



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA E
HEPATOLOGIA

POLIMORFISMOS A1298C e C677T EM PACIENTES COM DOENÇA HEPÁTICA
ESTEATÓTICA ASSOCIADA À DISFUNÇÃO METABÓLICA NO SUL DO BRASIL E
SUA INFLUÊNCIA NO RISCO CARDIOVASCULAR

ANELISE DA SILVA PINTO

Dissertação de Mestrado

PORTO ALEGRE, BRASIL

2024

Anelise da Silva Pinto

POLIMORFISMOS A1298C e C677T EM PACIENTES COM DOENÇA HEPÁTICA
ESTEATÓTICA ASSOCIADA À DISFUNÇÃO METABÓLICA NO SUL DO BRASIL E
SUA INFLUÊNCIA NO RISCO CARDIOVASCULAR

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

Orientadora: Carolina Uribe-Cruz

Porto Alegre

2024

CIP - Catalogação na Publicação

Pinto, Anelise da Silva
POLIMORFISMOS A1298C e C677T EM PACIENTES COM
DOENÇA HEPÁTICA ESTEATÓTICA ASSOCIADA À DISFUNÇÃO
METABÓLICA NO SUL DO BRASIL E SUA INFLUÊNCIA NO RISCO
CARDIOVASCULAR / Anelise da Silva Pinto. -- 2024.
84 f.
Orientadora: Carolina Uribe-Cruz.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e
Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Doença Hepática Esteatótica associada a
disfunção metabólica. 2. gene MTHFR. 3. Polimorfismo.
4. risco cardiovascular. 5. Sul do Brasil. I.
Uribe-Cruz, Carolina, orient. II. Título.

*“ Independente do que escolher como carreira,
lembre-se de que as lutas ao longo do caminho
servem apenas para moldá-lo para o seu
propósito. Ao iniciar seus caminhos, prossiga com
orgulho!”*

Agradecimentos

Quero expressar minha profunda gratidão às pessoas especiais que tornaram possível a realização deste trabalho.

Em primeiro lugar, minha eterna gratidão à minha família - meu pai Alvaro, minha mãe Ana Lúcia e meu irmão Leonardo. Ao meu marido Vinicius e às minhas filhas Beatriz e Luiza, agradeço pelo companheirismo inabalável e pelo apoio fundamental que tornaram este projeto uma realidade.

Aos colegas e colaboradores, Bruno e Thalia, o esforço incansável de vocês foi indispensável para a conclusão deste trabalho. Sem a dedicação de vocês, não teria sido possível alcançar esse marco.

À minha orientadora, Dra. Carolina Uribe-Cruz, expresso minha sincera gratidão por confiar em mim e por me conceder a honra de ser sua orientanda. Agradeço por sua orientação durante este período desafiador e por compartilhar sua valiosa experiência, que enriqueceu significativamente meu caminho acadêmico.

À colega Larisse, que nos orientou antes de sua viagem, agradeço por nos transmitir a importância da empatia e resiliência.

À minha amiga e colaboradora Melina, que enfrentou comigo cada desafio, desde o planejamento até as atividades de bancada. Agradeço por sua objetividade, sinceridade e pelos excelentes conselhos profissionais. Sua constante motivação foi crucial para a conclusão bem-sucedida deste trabalho.

Aos pacientes que colaboraram em participar da pesquisa, obrigada por contribuírem com esta pesquisa.

À equipe do Centro de Pesquisas Clínicas e da Unidade de Processamento Molecular do HCPA, meu sincero agradecimento pela contribuição significativa para este projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Gastroenterologia, agradeço pela oportunidade e pelo suporte ao longo desta jornada acadêmica. Este trabalho é também fruto do ambiente colaborativo e enriquecedor proporcionado por esse programa.

Índice

Resumo	1
Lista de Abreviatura	4
1. Introdução	8
2. Revisão Bibliográfica	10
2.1. Doença Hepática Esteatótica Associada à disfunção Metabólica (MASLD)	10
2.3. MASLD e Risco Cardiovascular (RCV)	13
2.4 Homocisteína e Metilenotetrahydrofolato Redutase	16
2.5. MTHFR, polimorfismo e sua relação no risco cardiovascular	17
3. Justificativa	22
4. Questão de pesquisa	23
5. Hipótese	23
6. Objetivos	23
6.1 Objetivo geral	23
6.2 Objetivos específicos	23
7. Materiais e métodos	24
7.1. População do estudo	24
7.2. Avaliação de polimorfismos	25
7.2. Análise Estatística	26
7.3. Aspectos Éticos	26
8. Resultados	27
8.1 Características gerais dos pacientes MASLD	27
8.2 Frequência genotípica e alélica dos polimorfismos C677T e A1298C.	30
8.3 Classificação de risco cardiovascular após aglutinação dos escores de risco.	31
8.4 Distribuição do risco cardiovascular entre os genótipos encontrados para o polimorfismo C677T	32
8.5 Distribuição do risco cardiovascular entre os genótipos encontrados para o polimorfismo A1298C	33
9. Discussão	34
10. Conclusão	39
11. Considerações finais	40
12. Referências bibliográficas	41
13. Dados suplementares	46
14. Anexo I: TCLE	48
15. Anexo II: Artigo:	51

Resumo

Antecedentes: A Doença Hepática Esteatótica Associada à Disfunção Metabólica (*MASLD* - Metabolic dysfunction-associated liver disease) está associada a risco cardiovascular (RC), sendo as doenças cardiovasculares uma das principais causas de morte entre os pacientes com *MASLD*. Sabe-se que a enzima Metilenotetrahidrofolato Redutase (*MTHFR*) influencia os níveis de homocisteína. Na presença de alterações genéticas ou deficiências nutricionais, esta enzima associa-se tanto à *MASLD* quanto à RC. **Objetivo:** No presente estudo buscamos verificar a frequência dos polimorfismos A1298C e C677T no gene *MTHFR*, em pacientes diagnosticados com *MASLD* no sul do Brasil e sua influência nos fatores de risco cardiovascular. **Metodologia:** Estudo clínico transversal que avaliou 147 pacientes com *MASLD*. Foram avaliados dados bioquímicos, antropométricos e os Índices de Castelli I e II, assim como o coeficiente aterosclerótico. Foram avaliadas as frequências dos polimorfismos C677T (rs1801133) e A1298C (rs1801131) do gene da *MTHFR* por q-PCR. **Resultados:** Quando avaliado o risco cardiovascular, 60,4% dos pacientes apresentaram baixo risco e 39,6% apresentou alto risco cardiovascular. o polimorfismo **C677T** apresentou uma frequência de 40,1% ,59,9% e 0% para o genótipo homocigoto saudável (CC), heterocigoto (CT) e homocigoto doente (TT) respectivamente. Para o polimorfismo **A1298C**, observou-se uma frequência de 7,5%, 40,8% e 51,4%, para os genótipos AA, AC e CC, respectivamente. **Conclusão:** Apesar da maioria dos pacientes apresentarem genótipos relacionados ao risco cardiovascular (RC), esses resultados não influenciaram no fenótipo de alto risco cardiovascular.

PALAVRAS-CHAVES: Doença Hepática Esteatótica associada a disfunção metabólica, gene *MTHFR*, Polimorfismo, risco cardiovascular, sul do Brasil.

Abstract

Background: Metabolic dysfunction-associated liver disease (MASLD) is associated with cardiovascular risk (CV), with cardiovascular diseases being one of the leading causes of death among MASLD patients. It is known that the enzyme Methylene tetrahydrofolate Reductase (*MTHFR*) influences homocysteine levels. In the presence of genetic alterations or nutritional deficiencies, this enzyme is associated with both MASLD and CV. **Objective:** In this study, we aimed to assess the frequency of the A1298C and C677T polymorphisms in the *MTHFR* gene in patients diagnosed with MASLD in southern Brazil and their influence on cardiovascular risk factors. **Methodology:** This was a cross-sectional clinical study that evaluated 147 MASLD patients. Biochemical and anthropometric data, Castelli Indices I and II, as well as the atherosclerotic coefficient, were assessed. The frequencies of the C677T (rs1801133) and A1298C (rs1801131) polymorphisms of the *MTHFR* gene were evaluated by q-PCR. **Results:** When assessing cardiovascular risk, 60.4% of patients had low risk, and 39.6% had high cardiovascular risk. The C677T polymorphism had frequencies of 40.1%, 59.9%, and 0% for the healthy homozygous (CC), heterozygous (CT), and diseased homozygous (TT) genotypes, respectively. For the A1298C polymorphism, frequencies of 7.5%, 40.8%, and 51.4% were observed for the AA, AC, and CC genotypes, respectively. **Conclusion:** Despite the majority of patients having genotypes related to cardiovascular risk (CV), these results did not influence the phenotype of high cardiovascular risk.

