência de fibrose.

Estágio 1a – fibrose perisinusoidal (zona 3), leve.

Estágio 1 b- fibrose perisinusoidal (zona 3), moderada.

Estágio 1 c- apenas fibrose portal/perportal.

Estágio 2 – fibrose perisinusoidal (zona 3) e fibrose peortal/perportal.

Estágio 3 – fibrose em ponte.

Estágio 4 - cirrose.

## 10.3- ANEXO C

## 10.3.1- DADOS GRUPO CONTROLE

|    | - 1 -<br>Idade | - 2 -<br>Gênero | - 3 -<br>IMC | - 4 -<br>Grau esteatose | - 5 -<br>Lobo dir figado | - 6 -<br>Lobo esq figado | - 7 -<br>IVP veia porta | - 8 -<br>Padrão fluxo ve | - 9 -<br>IP Art. Hepatic | - 10 -<br>IR Art. Hepatic |
|----|----------------|-----------------|--------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
|    | IDADE          | SEXO            | imc          | Grau USG                | Lobo dir Figado          | Lobo esq Fig (           | ivp corrigido           | Veia Hepatica            | IP Art Hep               | IR Art Hep%               |
| 1  | 48.000         | 2.000           | 24.300       | 0.000                   | 16.000                   | 8.660                    | 0.410                   | 2.000                    | 1.670                    | 0.690                     |
| 2  | 50.000         | 2.000           | 22.890       | 0.000                   | 14.290                   | 9.150                    | 0.310                   | 3.000                    | 1.860                    | 0.810                     |
| 3  | 51.000         | 2.000           | 21.160       | 0.000                   | 17.000                   | 8.730                    | 0.240                   | 3.000                    | 1.410                    | 0.760                     |
| 4  | 27.000         | 2.000           | 21.480       | 0.000                   | 14.820                   | 9.320                    | 0.420                   | 3.000                    | 1.180                    | 0.680                     |
| 5  | 48.000         | 2.000           | 22.770       | 0.000                   | 12.760                   | 6.750                    | 0.280                   | 3.000                    | 1.600                    | 0.740                     |
| 6  | 55.000         | 2.000           | 21.630       | 0.000                   | 14.030                   | 7.690                    | 0.250                   | 3.000                    | 2.370                    | 0.870                     |
| 7  | 29.000         | 1.000           | 21.390       | 0.000                   | 14.670                   | 11.590                   | 0.320                   | 3.000                    | 1.770                    | 0.750                     |
| 8  | 36.000         | 2.000           | 26.040       | 0.000                   | 13.910                   | 7.670                    | 0.270                   | 3.000                    | 1.170                    | 0.700                     |
| 9  | 33.000         | 2.000           | 20.200       | 0.000                   | 15.720                   | 10.410                   | 0.360                   | 3.000                    | 0.850                    | 0.600                     |
| 10 | 49.000         | 2.000           | 17.750       | 0.000                   | 14.140                   | 8.030                    | 0.380                   | 3.000                    | 1.010                    | 0.570                     |
| 11 | 29.000         | 1.000           | 22.880       | 0.000                   | 17.890                   | 9.410                    | 0.450                   | 3.000                    | 1.530                    | 0.730                     |
| 12 | 31.000         | 2.000           | 18.660       | 0.000                   | 14.570                   | 10.150                   | 0.390                   | 3.000                    | 1.420                    | 0.700                     |
| 13 | 29.000         | 2.000           | 17.990       | 0.000                   | 14.220                   | 9.900                    | 0.350                   | 3.000                    | 1.310                    | 0.740                     |
| 14 | 33.000         | 2.000           | 20.450       | 0.000                   | 13.060                   | 10.370                   | 0.330                   | 3.000                    | 1.480                    | 0.770                     |
| 15 | 31.000         | 2.000           | 23.240       | 0.000                   | 17.070                   | 10.850                   | 0.320                   | 3.000                    | 0.890                    | 0.810                     |
| 16 | 48.000         | 2.000           | 26.710       | 0.000                   | 14.050                   | 7.260                    | 0.330                   | 3.000                    | 1.270                    | 0.710                     |
| 17 | 31.000         | 2.000           | 19.960       | 0.000                   | 15.090                   | 9.090                    | 0.260                   | 3.000                    | 1.140                    | 0.680                     |
| 18 | 27.000         | 1.000           | 25.510       | 0.000                   | 16.360                   | 11.840                   | 0.360                   | 3.000                    | 1.650                    | 0.760                     |
| 19 | 27.000         | 1.000           | 22.600       | 0.000                   | 13.570                   | 10.660                   | 0.350                   | 3.000                    | 2.020                    | 0.810                     |
| 20 | 27.000         | 1.000           | 22.910       | 0.000                   | 15.500                   | 10.520                   | 0.380                   | 3.000                    | 1.000                    | 0.650                     |
| 21 | 28.000         | 1.000           | 22.490       | 0.000                   | 15.440                   | 9.920                    | 0.300                   | 3.000                    | 1.530                    | 0.750                     |
| 22 | 48.000         | 1.000           | 23.570       | 0.000                   | 15.620                   | 5.960                    | 0.280                   | 3.000                    | 1.710                    | 0.740                     |
| 23 | 47.000         | 2.000           |              | 0.000                   | 14.100                   | 9.900                    | 0.250                   | 3.000                    | 0.790                    | 0.480                     |
| 24 | 50.000         | 1.000           |              | 0.000                   | 12.760                   | 8.410                    | 0.580                   | 3.000                    | 2.190                    | 0.860                     |
| 25 | 31.000         | 1.000           |              | 0.000                   | 14.350                   | 7.240                    | 0.310                   | 3.000                    | 1.230                    | 0.690                     |
| 26 | 70.000         | 2.000           | 19.740       | 0.000                   | 10.900                   | 9.430                    | 0.250                   | 3.000                    | 1.780                    | 0.780                     |
| 27 | 51.000         | 1.000           | 25.550       | 0.000                   | 15.730                   | 10.950                   | 0.300                   | 3.000                    | 1.720                    | 0.750                     |
| 28 | 49.000         | 2.000           | 22.770       | 0.000                   | 15.880                   | 6.850                    | 0.470                   | 3.000                    | 1.860                    | 0.800                     |
| 29 | 45.000         | 2.000           | 20.580       | 0.000                   | 12.390                   | 8.530                    | 0.300                   | 3.000                    | 1.380                    | 0.710                     |
| 30 | 66.000         | 2.000           | 23.240       | 0.000                   | 15.660                   | 9.840                    | 0.370                   | 3.000                    | 1.350                    | 0.750                     |
| 31 | 46.000         | 2.000           | 18.980       | 0.000                   | 16.520                   | 8.960                    | 0.540                   | 1.000                    | 1.140                    | 0.710                     |
| 32 | 50.000         | 2.000           | 23.070       | 0.000                   | 15.100                   | 12.550                   | 0.320                   | 3.000                    | 1.440                    | 0.710                     |
| 33 | 31.000         | 2.000           | 23.420       | 0.000                   | 14.740                   | 9.530                    | 0.300                   | 3.000                    | 1.560                    | 0.750                     |
| 34 | 61.000         | 2.000           | 21.340       | 0.000                   | 15.540                   | 11.140                   | 0.440                   | 3.000                    | 0.920                    | 0.610                     |
| 35 | 50.000         | 2.000           | 23.490       | 0.000                   | 17.390                   | 11.170                   | 0.320                   | 3.000                    | 1.010                    | 0.660                     |
| 36 | 50.000         | 2.000           | 20.650       | 0.000                   | 13.780                   | 9.400                    | 0.290                   | 3.000                    | 1.920                    | 0.810                     |
| 37 | 46.000         | 2.000           |              | 0.000                   | 13.980                   | 9.390                    | 0.300                   | 3.000                    | 1.210                    | 0.690                     |
| 38 | 43.000         | 2.000           | 20.230       |                         | 14.600                   | 9.290                    | 0.380                   |                          | 1.350                    | 0.680                     |
| 39 | 47.000         | 1.000           | 24.780       |                         | 15.310                   | 7.220                    | 0.280                   |                          | 2.970                    | 0.850                     |
| 40 | 54.000         | 2.000           | 25.770       | 0.000                   | 14.700                   | 9.800                    | 0.380                   | 3.000                    | 1.340                    | 0.750                     |
| 41 | 25.000         | 2.000           | 21.360       | 0.000                   | 11.500                   | 9.500                    | 0.330                   | 3.000                    | 0.880                    | 0.570                     |
| 42 | 23.000         | 2.000           | 21.260       | 0.000                   | 16.000                   | 9.000                    | 0.290                   | 3.000                    | 1.160                    | 0.670                     |
| 43 | 26.000         | 1.000           | 25.370       | 0.000                   | 13.600                   | 8.000                    | 0.600                   | 3.000                    | 1.490                    | 0.650                     |
| 44 | 26.000         | 2.000           | 19.530       | 0.000                   | 15.500                   | 11.400                   | 0.500                   | 3.000                    | 1.240                    | 0.700                     |
| 45 | 56.000         | 1.000           | 21.850       | 0.000                   | 14.800                   | 7.300                    | 0.270                   | 3.000                    | 1.770                    | 0.810                     |
| 46 | 54.000         | 2.000           | 20.880       | 0.000                   | 13.500                   | 8.300                    | 0.380                   | 3.000                    | 1.580                    | 0.810                     |
| 47 | 24.000         | 1.000           | 25.490       | 0.000                   | 13.600                   | 8.200                    | 0.310                   | 3.000                    | 1.630                    | 0.740                     |
| 48 | 36.000         | 2.000           | 23.430       | 0.000                   | 14.300                   | 9.720                    | 0.270                   | 2.000                    | 1.430                    | 0.690                     |
| 49 | 37.000         | 2.000           | 20.410       | 0.000                   | 14.100                   | 7.600                    | 0.300                   | 3.000                    | 1.530                    | 0.770                     |

## 10.3.2- DADOS GRUPO PORTADOR DE ESTEATOSE

| Arquivo Editar Estatísticas Gráficos Sugestões Configurar Ajuda |                |                 |              |                         |                          |                          |                         |                          |                           |                            |
|---|----------------|-----------------|--------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Escolha um teste  |                |                 |              |                         |                          |                          |                         |                          |                           |                            |
|   | - 1 -<br>Idade | - 2 -<br>Gênero | - 3 -<br>IMC | - 4 -<br>Grau esteatose | - 5 -<br>Lobo dir fígado | - 6 -<br>Lobo esq fígado | - 7 -<br>IVP veia porta | - 8 -<br>Padrão fluxo ve | - 9 -<br>IP Art. Hepático | - 10 -<br>IR Art. Hepático |
| 52  | Idade          | Sexo            | IMC          | Grau USG                | LD Fig                   | LE Fig                   | IVP                     | Fluxo VH                 | IP Art Hep                | IR Art Hep%                |
| 53  | 62.000         | 2.000           | 34.620       | 2.000                   | 14.000                   | 4.400                    | 0.310                   | 3.000                    | 1.490                     | 74.000                     |
| 54  | 35.000         | 2.000           | 32.150       | 3.000                   | 18.300                   | 10.800                   | 0.210                   | 3.000                    | 1.150                     | 67.000                     |
| 55  | 38.000         | 2.000           | 35.380       | 1.000                   | 16.040                   | 10.630                   | 0.240                   | 3.000                    | 2.030                     | 77.000                     |
| 56  | 64.000         | 2.000           | 33.690       | 2.000                   | 18.400                   | 10.100                   | 0.160                   | 1.000                    | 2.800                     | 88.000                     |
| 57  | 31.000         | 1.000           | 29.750       | 3.000                   | 19.120                   | 11.500                   | 0.210                   | 2.000                    | 1.140                     | 59.000                     |
| 58  | 54.000         | 2.000           | 30.170       | 1.000                   | 14.780                   | 7.400                    | 0.290                   | 1.000                    | 1.280                     | 74.000                     |
| 59  | 34.000         | 1.000           | 31.590       | 2.000                   | 19.300                   | 10.460                   | 0.220                   | 1.000                    | 2.940                     | 81.000                     |
| 60  | 52.000         | 2.000           | 34.930       | 3.000                   | 23.700                   | 16.460                   | 0.290                   | 1.000                    | 1.720                     | 75.000                     |
| 61  | 60.000         | 2.000           | 29.670       | 3.000                   | 19.000                   | 9.950                    | 0.160                   | 1.000                    | 1.500                     | 75.000                     |
| 62  | 42.000         | 2.000           | 34.200       | 1.000                   | 17.230                   | 7.140                    | 0.070                   | 2.000                    | 1.400                     | 70.000                     |
| 63  | 57.000         | 2.000           | 46.740       | 1.000                   | 18.700                   | 11.000                   | 0.120                   | 3.000                    | 1.150                     | 65.000                     |
| 64  | 44.000         | 2.000           | 28.690       | 3.000                   | 18.600                   | 13.250                   | 0.090                   | 1.000                    | 1.240                     | 71.000                     |
| 65  | 37.000         | 2.000           | 26.730       | 3.000                   | 12.000                   | 7.900                    | 0.220                   | 1.000                    | 1.750                     | 80.000                     |
| 66  | 43.000         | 2.000           | 34.680       | 1.000                   | 14.390                   | 6.400                    | 0.320                   | 3.000                    | 1.010                     | 65.000                     |
| 67  | 40.000         | 1.000           | 43.960       | 3.000                   | 20.070                   | 12.610                   | 0.250                   | 1.000                    | não                       | não                        |
| 68  | 52.000         | 2.000           | 28.530       | 3.000                   | 20.900                   | 12.100                   | 0.230                   | 1.000                    | 1.650                     | 78.000                     |
| 69  | 55.000         | 2.000           | 24.170       | 2.000                   | não                      | não                      | 0.110                   | 3.000                    | 1.140                     | 71.000                     |
| 70  | 41.000         | 1.000           | 33.020       | 2.000                   | 17.200                   | 9.780                    | 0.270                   | 3.000                    | não                       | não                        |
| 71  | 42.000         | 2.000           | 30.500       | 3.000                   | 18.400                   | 6.700                    | 0.200                   | 1.000                    | 1.430                     | 73.000                     |
| 72  | 49.000         | 2.000           | 29.000       | 1.000                   | 14.900                   | 8.300                    | 0.150                   | 3.000                    | 2.570                     | 87.000                     |
| 73  | 58.000         | 2.000           | 38.050       | 1.000                   | 13.840                   | 7.890                    | 0.150                   | 1.000                    | 2.040                     | 82.000                     |
| 74  | 48.000         | 2.000           | 23.700       | 3.000                   | 18.100                   | 14.400                   | 0.090                   | 1.000                    | não                       | não                        |
| 75  | 37.000         | 1.000           | 39.500       | 3.000                   | 16.100                   | 10.330                   | 0.110                   | 1.000                    | 1.090                     | 64.000                     |
| 76  | 36.000         | 2.000           | 28.620       | 3.000                   | 19.790                   | 13.920                   | 0.170                   | 1.000                    | não                       | não                        |
| 77  | 50.000         | 2.000           | 27.970       | 3.000                   | 14.020                   | 8.920                    | 0.190                   | 3.000                    | 1.770                     | 73.000                     |
| 78  | 53.000         | 2.000           | 26.900       | 1.000                   | 17.000                   | 10.210                   | 0.220                   | 3.000                    | 1.180                     | 70.000                     |
| 79  | 57.000         | 2.000           | 31.560       | 2.000                   | 18.000                   | 5.000                    | 0.220                   | 3.000                    | 1.360                     | 71.000                     |
| 80  | 54.000         | 2.000           | 29.120       | 3.000                   | 18.300                   | 10.000                   | 0.100                   | 1.000                    | 2.110                     | 76.000                     |
| 81  | 52.000         | 2.000           | 35.600       | 2.000                   | 17.640                   | 9.520                    | 0.280                   | 3.000                    | 1.250                     | 69.000                     |
| 82  | 31.000         | 2.000           | 29.640       | 3.000                   | 17.610                   | 9.450                    | 0.150                   | 3.000                    | 2.710                     | 83.000                     |
| 83  | 58.000         | 2.000           | 45.840       | 2.000                   | 17.090                   | 11.640                   | 0.230                   | 3.000                    | 1.470                     | 72.000                     |
| 84  | 39.000         | 2.000           | 31.850       | 3.000                   | 19.600                   | 11.060                   | 0.200                   | 2.000                    | 1.150                     | 57.000                     |
| 85  | 55.000         | 2.000           | 27.890       | 1.000                   | 16.200                   | 13.500                   | 0.230                   | 3.000                    | 1.100                     | 66.000                     |
| 86  | 50.000         | 2.000           | 30.700       | 2.000                   | 14.670                   | 9.200                    | 0.100                   | 2.000                    | 1.550                     | 77.000                     |
| 87  | 57.000         | 1.000           | 31.620       | 1.000                   | 15.790                   | 6.250                    | 0.320                   | 3.000                    | 1.570                     | 84.000                     |
| 88  | 51.000         | 2.000           | 26.570       | 2.000                   | 17.730                   | 9.900                    | 0.090                   | 2.000                    | 1.290                     | 67.000                     |
| 89  | 52.000         | 1.000           | 27.730       | 1.000                   | 16.490                   | 11.700                   | 0.310                   | 3.000                    | 1.470                     | 72.000                     |
| 90  | 29.000         | 2.000           | 38.000       | 2.000                   | 16.630                   | 11.530                   | 0.200                   | 0.000                    | 0.880                     | 64.000                     |
| 91  | 27.000         | 2.000           | 29.810       | 3.000                   | 18.420                   | 15.170                   | 0.160                   | 2.000                    | 1.960                     | 77.000                     |
| 92  | 60.000         | 2.000           | 64.750       | 2.000                   | 14.920                   | 10.890                   | 0.210                   | 1.000                    | 1.530                     | 76.000                     |
| 93  | 33.000         | 1.000           | 50.900       | 2.00/3.00               | 19.400                   | 12.100                   | 0.170                   | 1.000                    | 1.450                     | 0.640                      |
| 94  | 34.000         | 2.000           | 45.760       | 1.000                   | 14.600                   | 11.400                   | 0.200                   | 1.000                    | 1.820                     | 0.780                      |
| 95  | 50.000         | 2.000           | 37.500       | 1.000                   | 15.700                   | 11.300                   | 0.220                   | 1.000                    | 1.230                     | 0.680                      |
| 96  | 33.000         | 2.000           | 44.680       | 1.00/2.00               | 18.800                   | 7.600                    | 0.240                   | 2.000                    | 1.460                     | 0.740                      |
| 97  | 55.000         | 2.000           | 51.000       | 2.000                   | 16.000                   | 7.700                    | 0.250                   | 1.000                    | 2.070                     | 0.800                      |
| 98  | 52.000         | 2.000           | 57.000       | 3.000                   | 17.600                   | 14.100                   | 0.110                   | 1.000                    | 1.220                     | 0.700                      |
| 99  | 38.000         | 2.000           | 43.110       | 2.000                   | 22.100                   | 13.100                   | 0.190                   | 3.000                    | 1.570                     | 0.760                      |
| 100   | 60.000         | 2.000           | 42.960       | 0.000                   | 13.700                   | 9.100                    | 0.430                   | 1.000                    | 1.950                     | 0.800                      |
| 101   | 52.000         | 2.000           | 57.000       | 2.000                   | 18.300                   | 13.900                   | 0.630                   | 2.000                    | 1.200                     | 0.630                      |