Keywords: MASLD, cardiovascular risk, MTHFR gene, polymorphisms, southern Brazil.

Lista de Abreviatura

APOB - Apolipoproteína B	ECRs – Ensaios Clínicos Randomizados
APOE - Apolipoproteína E	
ALD - do inglês <i>alcohol-associated/related liver disease</i>	EOCAD - do inglês <i>Early Onset Coronary Artery Disease</i>
ALT - Alanina Aminotransferase	EROS – Espécies reativas de oxigênio
AST- Aspartato Aminotransferase	FRC - fatores de risco cardiometabólicos
ASCVD – do inglês <i>Atherosclerotic cardiovascular disease risk estimator</i>	GGT - do inglês <i>Gama Glutamil Transferase</i>
CA - Circunferência Abdominal	HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica
CA – Coeficiente Aterogênico	Hb41c - Hemoglobina Glicada - A1c
CBS – Cistationa beta-sintase	HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre
CHC – Carcinoma hepatocelular	
C-IMT - Espessura Médio-Intimal da Carótida - (do inglês <i>Carotid intima-media thickness</i>)	HCY – do inglês <i>Homocysteine</i>
DAC - Doença arterial coronariana	HDL - do inglês <i>High-Density Lipoprotein</i>
DCV – Doença cardiovascular	HHCY – do inglês <i>Hiperhomocysteinemia</i>
DCNT – Doenças Crônicas Não Transmissíveis	HOMA-IR – do inglês <i>Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance</i>
DL – Dislipidemia	
DM 2 – Diabetes mellitus tipo 2	HPLC – do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
DNA - do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>	IC-I – Índice de Castelli

IMC - Índice de Massa Corporal

LDL - do inglês, *low density lipoprotein*

LEHG - Laboratório Experimental de Gastroenterologia e Hepatologia

MAFLD - do inglês *Metabolic associated fatty liver disease*

MASLD - do inglês *Metabolic dysfunction-associated liver disease*

MSLD - do inglês *Metabolic dysfunction liver disease*

MASH - do inglês *Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease*

MetALD - do inglês *MASLD and greater alcohol consumption*

NAFLD - do inglês *Nonalcoholic Fatty Liver Disease*

MTHFR - Metilenotetrahidrofolato -redutase

PCR - Proteína C-reativa

RCV - Risco Cardiovascular

RI - Resistência à Insulina

SLD - do inglês *Steatotic Liver Disease*

SM - Síndrome Metabólica

SNPs - do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*

TGL - Triglicerídeos

VCAM - do inglês *Vascular Cell Adhesion Molecule*

VEGF - do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*

VLDL-c -do inglês *Very Low Density Lipoproteins*

Lista de ilustrações

Figura 1: Fluxograma dos novos critérios de diagnóstico e nomenclaturas para SLD.....	11
Figura 2: Progressão da MASLD.....	12
Figura 3: Calendário da <i>MASLD</i> entre as sociedades cardiovasculares..	14

Lista de Tabelas

Tabela 1: Ensaios clínicos randomizados na <i>MASLD</i> no último ano a partir de junho 2019, tendo como objetivos desfechos cardiovasculares..	15
Tabela 2: Ensaios clínicos que avaliaram os polimorfismos no gene da MTHFR em humanos e sua associação com <i>MASLD</i> e risco cardiovascular, nos últimos 10 anos.	20
Tabela 3: Características clínicas e demográficas da população estudada.	28
Tabela 4: Frequência genotípica e frequência alélica dos polimorfismos C677T e A1298C no gene da MTHFR nos pacientes <i>MASLD</i> .	31
Tabela 5: Classificação dos pacientes com base no risco cardiovascular.	32
Tabela 6: Classificação dos pacientes com risco cardiovascular para o polimorfismo C677T	33
Tabela 7: Classificação dos pacientes com risco cardiovascular para o polimorfismo A1298C.	34
Tabela 8: Distribuição do tratamento de acordo com a classificação de risco com base na presença ou ausência de tratamento para hipertensão.	35
Tabela suplementar 1: Classificação do risco cardiovascular da população estudada com base nos critérios pré-estabelecidos.	48
Tabela suplementar 2: Distribuição do risco cardiovascular entre os grupos estudados. Dados expressos em n absoluto e porcentagem.	49

1. Introdução

A abordagem da relação entre a Doença Hepática Esteatótica Associada à Disfunção Metabólica (do inglês *metabolic dysfunction–associated steatotic liver disease* - *MASLD*) tem sido alvo de pesquisa nos últimos anos na comunidade médica⁽¹⁾. Observa-se uma prevalência significativa da *MASLD* ao longo dos anos, principalmente em áreas como América Latina, Oriente Médio e Norte da África⁽²⁾. Essa condição hepática, caracteriza-se pela retenção excessiva de triglicerídeos (TGL) nos hepatócitos, sendo fisiologicamente relacionada com uma série de fatores de risco cardiometabólicos, como a obesidade, Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), dislipidemia e hipertensão arterial⁽³⁾. A Doença Hepática Esteatótica (do inglês *Steatotic liver disease- SLD*), compreende um espectro de doenças como a esteatose simples (do inglês *metabolic steatotic liver disease- MSLD*), esteato-hepatite (do inglês *metabolic dysfunction–associated steatohepatitis- MASH*), podendo progredir para fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular. Contudo, as doenças cardiovasculares (DCV) se tornaram uma das principais causas de morbidade e morbimortalidade entre os pacientes com *MASLD*⁽⁴⁾. Younossi, *et al.* identificou que as doenças cardíacas foram a segunda principal causa de óbito em uma população *MASLD* nos últimos 32 anos, sendo a mortalidade por Carcinoma Hepatocelular (CHC) a principal causa⁽⁵⁾.

A relação entre a *MASLD* e o risco cardiovascular (RC) está relacionado a presença de distúrbios metabólicos como a resistência à insulina e dislipidemia, auxiliando no surgimento de aterosclerose e posteriormente no desenvolvimento de doenças cardiovasculares⁽⁶⁾. A identificação precoce de risco cardiometabólicos em pacientes com *MASLD* é essencial para a elaboração de estratégias de prevenção

e intervenção⁽²⁾. Além dos riscos usualmente avaliados como a presença de obesidade, hipertensão e dislipidemia, a homocisteína surge na literatura, como um biomarcador promissor na determinação de risco cardiovascular⁽⁷⁻¹²⁾. Os níveis da homocisteína são influenciados pelo estado nutricional ou fatores genéticos, a presença dos polimorfismos C677T e A1298C no gene da *metilenotetrahidrofolato-redutase (MTHFR)*, está relacionada com a presença de hiperhomocisteinemia^(13,14). A associação entre os polimorfismos e o risco cardiovascular vem sendo avaliada em contextos clínicos, contudo, poucos estudos avaliam em relação a *MASLD*⁽¹⁵⁾.

Com base nos impactos significativos das DCV em pacientes com *MASLD*, é necessária uma melhor compreensão da relação dos polimorfismos da MTHFR no risco cardiovascular nesta população.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Doença Hepática Esteatótica Associada à disfunção Metabólica (MASLD)

Em 2023, um consenso internacional substituiu as nomenclaturas da Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica, chamada de *NAFLD* (do inglês *Non alcoholic fatty liver disease*) e posteriormente de *MAFLD* (do inglês *Meatabolic associeated fatty liver disease*), para *MASLD* (do inglês *Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease*)⁽¹⁾. Conforme esta nova definição, o diagnóstico baseia-se na presença de esteatose hepática associada a pelo menos um dos cinco critérios de risco cardiometabólico, que são os critérios de Síndrome Metabólica (Figura 1)⁽²⁾.

- Índice de Massa Corporal (IMC) ≥ 25 kg/m² ou circunferência abdominal (CA) > 102 cm (homens) 88 cm (mulheres) ou equivalente ajustado há etnia;
- Glicose de jejum ≥ 100 mg/dL ou níveis de glicose após carga ≥ 140 mg/dL ou HbA1c $\geq 5,7\%$ ou a presença de DM2 ou seu tratamento;
- Pressão Arterial $\geq 130/85$ mmHg ou uso de medicamento antihipertensivo;
- Níveis de TGL ≥ 150 mg/dL ou tratamento para dislipidemia;
- Níveis de HDL (do inglês *High-density lipoprotein*) ≤ 40 mg/dL em homens e ≤ 50 mg/dL em mulheres ou tratamento medicamentoso para dislipidemia.

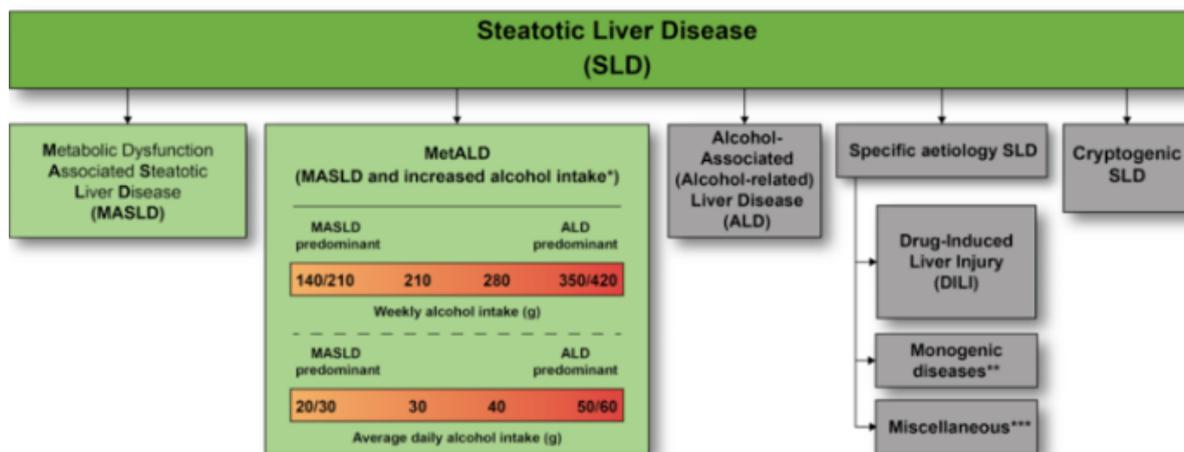


Figura 1: Fluxograma dos novos critérios de diagnóstico e novas nomenclaturas para SLD (1).

A Doença Hepática Esteatótica (do inglês - *Liver Disease Steatotic - SDL*) abrange um espectro de doenças como relacionadas: *MASLD*, o estágio inicial marcado pela retenção excessiva de TGL em mais de 5% dos hepatócitos; Esteato Hepatite Associada à Disfunção Metabólica (do inglês - *metabolic dysfunction-associated steatohepatitis- MASH*), que é definida pela formação de fibrose leve, injúria hepatocitária (balonização de hepatócitos), inflamação, corpos apoptóticos e de Mallory⁽¹⁾. Na falta de intervenção, a progressão da doença afetará a capacidade funcional do fígado, evoluindo para fibrose hepática e posteriormente cirrose, constituindo a base para o desenvolvimento do hepatocarcinoma (CHC) (Figura 2)⁽⁴⁾. Conforme esta nova terminologia, pacientes com diagnóstico de MASLD e consumo excessivo de álcool são classificados em *MetALD* (do inglês *MASLD and greater alcohol consumption*). Pacientes com alto consumo de álcool (>50 - 60g diário em mulheres e homens, respectivamente) sem a presença de disfunção metabólica, determina-se a presença de doença hepática alcoólica⁽¹⁾. Além disso, os pacientes com esteatose hepática, mas sem fatores de risco

cardiometabólicos evidentes e outras causas, são rotulados como criptogênicos⁽¹⁾.

(Figura 1)

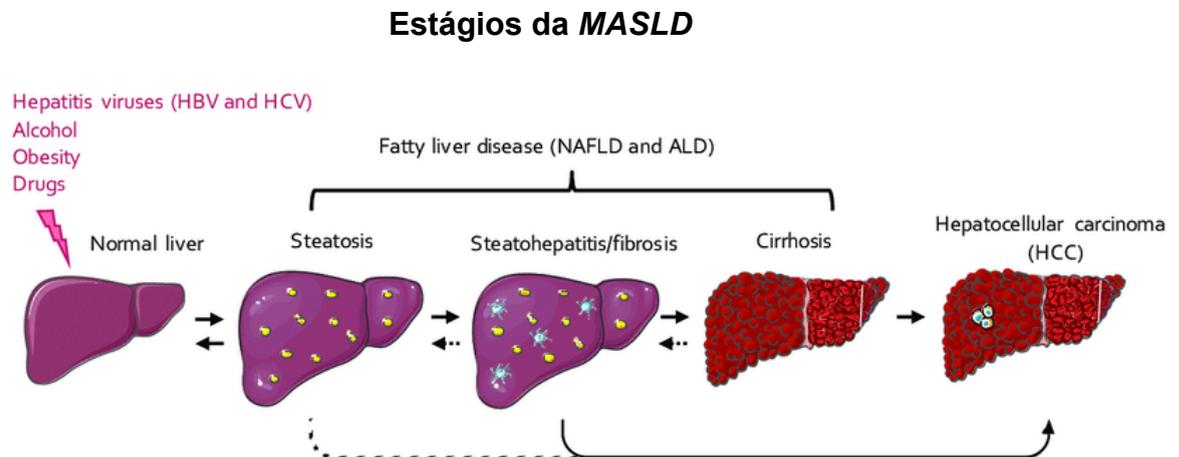


Figura 2. Progressão da *MASLD*. Ao longo do tempo a doença transcorre por distintos estádios, nos quais alguns são reversíveis e outros não. A progressão inicia em *MSLD*, *MASH* com fibrose, cirrose chegando ao carcinoma hepatocelular (HCC).⁽¹⁶⁾

A nível mundial identificou-se uma prevalência de 50,4% da doença ao longo de 32 anos, sendo as regiões da América Latina, Oriente Médio e Norte da África, com maior número de casos⁽⁵⁾.

Destaca-se a necessidade de investigações adicionais direcionadas a *MASLD*, não só em virtude de sua crescente incidência, mas também devido à sua relação com as taxas de mortalidade decorrentes de complicações cardiovasculares^(17,18).

2.3. MASLD e Risco Cardiovascular

Estudos têm encontrado correlações significativas entre a *MASLD* e as DCV, identificando que na presença da doença hepática, independente do grau de lesão, propicia a progressão na espessura da camada íntima-média (C-IMT, do inglês

Carotid intima-media thickness), aumentando a prevalência de placas carotídeas⁽¹⁴⁾. Este processo ocorre devido ao desenvolvimento da aterosclerose, que ocorre através da elevação plasmática de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL-c, do inglês *very low density lipoprotein-cholesterol*), carregadas de TGL, competem com outros metabólitos na depuração do colesterol, agravando o quadro de dislipidemia⁽¹⁹⁾. A depleção de TGL acarretará na elevação de colesterol nas partículas LDL (do inglês, *low density lipoprotein*), tornando-as mais densas e aterogênicas⁽⁴⁹⁾. Fisiologicamente, a LDL é menos aterogênica, mas quando há lesão no endotélio vascular, ocasionado pelo aumento do estresse oxidativo, elas adentram com mais facilidade no espaço subendotelial da parede vascular, onde, por serem mais vulneráveis à oxidação, ocorrerá a oxidação lipídica, tornando-se LDLs minimamente oxidadas, que apresentam características pró-aterogênicas⁽²⁰⁾.

Com os valores obtidos a partir do lipidograma pode-se utilizar outros métodos de estimativa de RCV como o *Atherosclerotic cardiovascular disease risk estimator* (ASCVD), o Índice de Castelli (IC-I) (um preditor de eventos cardiovasculares) e o Coeficiente aterogênico (CA) (razão entre colesterol não HDL e LDL)^(7,8). Estudos correlacionaram ASCVD com RCV em 10 anos e os resultados demonstraram um risco significativamente maior nos pacientes com *MASLD*⁽¹⁷⁾.

É necessária a busca por marcadores de risco cardiovascular indiretos, uma vez que muitos marcadores considerados padrão-ouro demandam tempo e envolvem custos elevados, colocando os pacientes com risco, a progressão da doença⁽²¹⁾. A inclusão de fatores de risco cardiometabólicos dentro dos critérios de diagnóstico, reforça a necessidade de tratamento para os riscos coexistentes. *American Heart Association* juntamente com outros institutos de referência em

cardiologia, avaliaram a predisposição das DCV em pacientes com *MASLD* e evidenciaram a forte associação RCV independente do grau de lesão hepática ⁽²²⁾. Observa-se na figura 3, os consensos internacionais realizados ao longo dos anos sobre a avaliação do RCV na *MASLD* (Figura 3).