|     | - 3 -<br>IMC | - 4 -<br>Grau esteatose | - 5 -<br>Lobo dir fígado | - 6 -<br>Lobo esq fígado | - 7 -<br>IVP veia porta | - 8 -<br>Padrão fluxo ve | - 9 -<br>IP Art. Hepátic | - 10 -<br>IR Art. Hepátic | - 11 -<br>Grau esteatose | - 12 -<br>Fibrose | - 13 -<br>inflamação |
|-----|--------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------|----------------------|
| 52  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | grau esteatose           | estado            | inflamação grau      |
| 53  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 3.000                    | 2.000             | 1.000                |
| 54  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 1.000                    | 0.000             | 1.000                |
| 55  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 2.000                    | 0.000             | 1.000                |
| 56  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 1.000                    | 0.000             | 1.000                |
| 57  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 2.000                    | 2.000             | 1.000                |
| 58  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 1.000                    | 0.000             | 1.000                |
| 59  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 3.000                    | 1.000             | 1.000                |
| 60  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 3.000                    | 2.000             | 1.000                |
| 61  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 2.000                    | 2.000             | 1.000                |
| 62  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 2.000                    | 2.000             | 1.000                |
| 63  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 1.000                    | 0.000             | 1.000                |
| 64  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 2.000                    | 3.000             | 1.000                |
| 65  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 3.000                    | 1.000             | 1.000                |
| 66  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 1.000                    | 0.000             | 1.000                |
| 67  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 1.000                    | 3.000             | 1.000                |
| 68  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 1.000                    | 2.000             | 1.000                |
| 69  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 2.000                    | 2.000             | 1.000                |
| 70  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 2.000                    | 0.000             | 1.000                |
| 71  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 2.000                    | 2.000             | 1.000                |
| 72  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 1.000                    | 2.000             | 1.000                |
| 73  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 1.000                    | 2.000             | 1.000                |
| 74  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 2.000                    | 1.000             | 1.000                |
| 75  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 3.000                    | 2.000             | 1.000                |
| 76  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 2.000                    | 2.000             | 1.000                |
| 77  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 1.000                    | 3.000             | 1.000                |
| 78  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 1.000                    | 2.000             | 1.000                |
| 79  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 2.000                    | 0.000             | 1.000                |
| 80  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 3.000                    | 1.000             | 1.000                |
| 81  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 2.000                    | 0.000             | 1.000                |
| 82  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 2.000                    | 2.000             | 1.000                |
| 83  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 1.000                    | 2.000             | 1.000                |
| 84  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 3.000                    | 0.000             | 1.000                |
| 85  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 1.000                    | 0.000             | 1.000                |
| 86  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 1.000                    | 0.000             | 1.000                |
| 87  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 1.000                    | 1.000             | 1.000                |
| 88  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 2.000                    | 1.000             | 1.000                |
| 89  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 1.000                    | 2.000             | 1.000                |
| 90  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 1.000                    | 0.000             | 1.000                |
| 91  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 2.000                    | 0.000             | 1.000                |
| 92  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 1.000                    | 2.000             | 1.000                |
| 93  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 3.000                    | 2.000             | 1.000                |
| 94  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 1.000                    | 1.000             | 1.000                |
| 95  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 1.000                    | 2.000             | 1.000                |
| 96  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 1.000                    | 1.000             | 1.000                |
| 97  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 2.000                    | 2.000             | 1.000                |
| 98  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 2.000                    | 1.000             | 1.000                |
| 99  |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 2.000                    | 2.000             | 1.000                |
| 100 |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 2.000                    | 2.000             | 1.000                |
| 101 |              |                         |                          |                          |                         |                          |                          |                           | 1.000                    | 0.000             | 1.000                |

#### **10.4- ANEXO D- ARTIGO SUBMETIDO PARA A REVISTA *JOURNAL OF CLINICAL ULTRASOUND* (JCU) EM 26/02/15**

##### **ABSTRACT**

**PURPOSE:** To evaluate hepatic Doppler ultrasound (US) indices for steatosis diagnose and grading, comparing with histological study. **METHODS:** Doppler ultrasonography was performed in 49 healthy volunteers, without risk factors for nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and in 49 patients with NAFLD. Steatosis patients were biopsied. Portal venous pulsatility index (VPI), hepatic artery resistance index (HARI) and pulsatility index (HAPI) were analyzed in hilum. The right hepatic vein waveform pattern (HVWP) was classified as triphasic, biphasic or monophasic. Histological samples were analyzed by two pathologists. ROC curve was used for sensitivity and specificity and multivariate analysis to create equation for classifying patients. **RESULTS:** Significant correlation was found between VPI and steatosis ( $r = -0.69$ ,  $p < 0.0001$ ). VPI ideal cutoff for predicting steatosis was 0.26 (sensitivity of 91%; specificity of 79.6%). HVWP correlated with steatosis presence ( $r = -0.61$ ,  $p < 0.0001$ ). HARI and HAPI could not differentiate healthy and steatosis group. None of the indices correlated with steatosis grading. The rule to differentiate healthy and steatosis patients was  $16.15VPI + 1.96HVWP$ . **CONCLUSION:** Portal and hepatic vein hemodynamic changes help noninvasive steatosis diagnosis. Doppler US indices are limited to quantify degree of fat infiltration. Histological study remains essential for steatohepatitis diagnose and steatosis grading.

**KEY WORDS:** Fatty liver; nonalcoholic hepatic steatosis; Doppler ultrasonography; liver biopsy.

## INTRODUCTION

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is characterized by a spectrum of hepatic lesions which includes simple steatosis and nonalcoholic steatohepatitis (NASH),<sup>1</sup> due to glucose and lipid metabolism deregulation resulting in oxidative stress and hepatic damage.<sup>2</sup>

NAFLD has a prevalence of 10-30% in western population<sup>3</sup> and represents the current most common chronic hepatic disease.<sup>4,5</sup> Its complications involve fibrosis development which can progress to cirrhosis<sup>6,7,8</sup> and hepatocellular carcinoma development.<sup>9</sup>

It is a subdiagnosed condition as in most cases it has an asymptomatic clinical course.<sup>10</sup> Usually, disease suspicion is based in ultrasonography findings of hepatic hyperechogenicity or a mild to moderate rise in hepatic liver enzymes.<sup>11,12</sup>

Currently, ultrasonography constitutes the method of choice for NAFLD screening.<sup>13</sup> For a definite diagnosis and staging, histological study continues to be the gold standard method<sup>13</sup>, as it confirms the diagnosis, analyze necrotic-inflammatory activity and fibrosis semi-quantitatively and accurately evaluates response to treatment.<sup>14</sup>

However, biopsy presents disadvantages as high cost, potential sampling errors and risks; constituting a non-dynamic evaluation and thus inappropriate for population screening.

At present, there had been a growing search for image diagnostic methods with similar accuracy to biopsy and that could, at least in part and in some cases, replace it.

In this context, ultrasonography is the most used technique for NAFLD screening.<sup>15</sup> Its advantages are immediate results, better availability, usability and lower costs.<sup>15</sup> Besides, US has a screening sensitivity for NAFLD moderate to severe grades similar to other non-invasive techniques as magnetic resonance image (MRI) and computed tomography (CT).<sup>15</sup> Elastography techniques, which uses evaluation of liver parenchyma elasticity, has shown promising results in mild steatosis diagnosis and grading<sup>16</sup>, but are still not widely available. In general, bidimensional ultrasonography sensitivity for NAFLD diagnosis (steatosis recognition) is 60-94% with specificity of 85-95%.<sup>17</sup> However, this technique is not able to differentiate simple steatosis from steatohepatitis<sup>18,19</sup> and has low ability to predict fibrosis when correlating to histological findings.<sup>20,21</sup>

Combination of multiple echography parameters improves diagnostic accuracy.<sup>22</sup> Associate use of bidimensional ultrasonography and Doppler method is safe, low cost, of simple realization, highly available and do not involve radiation exposure.<sup>23</sup> However, the real role of steatosis in modifying hepatic blood flow is still controversy in literature and needs to be clarified.

This study is one of the few in literature to exclude patients with hepatic diseases other than NAFLD,<sup>24,25,26,27,28,29,30</sup> to evaluate several hemodynamic parameters of the three major hepatic vessels<sup>24,29</sup> and to correlate data with biopsy findings, the current gold standard, in all patients with steatosis

The goals of this study performed in patients with NAFLD are to evaluate arterial Doppler in hepatic artery by resistance index (HARI) and pulsatility index (HAPI); to study venous Doppler in portal vein by venous pulsatility index (VPI) and in right hepatic vein by

hepatic vein waveform pattern (HVWP). Then, we aim to correlate data with histological findings regarding fat infiltration and its degree.

## **PATIENTS AND METHODS**

This is an observational and transversal diagnostic study, performed in only one research center. Volunteers were included consecutively. Protocol was approved by the local ethics committee. Written informed consent was obtained from all study participants.

### **PATIENTS**

Inclusion criteria were steatosis verified by ecography and age range between 18 and 70 years, both genders. Forty nine people were included in steatosis group, 40 were attending fatty liver clinic and 9 attending bariatric surgery clinic, with NAFLD. Other 49 healthy volunteers, without risk factors for NAFLD, none or minimal alcohol ingestion, without diabetes or obesity, composed the healthy group (without steatosis).

Exclusion criteria were alcohol ingestion  $> 140\text{g/week}$  for men and  $> 70\text{g/week}$  for women<sup>31</sup>, use of hepatotoxic medication, chronic viral hepatitis B or C, hemochromatosis, other chronic hepatothopaties, portal hypertension, cirrhosis, ascitis, hepatic failure, blood clotting disorders, heart diseases, acute coronary, cerebral or peripheral ischemia, respiratory failure, focal hepatic lesions, pregnancy or lactation.

Volunteers group had the same evaluation of steatosis group, except by hepatic biopsy, for ethical reasons. This group had the same inclusion (except by hepatic steatosis in ecography) and exclusion criteria of patients, described above. Also, evidences of insulin resistance or risk factors for NAFLD constituted exclusion criteria for healthy group.

## BIDIMENSIONAL AND DOPPLER US EVALUATION

The 98 subjects were examined by bidimensional echography and Doppler US, using two ultrasonography equipments (*Voluson 730 Expert, General Electric, Milwaukee, USA and Siemens Acuson X150, Washington, USA*); both with multifrequency convex transducer (2 a 5 MHz), 50 Hz filter, Doppler sample volume setted in 3 mm, with a pulse repetition frequency of 2.0 kHz. Patients were fasted overnight (8-12 hours), in dorsal decubitus, with arms extended beside the head and the exam was performed in the morning, by a single experienced examiner, blind to clinical-laboratorial data.

Hepatic and splenic segments were analyzed and vascular malformations, cysts or focal lesions, excluded.

Initially, examination was performed in bidimensional mode, in which was based the steatosis ultrasonography diagnosis; by findings as diffuse increase in echogenicity, acoustic attenuation increase, *loss of diaphragm definition and decrease visualization of vascular structures.*<sup>25</sup>

Then, in apnea, arterial and venous Doppler analyzes were performed, using a beam lower than 30° and at least register of five waveforms with homogeneous pattern. Portal vein and hepatic artery analyzes were performed in hilum, immediately in the point where they meet hepatic surface and right hepatic vein analyze was done 1.0 cm before its merging point with the inferior vena cava.

## BIOPSY AND HISTOLOGICAL STUDY PROTOCOL

Hepatic biopsies were performed with TruCut needle (16 ga x 15 cm). Material was obtained from right lobe, in the sixth segment. In patients attending fatty liver clinic, intercostal access guided by ultrasound was used and in patients attending bariatric surgery clinic the biopsy was done during bariatric surgery, as soon as liver was exposed. Biopsy was performed with a maximum gap of one week after ultrasonography examination (US). Liver tissue fragments (one or more), measuring about 10 mm in length were fixed in 10% formalin solution. Then, submitted to histological procedures and to hematoxylin-eosin, Masson trichrome, reticulin, PAS and Ziehl colorations. Two pathologists, unaware of clinical-laboratorial and ultrasound data, procedure to material analyses individually. Then, together, established consensus.

Histological evaluation was based on standard classification of *Pathology Committee of the NASH Clinical Research Network*.<sup>33</sup> Hepatocellular alterations systematically searched were steatosis, hepatocellular ballooning, Mallory hyaline bodies, hepatocyte glycogen inclusions and apoptosis. Steatosis was classified as mild (0-33% of hepatocytes), moderate (33-66%) and severe (more than 66% of fat infiltration in hepatocytes) and its location in hepatic acinus was described. Lobular and portal inflammatory infiltrates, when present, were described according to intensity as mild, moderate and severe. Fibrosis, which characterizes biopsy staging, was described according to localization in hepatic acinus, aspect and intensity. NAS score (*Non-alcoholic fatty liver disease Activity Score*) was calculated for each sample. It combines the sum of three semi-quantitative histological criteria: steatosis (0–3), lobular inflammation (0–3) and hepatocellular ballooning (0–2).



## LINEAR DISCRIMINANT ANALYSIS FOR STEATOSIS DIAGNOSIS

Discriminant analysis, a multivariate technique, was used to create an equation which enables classifying patients in healthy and steatosis group. Data from all 98 patients and from those hemodynamic variables which proved to be significant for diagnosis were used. The resultant classification was compared with histological study.

## STATISTICAL ANALYZES

*Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) program was used for statistical analyzes. The Lilliefors test was used to test the suitability of the data to a normal distribution. According to their distribution, Mann-Whitney test or t test were used to compare two independent groups. Kruskal-Wallis test was done to compare more than two groups with Dunn test performed for pair-wise comparisons (post-hoc analysis). Descriptive statistics were presented as median, media and standard deviation. Categorical data were presented as absolute frequency (n) and relative frequency (%) and analyzed with Fisher and Mann-Whitney tests. For studying variables relations, Spearman correlation coefficient was used. For determining sensitivity and specificity ROC curve- *receiver operating characteristic curve* was used. Statistical significance was set as  $p < 0.05$ . *Statistical Analysis System* (SAS) was used for multivariate technique of discriminant analysis and equation framing.

## RESULTS

Volunteers group was composed of 14 male subjects and 35 female subjects while steatosis group was composed of 8 male patients and 41 female patients. There were no significant differences between these proportions ( $p=0.149$ ).