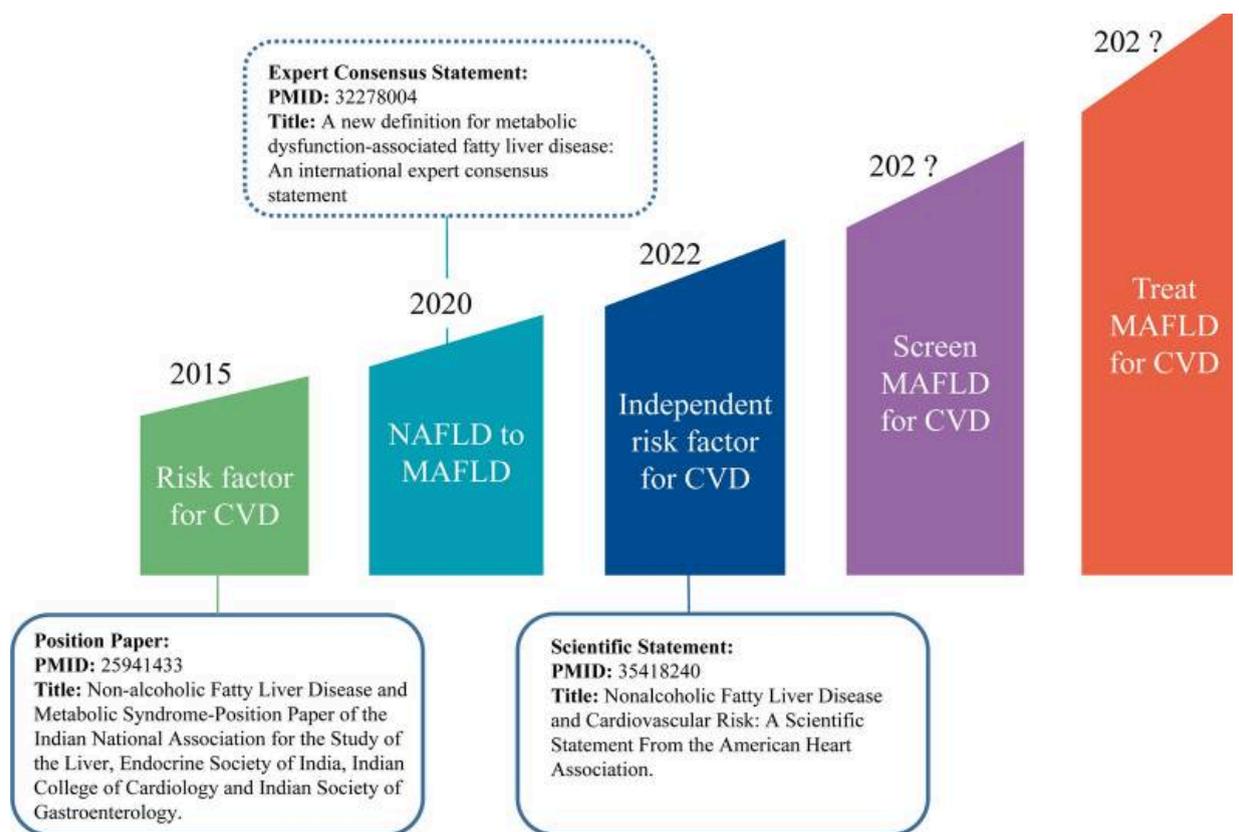


Figura 3: Calendário do reconhecimento da *MASLD* entre as sociedades cardiovasculares ⁽²³⁾. CVD: do inglês *Cardiovascular disease*; *NAFLD*: do inglês *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*. *MAFLD*: do inglês *Metabolic Associated Fatty Liver Disease*.

A associação entre *MASLD* e DCV vem sendo alvo de pesquisa nos últimos anos ^(24–27). Nossa equipe avaliou os marcadores de RCV mais utilizados em pacientes com *MASLD*, foram selecionados ensaios clínicos randomizados entre os anos de 2019 e 2022 (Tabela 1)⁽²¹⁾. Observou-se que os marcadores mais utilizados foram as medidas antropométricas, perfil lipídico e glicêmico, HOMA-IR, PCR, fluxo

da artéria braquial e espessura íntima-média carotídea, sendo, estes dois últimos métodos considerados padrão ouro.

Tabela 1: Ensaios clínicos randomizados na Doença Hepática Gordurosa Não- Alcoólica no de 2019, tendo como objetivos desfechos cardiovasculares. Busca no *Pubmed* pelos seguintes termos: *nonalcoholic fatty liver disease AND cardiovascular AND randomized controlled trial AND 1year*.

Autor, ano	Intervenção	Objetivo cardiovascular	Resultado(28)
Abdelbasset <i>et al.</i> 2020 ⁽²⁸⁾	Exercício intervalado de alta intensidade vs intensidade contínua moderada por 8 semanas em pacientes obesos diabéticos portadores de DHGNA	Avaliação da adiposidade visceral	Ambos os grupos de exercício mostraram uma redução significativa nos lipídeos viscerais, enquanto o grupo controle não apresentou diferença estatisticamente significativa
Cai <i>et al.</i> 2019 ⁽²⁹⁾	Jejum em dias alternados vs grupo controle entre 4 a 12 semanas de estudo	Avaliar a intervenção no peso corporal e perfil lipídico em pacientes portadores de DHGNA	Redução do peso e colesterol total no grupo intervenção
Darand <i>et al.</i> ,2019 ⁽³⁰⁾	Modificação do estilo de vida mais placebo ou 2 gramas/ dia de semente preta por 4 semanas	Efeito da semente preta (<i>Nigella sativa</i>) em fatores de risco cardiovascular em pacientes com DHGNA	Redução na glicose, insulina, resistência insulínica e aumento no índice de verificação quantitativa de sensibilidade à insulina
Castellino <i>et al.</i> ,2019 ⁽³⁰⁾	Suplementação de Atilix (Bionap, Belpasso, Catania, Italy) por 6 meses	Efeito no risco cardiovascular em pacientes com síndrome metabólica	Melhora do peso, circunferência abdominal, hemoglobina glicosilada, perfil lipídico, fluxo da artéria braquial, espessura íntima-média carotídea
Draz <i>et al.</i> ,2020 ⁽³¹⁾	Eletroacupuntura vs treinamento intervalado aeróbico por 6 semanas em pessoas portadoras de DHGNA	Avaliação peso, índice de massa corporal, triglicerídeos, proteína C reativa	Ambas as intervenções apresentaram melhoras nos triglicerídeos, proteína C reativa, com quedas maiores no grupo da eletroacupuntura.

			Quanto a diferença entre os dois grupos o único marcador sem diferença estatisticamente significativa foi a proteína C reativa
--	--	--	--

*Esse estudo teve a melhor forma de avaliação do risco cardiovascular. Abreviatura: DHGNA

Contudo, é necessária a avaliação constante dos marcadores de risco cardiovascular, desse modo monitoram-se os níveis de glicose, insulina, hemoglobina glicada, lipídeos e proteína, além de escores de risco cardiovascular, como determinado pela *American College of Cardiology/ American Heart Association* ou *Framingham*^(23,32). Fatores como, aterosclerose subclínica, calcificação, C-IMT e placa carótida, também são considerados nas avaliações regulares^(19,24,26,33). Apesar da fibrose estar relacionada à gravidade da doença hepática, menos de 5% dos pacientes morreram devido a causas relacionadas ao fígado, sendo a principal a DCV a principal causa de óbito⁽⁹⁾.

2.4 Homocisteína e Metilenotetrahidrofolato Redutase

Nos últimos anos, pesquisas avaliaram a relação entre a homocisteína (HCY) e RCV devido à sua relação no desenvolvimento de DCV assim como também sua influência na *MASLD*⁽⁷⁻¹²⁾. A metabolização da HCY é influenciada pelo estado nutricional das vitaminas do complexo B e/ou por fatores genéticos⁽³⁴⁾. Suas principais rotas são duas a transulfuração, onde a metionina é convertida em HCY e combinada com serina para produzir cistationina, dependente da enzima Cistationa beta-sintase (CBS), cofatorizada pela piridoxal cisteína (vitamina B6). E a outra rota é a remetilação, onde a HCY é remetilada para formar metionina, recebendo um grupamento metil da 5-metiltetra-hidrofolato, derivado do folato

alimentar, catalisado pela enzima MS, cofatorizada pela cianocobalamina (vitamina B12)⁽¹⁰⁾. Nesse ciclo, a enzima Metilenotetrahidrofolato-redutase (MTHFR) desempenha um papel crucial, convertendo 5-10 metiltetra-hidrofolato em 5-metiltetra-hidrofolato, com a vitamina B9 como substrato ⁽¹⁰⁾.