There was no significant difference between groups related to serum albumin and bilirubin levels, platelets count and transferrin saturation index.

NAFLD patients showed altered and elevated indices of obesity, dyslipidemia, glycaemia, liver enzymes and ferritin compared to healthy group (Table 1).

**TABLE 2 – Laboratorial and clinical characteristics of healthy and steatosis group, expressed as media  $\pm$  standard deviation and median (minimum- maximum) except for categorical variables, expressed, when indicated, in absolute frequencies and percentage.**

|                             | Steatosis (n=49)    | Volunteers(n=49)   | P             |
|-----------------------------|---------------------|--------------------|---------------|
| Male (%)                    | 8 (16.32%)          | 14 (28.57%)        | 0.149         |
| Age (years)                 | 50(27-64)           | 45(23-70)          | <b>0.0032</b> |
| Albumin (g/dL)              | 4.47 $\pm$ 0.66     | 4.60 $\pm$ 0.40    | 0.678         |
| Platelets /1000             | 260.73 $\pm$ 80.68  | 252.65 $\pm$ 46.86 | 0.440         |
| Transferrin saturation (%)  | 29.80 $\pm$ 13.17   | 32.57 $\pm$ 12.08  | 0.344         |
| Total bilirubin (mg/dL)     | 0,57 (0.22-3.81)    | 0.64 (0.25-2.90)   | 0.084         |
| BMI (Kg/m <sup>2</sup> )    | 35,05 $\pm$ 8,76    | 22.20 $\pm$ 2.21   | <b>0.0001</b> |
| Glycaemia (mg/dL)           | 108.55 $\pm$ 24.03  | 85.97 $\pm$ 7.19   | <b>0.0001</b> |
| Total cholesterol (mg/dL)   | 192.04 $\pm$ 39.85  | 187.54 $\pm$ 30.84 | 0.554         |
| Triglycerides (mg/dL)       | 157.65 $\pm$ 83.03  | 97.51 $\pm$ 41.79  | <b>0.0001</b> |
| HDL (mg/dL)                 | 43.78 $\pm$ 10.15   | 59.77 $\pm$ 12.48  | <b>0.0001</b> |
| Aspartate amino transferase | 19.50(9.00- 273.00) | 12.50(9.00- 4.20)  | <b>0.0001</b> |

|                                   |                      |                      |               |
|-----------------------------------|----------------------|----------------------|---------------|
| <b>Alanine amino transferase</b>  | 42.50(12.00-230.00)  | 16.000(8.000-57.000) | <b>0.0001</b> |
| <b>Gamma-glutamyl transferase</b> | 45.50(16.00-324.20)  | 16.00(8.00-63.00)    | <b>0.0001</b> |
| <b>Alkaline phosphatase</b>       | 99.50(42.00-290.00)  | 63.00(27,00-135,00)  | <b>0.0001</b> |
| <b>Ferritin (ng/mL)</b>           | 192.9 (16.40-558.00) | 117.47±127.35        | <b>0.0001</b> |

*BMI: body mass index; HDL: High density lipoprotein*

BMI in steatosis group had the following distribution: 2 (4.08%) patients were eutrophic, 15 (30.61%) overweight, 14 (28.57%) with class I obesity, 6 (12.24%) with class II obesity and 12 (24.48%) with class III obesity. Therefore, 65.29% of steatosis group had some grade of obesity.

A strong and positive correlation was found between the degree of steatosis and BMI ( $r= 0.77$ ;  $p<0.0001$ ).

In steatosis group, 15 (30.61%) patients had diabetes mellitus and 37 (75.51%) had dyslipidemia.

Biopsy confirmed steatosis in all patients, wherein 22 (44.89%) had mild steatosis; 19 (38.77%) moderate steatosis and 8 (16.32%) patients had severe steatosis.

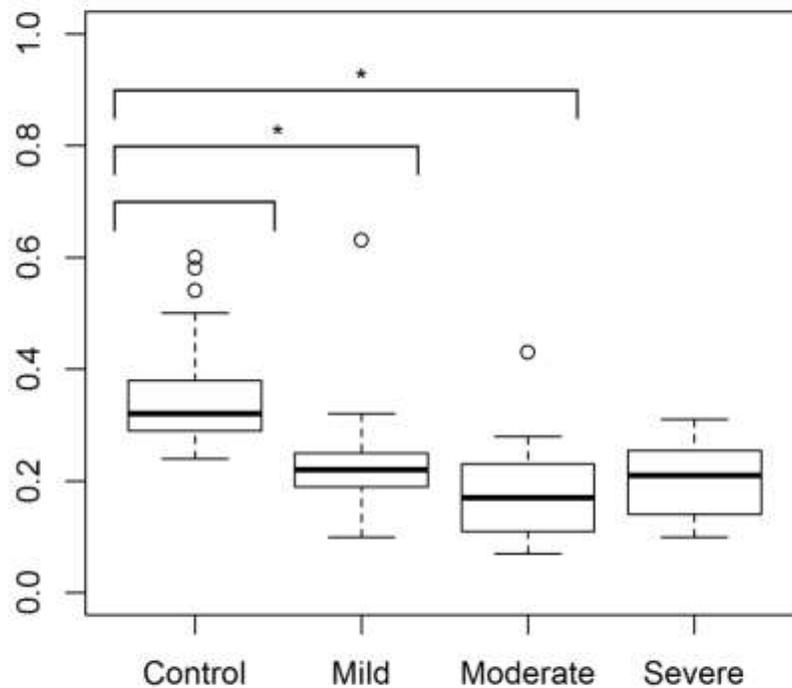
The majority of patients, 44 (89.79%), fulfilled criteria for NASH. Simple steatosis was found in 5 cases (10.20%). Thirty seven patients (75.51%) had NAS score between 5 and 8, which corresponds to definite NASH. Twelve patients (24.48%) had score between 3 and 4, corresponding to *borderline* cases.

Mild lobular inflammation was found in 15 (30.61%) patients, moderate in 8 (16.32%) and severe in 21 (42.85%). Portal inflammation was absent to mild in 2 patients (4.08%), portal and lobular inflammation was seen in 45 (91.83%) patients and only portal inflammation in 2 patients (4.08%).

None of the evaluated patients had cirrhosis in histological study. Thirty four patients (69.38%) had some grade of fibrosis. From them, three (8.82%) patients had bridge fibrosis- stage 3, 22 (64.70%) perisinusoidal and portal/periportal fibrosis- stage 2, 6 (17.64%) only portal/periportal fibrosis- stage 1C and 3 (8.82%) mild perisinusoidal fibrosis- stage 1A.

Portal vein Doppler US study showed more phasic waveform in healthy group than in steatosis group.

VPI media was  $0.35 \pm 0.08$  for volunteers group and  $0.21 \pm 0.10$  for patients with steatosis ( $p < 0.0001$ ) (Figure 1).



**Figure 1** – *Box-plot* graphic of portal vein pulsatility index (VPI) according to steatosis grading in histology. Horizontal line corresponds to median. Association markers express significant differences between healthy and steatosis group. Specified values refer to *outliers*.

\* $p < 0.0001$

VPI media, standard deviation, confidence interval, median, minimum and maximum values to each group, with statistical difference between them, are showed in table 2.