Sabe-se que a hiperhomocisteinemia grave (HHCY) (30-100 umol/mL, em adultos) é um fator de risco independente para DCV, por desencadear aumento nas concentrações de substâncias pró-oxidantes, favorecendo a lipoxidação e a aterogênese^(6,12). A mesma, ocorre devido a alterações genéticas nos genes que codifica a enzima CBS e MTHFR⁽⁹⁾.

Contudo, na literatura, há divergência ao avaliar os níveis de HCY em pacientes *MASLD* que apresentam RCV, mostrando que o grau de lesão hepática influencia em seus níveis ^(7-9,35). Importante reforçar que a HCY é metabolizada no fígado e as alterações fenotípicas resultantes da progressão da doença podem influenciar seus níveis⁽³⁴⁾. Portanto, uma compreensão genética do seu metabolismo é crucial para interpretar adequadamente os resultados observados⁽³⁵⁾. Os polimorfismos de um nucleotídeo, conhecidos como SNPs, C677T e A1298C no gene da enzima MTHFR destacam-se como prováveis fatores relacionados a elevações nas concentrações séricas de HCY⁽³⁶⁾.

2.5. MTHFR, polimorfismo e sua relação no risco cardiovascular

Alterações genéticas são alvos de pesquisa a anos, devido a sua influência no desenvolvimento de inúmeras patologias, bem como sua utilidade como marcadores de herança genética, capazes de revelar a predisposição ao desenvolvimento de certas doenças ⁽³⁷⁾. Os polimorfismos genéticos são variações na sequência de DNA que podem ser classificadas como polimorfismos de

sequência (quando se difere um nucleotídeo) ou de comprimento (quando a modificação é relativa ao número de repetições de uma sequência tandem). Os polimorfismos podem criar ou destruir sítios de reconhecimento de enzimas de restrição e podem estar associados a alteração de apenas uma base. Ocorrem juntos, formando blocos haplotípicos, ou apenas substituindo um único nucleotídeo, denominando-se polimorfismo de nucleotídeo único (do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*, SNPs)⁽³⁸⁾. Os SNPs mais estudados associados ao aumento dos níveis séricos de HCY são os C677T (rs1801133) e A1298C (rs1801131) do o gene que codifica a enzima MTHFR (Tabela 2)^(13,15,38-42).

O polimorfismo C677T resulta na troca de uma Citosina por uma Timina na posição 677, codificando Valina em vez de Alanina no códon 222. Tornando uma MTHFR mais termolábil, reduzindo sua capacidade enzimática e influenciando nos níveis de HCY e na redução do ácido fólico plasmático⁽⁴³⁾. Já o polimorfismo A1298C, envolve a troca de Adenina por Citosina na posição 1298, codificando alanina em vez de glutamina no códon 429, também reduz a atividade da MTHFR, embora em menor magnitude. A presença de ambos os polimorfismos terá um impacto direto nos níveis de HCY, uma vez que a conversão em metionina estará reduzida⁽¹⁵⁾.

Estudos com diferentes tipos de população relatam a associação dos polimorfismos C677T e A1298C no gene *MTHFR* com a presença de *MASLD*, encontrando associações significativas nos genótipos homozigotos afetados (TT) e (CC) com a doença⁽⁴⁴⁾. Indicando um possível risco aumentado de desenvolver a doença por conta do genótipo, contudo, relata-se a inconclusividade na presença destes polimorfismos na população brasileira.

Neste sentido, Brochado *et al.*⁽⁴⁵⁾, avaliou a frequência dos polimorfismos no

gene da *MTHFR* C667T e A1298C em brasileiros com MASLD, observando que a presença dos alelos mutados não foram considerados fatores de risco para o desenvolvimento da *MASLD*⁽⁴⁵⁾. Outro estudo realizado no Brasil, avaliou a frequência dos polimorfismos C677T e A1298C, os níveis do lipidograma e risco cardiovascular em 115 adolescentes. O polimorfismo C677T, apresentou frequências de 60%, 30% e 9,6% para os genótipos homocigoto saudável (CC), heterocigoto (CT) e homocigoto doente (TT), respectivamente. E para o polimorfismo A1298C, se obteve 57,4% genótipo homocigoto saudável (AA), 31,3% heterocigoto (AC) e 11,3% homocigoto doente (CC), respectivamente⁽⁷⁾. Encontrando associações significativas, ao agrupar os indivíduos com alelos CT e TT, para o SNP C677T, com os níveis plasmáticos de LDL-ox⁽⁷⁾. Indicando uma possível relação entre os polimorfismos mutados e o risco cardiovascular.

As pesquisas sobre a associação entre SNPs e doenças cardiovasculares (DCV) têm crescido ao longo dos anos, com um aumento no estudo desses polimorfismos em pacientes com *MASLD*. Com base, buscou-se estudos que analisaram os polimorfismos no gene *MTHFR* em humanos com *MASLD*, tendo como objetivo os desfechos cardiovasculares e hepáticos. Esta busca foi necessária para entender a frequência dos mesmos em diferentes populações. A busca foi feita no Pubmed com as seguintes palavras-chave: *MTHFR, polymorphism, homocysteine, NAFLD, cardiovascular risk*. Foram encontradas associações entre níveis elevados de HCY e genótipos homocigoto TT e CC dos polimorfismos C677T e A1298C, respectivamente, do gene da *MTHFR* com a *MASLD* e *SLD*. Associações entre o genótipo homocigoto doente, CC, A1298C com a progressão da *MASLD*, caracterizada pela presença de resistência à insulina e elevações nos níveis de AST e gama GT em comparação com o genótipo AA,

homozigoto saudável. Essa relação indica uma possível associação entre os polimorfismos e as variáveis hepáticas. No entanto, ao comparar a frequência destes polimorfismos em pacientes controles e com *MASLD*, observa-se que há diferenças significativas, havendo associação apenas entre o polimorfismo C677T do genótipo homozigoto doente (TT), com os níveis de HCY em pacientes doentes. Em resumo, na literatura houveram associações entre os genótipos CC no gene A1298C e TT no gene C677T, com níveis elevados de HCY, assim como progressão da *MASLD*^(11,43).

Tabela 2: Ensaios clínicos que avaliaram os polimorfismos no gene da MTHFR em humanos e sua associação com *MASLD* e risco cardiovascular, nos últimos 10 anos.

	Autor/ Ano	País	Tamanho amostral	Objetivos	Resultados
1	Brochado <i>et al</i> , 2013 ⁽⁴⁵⁾	Brasil	134 <i>NAFLD</i> e 134 controle	Investigar os níveis de homocisteína e a MTHFR C677T e A1298C polimorfismos como fatores de risco para <i>NAFLD</i>	Níveis de HCY altos em pacientes com <i>NAFLD</i> em comparação com o controle. Não houve diferença entre esteatose e <i>NASH</i> . Não houve diferença no genótipo e frequência alélica dos polimorfismos da MTHFR.
2	Catalano <i>et al</i> , 2014 ⁽¹⁵⁾	Itália	94 sujeitos (26 com MTHFR 1298AA e 68 MTHFR 1298C)	Prevalência e gravidade da <i>NAFLD</i> em pacientes em acompanhamento nutricional e associações com o SNP do gene MTHFR A1289C e à HHCY	Foi constatado que pacientes com o genótipo heterozigoto MTHFR 1298AC tiveram uma <i>NAFLD</i> mais grave, maior resistência à insulina e maiores níveis de AST e gama GT em comparação aos pacientes com o genótipo selvagem MTHFR 1298AA. O estudo concluiu que o polimorfismo MTHFR 1298AC pode ser um preditor fraco da gravidade da <i>NAFLD</i> .
3	Kasapoglu <i>et al</i> 2015 ⁽¹³⁾	Turquia	150 com <i>FLD</i> e 136 controle	Relação entre mutações genéticas comuns no metabolismo do folato e o risco de desenvolver <i>FLD</i> .	Os resultados sugerem que os níveis elevados de Hcy e a presença de mutações MTHFR 677C/T e MTHFR 1298A/C estão associados ao desenvolvimento de <i>FLD</i> em pacientes.