**TABLE 2 – Portal vein pulsatility index (VPI) values expressed as media, standard deviation, confidence interval (CI), median and minimal and maximum values for each group and subgroup.**

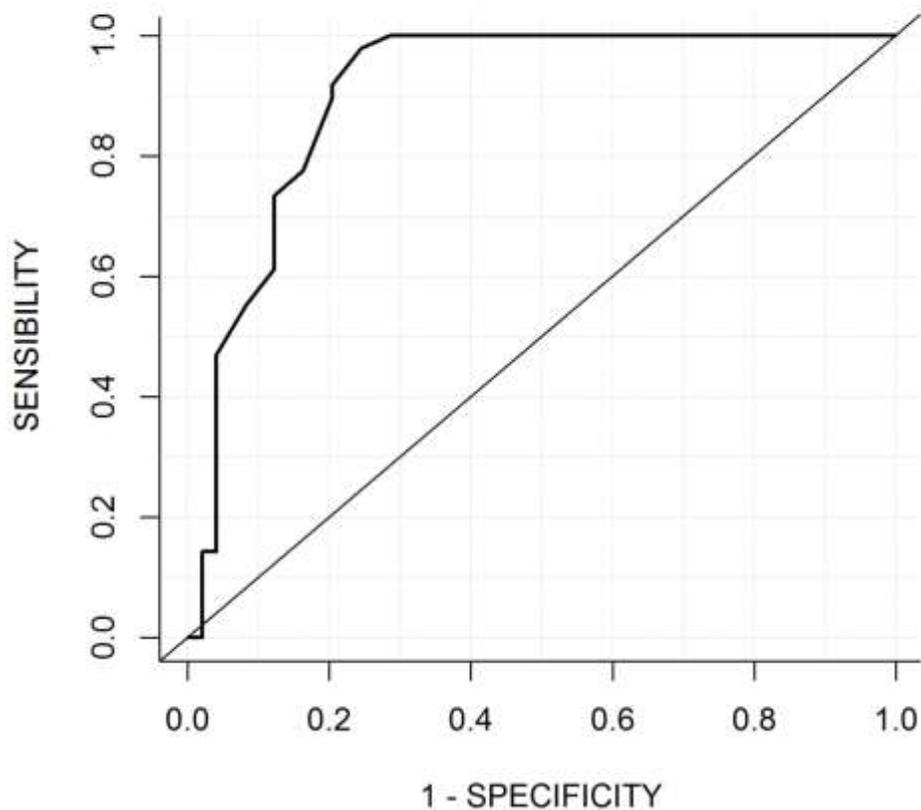
|          |           | VPI   |           |           |        |           |
|----------|-----------|-------|-----------|-----------|--------|-----------|
| Groups   |           | Media | Standard  | CI 95%    | Median | Minimum   |
|          |           |       | deviation |           |        | Maximum   |
| Healthy* |           | 0.35  | 0.08      | 0.33-0.37 | 0.32   | 0.24-0.60 |
|          | Steatosis | 0.21  | 0.10      | 0.19-0.23 | 0.21   | 0.07-0.63 |
|          | Mild†     | 0.24  | 0.16      | 0.14-0.34 | 0.22   | 0.1- 0.63 |
|          | Moderate† | 0.18  | 0.09      | 0.14-0.22 | 0.17   | 0.07-0.43 |
|          | Severe†   | 0.20  | 0.07      | 0.15-0.25 | 0.21   | 0.10-0.31 |

\* *healthy group was different ( $p < 0.05$ ) from all groups by multiple comparison using analysis of variance (Kruskall-Wallis) with Dunn test for post Hoc analyses.*

† *steatosis subgroups were different from volunteers group, but did not differ significantly between themselves using the same tests described above.*

There was a significant and inverse correlation between portal venous pulsatility index and steatosis presence in biopsy, with Spearman correlation coefficient of -0.69 ( $p < 0.0001$ ). However, PVI had no significant correlations with inflammation or fibrosis.

ROC curve data for VPI are presented in figure 2.



**Figure 2-** Receiver operating characteristic (ROC) curve graphic of plotted sensitivity and 1- specificity of portal vein pulsatility index (VPI) for steatosis biopsy diagnosis.

The VPI cutoff of 0.26, in this sample, was valid for distinguishing healthy and steatosis group, with 91.00% of sensitivity, 79.60% of specificity and accuracy of 85.70%. Positive predictive value was 81.82% and negative predictive value was 90.66%. The area under the curve ROC (AUROC) was 0.9058, which is statistically significant ( $p < 0.0001$ ).

Hepatic vein waveform pattern (HVWP) in Doppler was different between steatosis group and volunteers group. In volunteers group, the predominant HVWP was the triphasic, while in steatosis group, triphasic pattern predominated in mild steatosis subgroup and monophasic pattern in both moderate and severe steatosis subgroups. Thirty out of 48 patients (62.50%) with steatosis showed abnormal hepatic vein pattern, 22 (45.83%) with monophasic pattern and 8 (16.66%) with biphasic pattern.

The difference of abnormal HVWP frequency between healthy and steatosis group was significant ( $p < 0.0001$ ) according to Mann-Whitney test. Correlation between degree of fatty infiltration and HVWP was inverse and significant ( $r = -0.61$ ;  $p < 0.0001$ ).

The difference of abnormal HVWP frequency between steatosis subgroups was not significant ( $p = 0.67$ ).

Table 3 shows distribution of HVWP according to steatosis grade in histology.

**Table 3 - Distribution of Doppler right HVWP in healthy group and steatosis group in biopsy, expressed in absolute frequency and percentage.**

|               |          | Monophasic n(%) | Biphasic n(%) | Triphasic n(%) | Total |
|---------------|----------|-----------------|---------------|----------------|-------|
| <b>Groups</b> | Healthy  | 1 (2.04)        | 2 (4.08)      | 46 (93.87)     | 49.0  |
|               | Mild     | 8 (38.09)       | 3 (14.28)     | 10 (47.61)     | 21.0* |
|               | Moderate | 8 (42.10)       | 4 (21.05)     | 7 (36.84)      | 19.0  |
|               | Severe   | 6 (75.00)       | 1 (12.50)     | 1 (12.50)      | 8.0   |

\*In one obese patient with mild steatosis it was not possible to evaluate HVWP due to technical difficulties.

Based in these results, HVWP sensitivity for steatosis diagnosis was 63.26%, with specificity of 93.61%. Positive predictive value was 91.17% and negative predictive value 70.96%. Accuracy was 78.12%.

Spearman coefficient did not show correlation between inflammation presence and HVWP ( $r = -0.18$ ;  $p = 0.19$ ) and fibrosis presence correlated weakly with this parameter ( $r = -0.29$ ;  $p = 0.04$ ).

Hepatic artery Doppler US study, through resistance index (HARI) and pulsatility index (HAPI), was not able to differentiate healthy group and steatosis group, nor differentiate subgroups of steatosis grading. HARI media in healthy group was  $0.72 \pm 0.08$

and in steatosis group it was  $0.73 \pm 0.07$  ( $p=0.71$ ). HAPI media in healthy group was  $1.46 \pm 0.41$  and in steatosis group it was  $1.57 \pm 0.48$  ( $p=0.43$ ).

HARI and HAPI usage for steatosis diagnosis was analyzed through ROC curve. For HARI, the cutoff was 0.71; with sensitivity of 46.90% and specificity of 57.80%. AUROC was 0.5099 which is not significant ( $p = 0.43$ ). For HAPI, the cutoff was 1.44; with sensitivity of 53.10% and specificity of 55.60%. AUROC was 0.5467 which is not significant ( $p = 0.21$ ).

Spearman coefficient showed neither HARI nor HAPI correlated with inflammation ( $p=0.86$ ;  $0.43$ ; respectively) or fibrosis ( $p= 0.21$ ;  $0.07$ ; respectively).

Both VPI and HVWP were used for discriminant analysis as only these variables were significant for steatosis diagnostic. The discriminant equation was  $D = 16.15VPI + 1.96HVWP$ , in which if  $D > 9.20$  patient belongs to healthy group, otherwise ( $D < 9.20$ ), to steatosis group (Wilks lambda= 0.4799;  $p < 0.0001$ ). Sensibility was 71.43%, specificity 97.96% and accuracy 84.69%.

## DISCUSSION

In the present study, Doppler US parameters of the three major hepatic vessels were evaluated in order to evidence steatosis impact, in NAFLD context, in vascular impedance (hepatic artery through resistance and pulsatility indices and portal vein through portal venous pulsatility index) and in waveform pattern (right hepatic vein).

Current knowledge suggests that steatosis leads to increase in cellular hepatic mass volume and, due to the limited hepatic capsule distensibility, generates compression and decrease in intrahepatic venous compliance.<sup>24,25</sup> Thus, in severe steatosis, compression and reduction in portal system flow would occur, consequently increasing compensatory flow in arterial system.<sup>34</sup>

Portal vein was hemodynamically evaluated through portal venous pulsatility index (VPI). This parameter has the major advantage of not depending on angulation to obtain real velocities, being more reproducible.<sup>35</sup>

A decrease in VPI was observed when comparing healthy group with the group with any degree of hepatic fatty infiltration. A study which evaluated patients with NAFLD found similar PVI media values, of  $0.42 \pm 0.92$  for healthy group and  $0.25 \pm 0.50$  for steatosis group.<sup>26</sup> Similar findings have also been described in studies which focused in other chronic hepatic diseases as the one that evaluated fibrosis influence in VPI in patients with hepatitis C and found  $0.33 \pm 0.07$  for volunteers group and  $0.23 \pm 0.09$  for steatosis group.<sup>35</sup> In another paper which evaluated patients with portal hypertension, they found respectively,  $0.39 \pm 0.10$  and  $0.23 \pm 0.08$ .<sup>36</sup> It means that the waveform became less phasic in steatosis presence, a consequence of vessel compliance reduction. These findings can result either from sinusoidal compression by hepatocytes full of fat or from fibrosis and

fibroblastic proliferation in perisinusoidal space.<sup>26</sup> However, VPI correlation with fibrosis presence was not statistically significant in this study. Therefore such results could be due to steatosis effect in portal vein phasicity.

Non-correlation of VPI values with steatosis grading in the current study agree with some publications.<sup>23,26</sup> However, others showed reduction of VPI as steatosis grading increased.<sup>37,38</sup> In all studies cited, steatosis grading was based in bidimensional hepatic ecography, wherein in one study, from 31 patients in steatosis group, only 11 underwent liver biopsy,<sup>26</sup> making findings more vulnerable to errors. The present investigation, based in histological findings as comparison parameter for all 49 patients, allows a more reliable evaluation of steatosis grading, inflammation and fibrosis presence. Besides, histological analyzes were done by two pathologists with aftermost discussion and consensus. However, the small number of patients with severe steatosis (eight patients) could be a limiting factor in this study and future analyzes with higher number of patients in the referred subgroup are needed.

VPI performance as a diagnostic test was analyzed through ROC curve. The results reinforced VPI as a parameter with high sensitivity (91.00%) for steatosis diagnosis; specificity of 79.60% and accuracy of 85.70%, when compared to the gold standard, the histological study. VPI ideal cutoff value was 0.26. Positive predictive value was 81.82% and negative predictive value 90.66%; such indices show VPI is suitable to be applied in clinical practice as a screening tool.

Few studies held such analyzes. One study in which VPI was evaluated as a non-invasive method for fibrosis diagnosis in patients with hepatitis C, the ideal cutoff was 0.28

with sensitivity of 73.5% and specificity of 71.1%.<sup>35</sup> These results suggest that VPI is a more suitable index for steatosis diagnosis than for fibrosis diagnosis.

There is still controversy about effects of NAFLD in hepatic vein waveform pattern.<sup>27</sup> There are many studies which evaluated this parameter in chronic parenchymal liver diseases, mainly in portal hypertension, but a few did it in NAFLD setting.<sup>39,40</sup>

In the present study, this evaluation was done in right hepatic vein, since cardiac movements frequently create artifacts in left hepatic vein Doppler and evaluation of media hepatic vein frequently shows artifacts from respiratory movements.<sup>39</sup>

Triphasic pattern constitutes the characteristic normal pattern of hepatic vein, it has two antegrade peaks and a short reverse flow due to atrial systole; in biphasic pattern there is a reduction in oscillation amplitude and loss of reverse flow and in monophasic pattern, the wave is continuous and flat, without periodicity.<sup>25</sup> In steatosis setting, the increase in hepatocytes volume creates hepatic vein compression, since hepatic capsule distensibility is restrict.<sup>25</sup> Literature has shown that in steatosis, hepatic vein waveform is more frequently abnormal, biphasic or monophasic, than in healthy volunteers.<sup>24,25,26,28,29,39,40</sup> Present study findings corroborate these data, since 30 out of 48 steatosis patients (62.5%) had abnormal hepatic vein pattern, 22 (45.83%) of them had monophasic pattern and 8 (16.66%) had biphasic pattern, comparing with only 3 (6.37%) healthy volunteers who had an abnormal pattern. However, there was no significant difference in abnormal pattern frequency between steatosis subgroup, in agreement with several studies in literature.<sup>26,27,28,40</sup> It can be inferred that HVWP is a Doppler parameter suitable for steatosis detection, but do not distinguish between degrees of fat infiltration. Moreover, the fact that healthy volunteers

also can have abnormal waveform pattern, as shown in present study and in literature,<sup>24,28,29,40</sup> generates the possibility of false positive diagnosis, with specificity reduction.

Studies addressing this theme in literature used image methods such as bidimensional ecography,<sup>24,25,27</sup> computadorized tomography<sup>40</sup> or magnetic resonance<sup>29</sup> as comparative parameters, except for one study that, as this, used histological findings.<sup>28</sup>

Inflammation presence did not show correlation with HVWP and fibrosis presence correlated weakly with this parameter. Therefore, in the present study, right hepatic vein Doppler US analyzes showed better correlation with steatosis, with accuracy of 78.12% for NAFLD diagnosis.

Liver blood flow is around 1450 ml/min and comes either from portal vein, which contributes with 1100 ml/min, and from hepatic artery, responsible for 350 ml/min.<sup>41</sup> During fasting, hepatic artery has low resistance, since liver requires continuous blood flow.<sup>42</sup> Historically, arterial resistance has been quantitatively analyzed through resistance index (HARI) and pulsatility index (HAPI), the former being the most used.

Normal values for HARI are between 0.6-0.7;<sup>44</sup> but can vary in a larger zone of 0.55-0.81.<sup>42</sup> HARI values in healthy group reported in literature corroborate this larger zone:  $0.77\pm 0.03$ ;<sup>24</sup>  $0.65\pm 0.07$ ;<sup>27</sup>  $0.82\pm 0.40$ <sup>29</sup> and  $0.81\pm 0.04$ <sup>30</sup> as well as the value found in the present study, of  $0.72\pm 0.08$ .

The literature is widely controversial relative to hemodynamic hepatic artery alterations secondary to steatosis, but several studies showed a decrease in HARI with an increase in the degree of fat accumulation, with an inverse and significant relation.<sup>24,30,45</sup> In

line with these findings, a study demonstrated HARI significant increase after NAFLD treatment.<sup>46</sup>

The presence of inflammation and fibrosis can lead to the same phenomenon verified in steatosis.<sup>24, 47</sup> Without histological analyzes as comparative parameter, it is not possible to certify that HARI alteration is due to steatosis or other hepatic lesion. Inflammation and fibrosis, in the present study, did not correlate to HARI or HAPI.

Subjacent mechanism, both in fat accumulation and in inflammation or fibrosis, seems to be compression of portal triad structures, with earlier commitment of portal vein, consequently reduction on its flow and an increase in hepatic artery compensatory diastolic flow, which generates reduction in resistance index.<sup>30</sup> The structure of the venous wall, thinner and with more compliance than arteries walls may be the basis of this phenomenon.

However, other studies showed opposite results, with an increase in HARI in NAFLD group in comparison with healthy group,<sup>29,48</sup> a find that was justified by the increase in arterial microcirculation peripheral resistance due to fibrosis progression.

Notwithstanding, in this study, hepatic artery hemodynamic parameters, represented by resistance index (HARI) and pulsatility index (HAPI) were not able to distinguish healthy group from steatosis group, nor differentiate degrees of fat infiltration. In relation to HARI, similar findings, without significant difference between healthy and steatosis group nor between steatosis subgroups, had also been described.<sup>27</sup>

These variations in hepatic artery hemodynamic values in several different studies may arise from technique, since the site and position used for Doppler US examinations influences results. Some authors use intra-hepatic arterial segments;<sup>48</sup> others hepatic hilum,

<sup>24,27,29</sup> as in this study; or the point where hepatic artery crosses the main portal vein.<sup>30,43,48</sup> Besides, race, gender, age<sup>49</sup> and ultrasonography equipment's configurations<sup>48</sup> may be influencing factors.

Few studies evaluated HAPI, and even rarer are those which analyzed its role in steatosis evaluation and, thus, data regarding its normal values are restricted. It had been described 1.82 as the median for HAPI in healthy group<sup>29</sup> while the present study found media of  $1.46 \pm 0.41$ , without significant difference with steatosis group. More studies evaluating this parameter could contribute for better understanding of its diagnostic value in NAFLD.

In order to improve diagnosis, multiple parameters were used together for a discriminant equation. To the best of our knowledge, this is the first study with such analyze comparing data with biopsy in NAFLD patients.

Chosen parameters were those which, when used singly, were able to differentiate healthy and steatosis patients, VPI and HVWP.

In this group of patients, discriminant equation improved Doppler specificity to 97.96% in comparison to 79.6% and 93.61% of PVI and HVWP single specificities, respectively.

Furthermore, discriminant equation added a considerable increase to Doppler sensibility and accuracy in hepatic steatosis diagnosis comparing to single use of HVWP.

However, histological study remains essential for NAFLD diagnosis and for simple steatosis grading, as the studied hemodynamic parameters showed limitations for these purposes.

## **CONCLUSION**

Hepatocyte fatty infiltration causes hepatic hemodynamic alterations which can be used for NAFLD diagnosis. The most prominent effects were found in portal vein, through decrease in VPI and in hepatic vein, with alterations in waveform patterns. HARI and HAPI were not effective for detecting steatosis.