4	Wang <i>et al</i> 2018 ⁽³⁷⁾	China, Chongqing	243 com NAFLD e 388 controle	Associação entre o polimorfismo do gene da MTHFR 677 CT e os níveis de HCY	Não houve diferença significativa no genótipo e na frequência alélica da MTHFR 677 CT nos pacientes com NAFLD, já os níveis de HCY foram significativamente altos.
5	Orlvisky V <i>et al</i> , 2015 ⁽⁴⁶⁾	Rússia	100 pacientes NAFLD e 40 controle	Associação entre os polimorfismos C677T e A1298C do gene MTHFR e sua influência nos níveis de HCY em pacientes NAFLD	Não houve diferença significativa entre a distribuição dos genótipos investigados entre os pacientes NAFLD e controle. Houve diferença entre o nível do polimorfismo C677T e o níveis de HCY em pacientes NAFLD, não houveram associação significativas do gene A1298C do gene da MTHFR.
6	Morais, 2015 ⁽⁷⁾	Brasil	115 adolescentes	Investigar alterações nos níveis de HCY, no perfil lipídico e nas concentrações de VitB6, B12 e folato, assim como as possíveis relações entre os SNPs C677T e A1298C no gene da MTHFR.	Houve relação dos SNPs C677T e A1298C com os níveis de HCY. Contudo, houve influência do genótipo em relação ao SNP C677T sobre níveis de Vit B6 e LDL-ox.
7	Zhang, <i>et al</i> , 2018 ⁽³⁹⁾	China	875 EOCAD e 956 controle	Investigar associações dos SNPs da MTHFR e a EOCAD	A variante MTHFR-677C/T estava significativamente associada ao risco de EOCAD nos modelos genéticos dominante e recessivo. Os níveis de HCY foram mais elevados no genótipo TT, mais baixos no genótipo CC e intermediários nos heterozigotos. Concluiu-se que o alelo T da variante -677C/T do MTHFR predispõem a altos níveis de homocisteína e é um importante marcador de EOCAD na população chinesa.
8	Gálvez, <i>et al</i> , 2021 ⁽⁴⁰⁾	Chile	193 (138 mulheres e 55 homens)	Caracterizar variantes alélicas e associações entre APOB, APOE e o polimorfismo da MTHFR, juntamente com elevadas concentrações de lipídeos e o desenvolvimento de HAS e CA.	APOB, APOE e o SNP da MTHFR estão associados com os níveis de lipídios em mulheres saudáveis.
9	Qin, <i>et al</i> , 2021 ⁽⁴⁷⁾	China	20.702 adultos com HAS	Avaliar interação entre níveis séricos de folato e Vit B12 com os genes C667T no gene da MTHFR no risco de AVC isquêmico	O risco de AVC foi significativamente maior em pacientes hipertensos com baixos níveis de folato e B12. O efeito do tratamento com folato em pacientes com baixo teor de folato e B12 com o genótipo CC e com níveis altos de folato e B12 no genótipo TT.
10	Sun <i>et al</i> , 2018 ⁽⁴¹⁾	China	424 indivíduos	(CCA-IMT) e bifurcação carotídea, níveis de Hcy, vitamina B6 (VB6), vitamina B12 (VB12) e ácido fólico (FA) e 9 SNPs em Genes MTHFR, MTR,	Associações significativas são encontradas entre polimorfismos genéticos relacionados ao metabolismo da Hcy, índices bioquímicos e índices CIMT. Existem interações complexas entre

				MTRR, BHMT, SHMT1, CBS.	polimorfismos genéticos para CCA-IMT e CIMT.
--	--	--	--	----------------------------	---

Legendas: HCY, Homocisteína; CA, do inglês *Coronary Disease*; MTHFR, Metlienotetrahidrofolato-redutase; APOB, Apolipoproteína; APOE, Apolipoproteína E. SNP, do inglês *Single nucleotide polymorphism*; HAS, Hipertensão arterial sistêmica; FLD, do inglês - Fatty Liver Disease; LDL -ox, do inglês - Low Density lipoprotein oxidative; DCC, do inglês *Cardiopathy Congenital Disease*; NAFLD: do ingles *Non-alcoholic fatty liver disease*.

Portanto, no presente estudo, avaliamos os polimorfismos C677T e A1298C do gene MTHFR em pacientes *MASLD* e sua influência no risco cardiovascular.

3. Justificativa

Considerando que nos próximos anos espera-se uma elevada incidência de *MASLD*, e tendo em vista que DCV é o principal fator de risco associado à óbitos nestes pacientes, junto com o fato que os desfechos principais nos estudos de *MASLD* ainda são hepáticos e que poucos estudos avaliam o risco cardiovascular. Explorar a variação genética nestes pacientes se torna interessante para poder obter marcadores capazes de predizer o risco cardiovascular.

Desta forma, avaliar a frequência dos polimorfismos A1298C e C677T no gene *MTHFR* e sua influência em variáveis de risco cardiovasculares, em pacientes com *MASLD*, poderá ser útil na compreensão destas possíveis relações e na aplicação de tratamento precoce e preventivo das DCV.

4. Questão de pesquisa

Qual a frequência dos polimorfismos A1298C e C677T no gene da MTHFR, em pacientes com *MASLD*? E os fatores de risco cardiovascular estão relacionados com os genótipos doentes?

5. Hipótese

A frequência dos polimorfismos A1298C e C677T no gene *MTHFR* em pacientes com *MASLD* estão relacionados aos fatores de risco cardiovascular.

6. Objetivos

6.1 Objetivo geral

Verificar a frequência dos polimorfismos A1298C e C677T no gene *MTHFR*, em pacientes diagnosticados com *MASLD* no sul do Brasil e sua influência nos fatores de risco cardiovascular.

6.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar a população do estudo de acordo com as variáveis demográficas, antropométricas e estágios da *MASLD*.
2. Determinar a frequência dos polimorfismos A1298C e C677T em pacientes com *MASLD*.
3. Identificar risco cardiovascular de pacientes com *MASLD*.
4. Avaliar se os polimorfismos A1298C e C677T têm efeito na presença de risco cardiovascular em pacientes com *MASLD*.

7. Materiais e métodos

7.1. População do estudo

Se utilizaram 154 amostras de indivíduos que participaram em um estudo prévio nº CAAE: 38556920.2.0000.5327. Neste, recrutaram-se participantes de ambos os gêneros, com mais de 18 anos de idade, diagnosticados com *MASLD* há pelo menos 1 ano desde a inclusão no estudo. A confirmação diagnóstica foi por meio de biópsia hepática ou elastografia, com ou sem alterações nos níveis de AST ou ALT, associado à síndrome metabólica. Os indivíduos foram recrutados no ambulatório de Gastroenterologia (Zona 15) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Após o recrutamento, foi agendada uma consulta com o participante no Centro de Pesquisa Clínica. Neste 1º momento, foi realizada a aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e explicação dos riscos e benefícios da participação no estudo, assim como os protocolos aos quais serão submetidos. Após o esclarecimento de dúvidas, os participantes assinaram o TCLE e posteriormente, foi realizada a coleta de sangue (sem necessidade de jejum). Finalizada esta etapa, os participantes foram liberados.

Para o presente estudo de avaliação de polimorfismos do *MTHFR* na *MASLD* os indivíduos foram contatados novamente por telefone para a explicação dos novos objetivos. Ao concordarem, foram orientados a assinar o novo TCLE (Anexo I). Não sendo necessário realizar coleta de amostra biológica (sangue), já que ia ser utilizado o mesmo material do estudo previamente coletado.

Durante a coleta de informações para este estudo, foram registrados dados demográficos como data de nascimento, idade, raça e sexo. No que diz respeito aos dados clínicos, variáveis como fumo ativo, além de parâmetros bioquímicos

foram meticulosamente coletados. Além disso, os resultados dos escores de risco cardiovascular, Índice Castelli (CR-I e CR-II) e coeficiente aterogênico (CA), também foram incluídos na coleta de informações.

Para obter os valores de CR-I e CR-II, utilizou-se as fórmulas:

CR-I = CT/HDL-c e

CR-II = LDL-c/HDL-c, respectivamente⁽⁴⁸⁾;

O valor de CA foi calculado como a razão entre colesterol não HDL e HDL, da seguinte forma: (colesterol sérico total — HDL-C sérico) / colesterol HDL.

No que se refere aos dados antropométricos, informações cruciais como peso, altura e circunferência abdominal foram coletadas do prontuário dos pacientes. Esses dados são essenciais para determinar o estado nutricional, onde o Índice de Massa Corporal (IMC) é utilizado para classificação, e a circunferência abdominal é empregada para estimar o risco de complicações metabólicas. Todos esses dados foram coletados de um banco de dados pré-existente (CAAE: 38556920.2.0000.5327).

7.2. Avaliação de polimorfismos

Previamente, com as assinaturas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) dos participantes, as amostras foram coletadas em tubos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e armazenadas a -80°C. Para avaliar a frequência do polimorfismo, DNA foi extraído das amostras de sangue, utilizando o kit *Easy-DNA™ gDNA Purification* (Invitrogen, BRASIL) seguindo as instruções do fabricante. Após a extração, as amostras foram armazenadas no freezer a -20°C para avaliação da concentração e qualidade do DNA com o equipamento *NanoDrop*. Para investigar os polimorfismos genéticos C677T

(rs1801133) e A1298C (rs1801131) do gene MTHFR, foram usados 2 microlitros de DNA por amostra. A técnica utilizada foi a q-PCR, empregando sondas *TaqMan* específicas (C_850486_20 e C_1202883_20, respectivamente), seguindo as instruções do fabricante.

7.2. Análise Estatística

Os dados foram armazenados no banco de dados do SPSS, onde foram distribuídas as variáveis de interesse com as suas devidas classificações. Após, realizou-se uma análise descritiva, onde os dados quantitativos foram descritos por média e desvio padrão. As variáveis categóricas foram descritas com frequência absoluta e relativa. Para analisar a associação entre os polimorfismos e as variáveis de risco cardiovascular, foi utilizado o teste do Qui-quadrado seguido do teste de correlação linear de *Pearson*. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$) e as análises foram realizadas utilizando o programa estatístico SPSS versão 21.0.

Para criar um único escore de risco cardiovascular, selecionou-se os três escores de risco CA, CRI e CRII, onde selecionamos somente os pacientes classificados com alto risco cardiovascular, com base nisso, foi criada uma nova variável determinada como presença de RC.

7.3. Aspectos Éticos

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sobre nº CAAE: 69919923.5.0000.5327. Todos os

participantes assinaram um Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) em anexo I.

8. Resultados

8.1 Características gerais dos pacientes MASLD

154 indivíduos foram selecionados para o estudo, contudo, a avaliação dos polimorfismos C677T e A1298C em 7 indivíduos não foi possível de ser realizada devido à falta de amostras de sangue. Assim, o tamanho total da amostra do estudo foi de 147 pacientes com *MASLD*.

Os resultados com as variáveis bioquímicas estão demonstrados na Tabela 3. Houve uma prevalência de pacientes idosos (58,3%), sendo a maioria mulheres (67,3%), de etnia branca (83%). Em relação ao tabagismo, a maioria da amostra era de não fumantes (61%), 29,5% eram ex-fumantes e 9,6% fumavam ativamente.

A avaliação antropométrica da amostra estudada, indicou a prevalência de obesidade, com valores de IMC e circunferência abdominal acima dos valores recomendados.

Os parâmetros bioquímicos como creatinina, albumina, PCR e albumina, na amostra estudada, estavam dentro dos níveis adequado, indicando, respectivamente, baixo risco de deterioração da função renal, ausência de desnutrição juntamente com um bom controle metabólico e a ausência de inflamação ou infecção.

A média do lipidograma aponta variações nos níveis de TGs, os quais se encontram na faixa limítrofe. Quanto ao HDL, observou-se uma ligeira conformidade com os valores recomendados, enquanto os valores de LDL

apresentaram-se adequados. Esses resultados indicam um perfil lipídico levemente alterado, com os níveis de triglicerídeos acima das recomendações estabelecidas.

A amostra foi predominantemente composta por pacientes que utilizavam medicamentos para o tratamento de Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS), além de serem consideradas de baixo risco cardiovascular, com base nos resultados de IC-I e IC-II.

Tabela 3. Característica clínicas e demográficas da população estudada. Dados expressos em média e desvio padrão.

Variável	MASLD = 147
	Média ± dp
Idade (anos)	58,38c 12,6
Sexo (n, %)	
Homem	48 (32,7)
Mulher	99 (67,3)
Etnia (n, %)	
Branco	122 (83)
Preto	6 (4,1)
Pardo	19 (12,9)
Fumo Ativo (n, %)	
Não	89 (61)
Sim	14 (9,6)
Ex- fumante	43 (29,5)
HAS	
Sim	112 (76,2)
Não	35 (23,8)
TTO HAS	
Sim	107 (72,8)
Não	40 (27,2)
TTO estatina	
Sim	70 (47,6)
Não	77 (52,4)
TTO aspirina	
Sim	22 (15)

Não	125 (85)
IMC (kg/m ²)	32,4 ± 5,8
CA (cm)	108,9 ± 13,7
Peso (kg)	84,9 ± 19,0
PAS (mmHg)	126,5 ± 19,9
PAD (mmHg)	71,3 ± 13,1
Creatinina (mg/dL)	0,91 ± 0,55
Albumina (mg/dL)	4,20 ± 0,53
TGL (mg/dL)	154,8 ± 82,4
PCR (mg/L)	9,5 ± 12,8
Colesterol Total (mg/dL)	178,2 ± 43,2
HDL (mg/dL)	43,6 ± 11,7
LDL (mg/dL)	103,8 ± 38,2
Glicose (mg/dL)	137,7 ± 55,4
HbA1C (%)	6,8 ± 1,88
HOMA-IR	5,17 ± 3,9
Hemoglobina (g/dL)	13,3 ± 1,9
Hematócrito (mg/dL)	40,2 ± 5,6
Plaquetas (mm ³)	199,6 ± 85,8
Leucócitos (c+el/mm ³)	7,03 ± 2,79
Vitamina B12 (mg/dL)	395,4 ± 134,25
IC-I	4,2 ± 1,27
IC-II	2,49 ± 1,0
Coeficiente Aterogênico	3,2 ± 1,29
Estágios da MASLD	
Esteatose	n= 49
<i>MASH</i>	n= 45
Cirrose	n= 53

IMC: Índice de Circunferência Abdominal; CA: Circunferência abdominal; PAS: Pressão Arterial Sistólica; PAD: Pressão Arterial Diastólica; TG: Triglicerídeos; PCR: Proteína C-Reativa; HDL; *High-density lipoprotein*; LDL: *Low-density lipoprotein*. IC-I, Índice de Castelli -I; IC-II, Índice de Castelli-II.

Os exames glicêmicos da população estudada indicam uma tendência à elevação; no entanto, esses valores estão alinhados com as características

esperadas da amostra. Há uma gestão moderada da glicemia ao longo do tempo, mas com uma propensão à elevação.

O indicador de resistência à insulina, HOMA-IR, apresenta uma média de 5,1, valores compatíveis com a predominância de pacientes com IMC obeso. É relevante notar que a resistência à insulina é considerada um fator de risco cardiometabólico, estando dentro dos critérios de diagnóstico da *MASLD*.

A média dos parâmetros hematológicos da população estudada estavam dentro da recomendação, indicando a ausência de distúrbios hematológicos.

8.2 Frequência genotípica e alélica dos polimorfismos C677T e A1298C.

Para o polimorfismo C677T, dos 147 pacientes avaliados, a frequência para o genótipo homozigoto saudável (CC) foi de 40% e para o genótipo heterozigoto (CT) 59%. Notavelmente, não foram identificados pacientes com o genótipo homozigoto doente (TT). Para o polimorfismo A1298C, 7,5% dos pacientes apresentaram o genótipo homozigoto saudável (AA), 40% apresentaram o genótipo doente. Estas diferenças foram consideradas significativas ($p = 0.021$).

A frequência de ambos polimorfismos não estava no equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p=0$). (Tabela 4).

Tabela 4. Frequência genotípica e frequência alélica dos polimorfismos C677T e A1298C no gene da MTHFR nos pacientes *MASLD*. Dados expressos em número absoluto e porcentagem.

Frequência dos polimorfismos no gene da MTHFR							
	Genótipos (n /%)			p	x ²	Alelos (n /%)	
	CC	CT	TT			C	T
C677T	59 (40,1)	88 (59,9)	0	0	<0,001*	0,70 (70,07)	0,299 (29,93)
	AA	AC	CC			A	C
A1298C	12 (7,5)	61 (40,8)	73 (51,7)	0	0,021*	0,278 (27,89)	0,734 (73,47)

P*=Hardy-Weinberg Equilibrium; X² = Teste do Qui-Quadrado.