The proposed discriminant equation is a simple and clinical applicable method, which increases hepatic hemodynamic sensibility, specificity and accuracy for steatosis diagnosis.

Hepatic Doppler US indices, in general, have limitations to quantify hepatocyte fat content compared to histological results.

**REFERENCES**

1. Hebbard L, George J. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011;8:35.
2. Trivedi I, Rinella ME. NAFLD and cardiovascular disease: can the real association be determined? *Curr Hepatology Rep* 2014;13:130.
3. Takuma Y, Nouse K. Nonalcoholic steatohepatitis associated hepatocellular carcinoma: our case series and literature review. *World J Gastroenterol* 2010;16:1436.
4. Clark, JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. *J Clin Gastroenterol* 2006;40:S5-S10.
5. Younossi ZM, Stepanova M, Afendy M, et al. Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver diseases in the United States from 1988 to 2008. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011;9:524.
6. Ekstedt M, Franzén LE, Mathiesen UL, et al. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology* 2006;44:865.
7. Musso G, Gambino R, Cassader M, et al. Meta-analysis: natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. *Ann Med* 2011;43:617.
8. Rafiq N, Bai C, Fang Y, et al. Long-term follow-up of patients with nonalcoholic fatty liver. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009;7:234.

9. Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science* 2011;332:1519.
10. Hernaez R, Lazo M, Bonekamp S, et al. Diagnostic accuracy and reliability of ultrasonography for the detection of fatty liver: a meta-analysis. *Hepatology* 2011;54:1082.
11. Bar\_sic' N, Lerotic' I, Smirc'ic'-Duvnjak L, et al. Overview and developments in noninvasive diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2012;18:3945.
12. Contos MJ, Sanyal AJ. The clinicopathologic spectrum and management of nonalcoholic fatty liver disease. *Adv Anat Pathol* 2002;9:37.
13. Leite NC, Villela-Nogueira CA, Cardoso CR, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and diabetes: from physiopathological interplay to diagnosis and treatment. *World J Gastroenterol* 2014;20:8377.
14. COTRIM, HP. Doença hepática gordurosa não alcoólica. Programa de Educação Médica Continuada da Sociedade Brasileira de Hepatologia, 2006. Disponível em: <http://www.sbhepatologia.org.br>. Acesso em 29 fev. 2008.
15. Khov N, Sharma A, Riley TR. Bedside ultrasound in the diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2014;20:6821.
16. de Ledingham V, Vergniol J, Foucher J, et al. Non-invasive diagnosis of liver steatosis using controlled attenuation parameter (CAP) and transient elastography. *Liver Int* 2012;32:911.

17. Joy D, Thava VR, Scott BB. Diagnosis of fatty liver disease: is biopsy necessary? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:539.
18. Dasarathy S, Dasarathy J, Khiyami A, et al. Validity of real time ultrasound in the diagnosis of hepatic steatosis: a prospective study. *J Hepatol* 2009;51:1061.
19. Saadeh S, Younossi ZM, Remer EM, et al. The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002;123:745.
20. Chen CH, Lin ST, Yang CC, et al. The accuracy of sonography in predicting steatosis and fibrosis in chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci* 2008;53:1699.
21. Mishra P, Younossi ZM. Abdominal ultrasound for diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Am J Gastroenterol* 2007;102:2716.
22. Kim MY, Jeong WK, Baik SK. Invasive and non-invasive diagnosis of cirrhosis and portal hypertension. *World J Gastroenterol* 2014;20:4300.
23. Serife U, Tolga Y, Zafer K. Evaluation of portal venous velocity with Doppler ultrasound in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Korean J Radiol* 2011; 12:450.
24. Mohammadi A, Ghasemi-rad M, Zahedi H, et al. Effect of severity of steatosis as assessed ultrasonographically on hepatic vascular indices in non-alcoholic fatty liver disease. *Med Ultrason* 2011;13:200.
25. Karabulut N, Kazil S, Yagci B, et al. Doppler waveform of the hepatic veins in an obese population. *Eur Radiol* 2004;14:2268.

26. Solhjoo E, Mansour-Ghanaei F, Moulaei- Langorudi R, et al. Comparison of portal vein Doppler indices and hepatic vein Doppler waveform in patients with nonalcoholic fatty liver disease with healthy control. *Hepat Mon* 2011;11:740.
27. Aslan A, Türeli D, Aslan M, et al. Effects of Nonalcoholic Fatty Liver Disease on the Hepatic Vein and Artery. *J Med Diagn Meth* 2014;3:161.
28. Borges VFA, Diniz ALD, Cotrim HP, et al. Dopplerfluxometria da veia hepática em pacientes com esteatose não alcoólica. *Radiol Bras* 2011;44:1.
29. Bolca Topal N, Orcan S, Sı\_gırlı D, et al. Effects of fat accumulation in the liver on hemodynamic variables assessed by Doppler ultrasonography. *J Clin Ultrasound* 2014;00:000.
30. Mihmanli I, Kantarci F, Yilmaz MH, et al. Effect of diffuse fatty infiltration of the liver on hepatic artery resistance index. *J Clin Ultrasound* 2005; 33:95.
31. George J, Farrell GC. Practical approach to the diagnosis and management of people with fatty liver diseases. In: Farrell GC, George JHPMA. *Fatty liver disease: NASH and related disorders*. Malden: Blackwell; 2005, p 181.
32. Charatcharoenwitthaya P, Lindor KD. Role of radiologic modalities in the management of nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis* 2007;11:37.
33. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;41:1313.

34. Kakkos SK, Yarmenitis SD, Tsamandas AC, et al. Fatty liver in obesity: relation to Doppler perfusion index measurement of the liver. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:976.
35. Rocha HLOG, Diniz ALD, Borges VFA, et al. Assessment of portal venous index as a non-invasive method for diagnosing liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Arq Gastroenterol* 2012;49:14.
36. Barakat M. Portal vein pulsatility and spectral width changes in patients with portal hypertension: relation to the severity of liver disease. *Br J Radiol* 2002;75:417.
37. Balçı A, Karazincir S, Sumbas H, et al. Effects of diffuse fatty infiltration of the liver on portal vein flow hemodynamics. *J Clin Ultrasound* 2008;36: 134.
38. Erdoğmus, B, Tamer A, Buyukkaya R, et al. Portal vein hemodynamics in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Tohoku J Exp Med* 2008;215:89.
39. Dietrich CF, Lee JH, Gottschalk R, et al. Hepatic and portal vein flow pattern in correlation with intrahepatic fat deposition and liver histology in patients with chronic hepatitis C. *AJR Am J Roentgenol* 1998;171:437.
40. Oguzkurt L, Yildirim T, Torun D, et al. Hepatic vein Doppler waveform in patients with diffuse fatty infiltration of the liver. *Eur J Radiol* 2005;54: 253.
41. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology*, 9th ed. Philadelphia: WB Saunders Co; 1996, p 884.
42. McNaughton DA, Abu-Yousef MM. Doppler US of the liver made simple. *Radiographics*. 2011;31:161.

43. Popov D, Krasteva R, Ivanova R, et al. Doppler parameters of hepatic and renal hemodynamics in patients with liver cirrhosis. *Int J Nephrol* 2012;0:1.
44. Pozniak MA. Doppler ultrasound of the liver. In: Allan PL, Dubbins PA, Pozniak MA, et al.0 editors. *Clinical Doppler Ultrasound*. London: Churchill Livingstone; 2000, p 123.
45. Mohammadinia AR, Bakhtavar K, Ebrahimi- Daryani N, et al. Correlation of hepatic vein Doppler waveform and hepatic artery resistance index with the severity of nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Ultrasound* 2010;38:346.
46. Mohammad KT, Manouchehr K, Shohreh S, et al. Hepatic artery and portal vein Doppler indexes in non-alcoholic fatty liver disease before and after treatment to prevent unnecessary health care costs. *Int J Prev Med* 2014; 5:472.
47. Bayard M, Holt J, Boroughs E. Nonalcoholic fatty liver disease. *Am Fam Physician* 2006;73:1961.
48. Hizli S, Koçyigit A, Arslan N, et al. Hepatic artery resistance in children with obesity and fatty liver. *Indian J Pediatr* 2010;77:407.
49. Yazdi HR, Sotoudeh H. Assessment of normal Doppler parameters of portal vein and hepatic artery in 37 healthy Iranian volunteers. *Iran J Radiol* 2006;3:213.