8.3 Classificação de risco cardiovascular após aglutinação dos escores de risco.

Os resultados dos índices de Castelli I e II e CA individuais (Tabela suplementar 1) foram combinados e categorizados em baixo risco cardiovascular e alto risco cardiovascular. Quando um alto índice cardiovascular estava presente em qualquer um destes índices, os resultados foram agregados e formou-se um único índice classificando-os em baixo e alto risco cardiovascular, com base na presença de alto risco em pelo menos um desses índices. Os resultados revelam a prevalência de 60,4% de pacientes com baixo risco cardiovascular, no entanto observa-se que 39,6% apresentam alto risco cardiovascular. Estes valores foram considerados significativos $p=0.027$. (Tabela 5).

Tabela 5: Classificação dos pacientes com base no risco cardiovascular, dados expressos em N absoluto e porcentagem.

	n (%)	<i>p-valor</i>
Baixo risco cardiovascular	87 (60,4)	0.027*(a)
Alto risco cardiovascular	57 (39,6)	
(a) Teste do Qui-Quadrado.		

8.4 Distribuição do risco cardiovascular entre os genótipos encontrados para o polimorfismo C677T

Ao estratificar os genótipos identificados para o polimorfismo C677T em relação ao risco cardiovascular, nota-se uma proporção similar de pacientes heterozigotos CT, tanto para baixo risco cardiovascular (59,5%) quanto para alto risco (40,5%). O mesmo padrão é observado para o genótipo saudável CC, onde a quantidade de pacientes com baixo risco cardiovascular é comparável àqueles com alto risco, sendo 61% e 39%, respectivamente. Não havendo diferenças significativas entre os genótipos estudados e o risco cardiovascular. (Tabela 6).

Tabela 6: Classificação dos pacientes com risco cardiovascular para o polimorfismo C677T

	CC - Homozigoto saudável (n= 59)	CT- Heterozigoto (n= 84)	TT -Homozigoto doente (n= 0)	p-valor
Baixo risco cardiovascular (n, %)	36 (61)	50 (59,5)	0	0.627(a)
Alto Risco Cardiovascular (n, %)	23 (39)	34 (40,5)	0	
p-valor	0.627(a)			
(a)Teste do Qui-Quadrado				

8.5 Distribuição do risco cardiovascular entre os genótipos encontrados para o polimorfismo A1298C

Ao estratificar os pacientes segundo os genótipos do polimorfismo A1298C, no risco cardiovascular, observa-se a quantidade de pacientes com o genótipo heterozigoto (AC) se assemelha ao classificá-los em baixo risco cardiovascular 51,8% e alto risco cardiovascular 51,7%. O mesmo ocorre com o genótipo saudável (AA), onde a quantidade de pacientes sem risco e com risco foram semelhantes, não sendo significativas ($p=0.933$) (Tabela 7).

Tabela 7: Classificação dos pacientes com risco cardiovascular para o polimorfismo A1298C.

	AA - homozigoto saudável (n= 11)	AC- Heterozigoto (n= 60)	CC- Homozigoto doente (n= 73)	p-valor
Baixo risco cardiovascular, (n, %)	7 (8,2)	35 (40)	45 (51,8)	0.933 (a)
Alto Risco Cardiovascular, (n, %)	4 (6,7)	25 (41,7)	28 (51,7)	
p-valor	0.933 (a)			

9. Discussão

A homocisteína, associada tanto para *MASLD* quanto para DCV, vem sendo estudada nos últimos anos ^(35,39,42). Por sua parte, a hiper-homocisteinemia, associa-se a inúmeras doenças ateroscleróticas ^(6,12,41). Seus níveis elevados decorrem de fatores genéticos, como os polimorfismos C677T e A1298C no gene que codifica a enzima MTHFR ^(14,15,44). Estudos a nível mundial relatam a influência entre os polimorfismos C677T e A1298C e o RCV. Neste sentido, Li Wen-Xing *et al.* descobriram que as interações entre os polimorfismos no gene da *MTHFR*, aumentaram o risco de deficiência de folato, que por sua vez associa-se à DCV ⁽³⁴⁾. Zhang *et al.*, descobriu que o alelo T da variante C677T do gene da *MTHFR*, predispôs altos níveis de HCY e foi considerado um fator de risco para doença coronariana de início precoce ⁴³. Assim, observa-se a influência dos polimorfismos do gene que codifica a enzima MTHFR no risco cardiovascular.

Os valores hepáticos da população estudada mostraram resultados elevados de AST, GGT, ALP, bilirrubina total, bilirrubina indireta e creatinina. Estes dados foram publicados previamente no trabalho de Melina Keingeski *et al.* 2023. "PAPEL DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES EN LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD HEPÁTICA ESTEATÓTICA ASOCIADA A DISFUNCIÓN METABÓLICA (MASLD)". Tese de doutorado ⁽⁵⁰⁾. Dado o espectro da doença foi possível caracterizar os pacientes em Esteatose, esteato hepatite associada à disfunção metabólica e Cirrose. Os mesmos, de uma forma geral, apresentaram uma predominância de obesidade e níveis levemente aumentados de lipídios sanguíneos, coincidindo com o estado hepático. No presente estudo observou-se que, apesar da *MASLD* estar presente, os parâmetros bioquímicos estavam dentro da normalidade.

Analisando a nível mundial a porcentagem destes polimorfismos é variado. Isto pode observar-se em vários estudos que associam estes polimorfismos com distintas doenças. Assim, um estudo na Romênia, que avaliou 70 pacientes com histórico de Acidente Vascular Cerebral (AVC), encontrou uma frequência de 38,2% e 40,3% dos genótipos homozigotos doentes (TT e CC) para o polimorfismo C677T e A1298C, respectivamente ⁽¹⁴⁾. Em uma população chinesa hipertensa classificada entre homens e mulheres, para o polimorfismo C677T, a frequência do genótipo homozigoto doente (TT) foi de 25,5% e 24,3%, respectivamente, e na mesma população, o polimorfismo A1298C as frequências do CC foram 5,0% e 2,2% ⁽³⁸⁾. Em suma, estes estudos relacionam os alelos mutados com maior incidência de DCV. Na Turquia, Ali Saci *et. al.* avaliaram a frequência dos polimorfismos C677T e A1298C em uma população *MASH* e grupo controle. Para os genótipos homozigotos doentes (TT e CC), encontraram uma frequência de

9.6% e 10%, respectivamente, na presença de MASH. No grupo controle, as porcentagens desses genótipos foram de 7,4% e 10%, respectivamente⁽⁵¹⁾. Indicando que a presença do genótipo mutado não influenciou na manifestação da *MASLD*.

Em estudos realizados em nosso país, Perez *et. al.* avaliou na região sudeste, a frequência dos polimorfismos C677T e A1298C em 4 grupos: recém nascidos com Espinha Bífida, suas mães, crianças saudáveis e mães saudáveis. As frequências encontradas para TT do polimorfismo C677T foram de 7,4%, 6,87%, 10% e 1,59% nos respectivos grupos. Para o polimorfismo A1298C, as frequências genóticas CC foram de 6,2%, 5,34%, 5,5% e 7,2%, não havendo associações significativas entre as frequências genóticas encontradas e as mesmas não estavam em equilíbrio de Hardy⁽⁵²⁾. Por sua parte Carvalho *et al.* avaliou na região nordeste do país, 86 indivíduos divididos entre *MASLD* e controle, encontrando para C677T uma frequência genotípica de TT de 17,14% e 4,44% no grupo doente e controle, respectivamente. Para o polimorfismo A1298C não se encontraram pacientes com genótipo CC no grupo doente, mas no grupo controle a frequência foi de 4,44%, não havendo diferenças significativas em termos de genotipagem⁽⁵³⁾. O mesmo ocorreu com Brochado *et al*, que avaliou 134 pacientes *MASLD* e encontrou 25% de pacientes com genótipo CC para o polimorfismo A1298C, não sendo significativamente diferente ao comparar com o controle⁽⁴⁵⁾. Em base a isso, observa-se distintas frequências destes polimorfismos na população brasileira. Um dos motivos pode se dar pelo fato de que o Brasil é um país altamente heterogêneo composto por indígenas, Ameríndios e imigrantes da Europa, África e Ásia⁽⁵⁴⁾.

Em nosso estudo encontramos a frequência de 51,4% de pacientes com genótipo homozigoto doente (CC) para o polimorfismo A1298C, mas não houveram pacientes com o genótipo homozigoto doente para o polimorfismo C677T. Um estudo realizado no mesmo hospital do nosso estudo (Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA) avaliou a frequência destes polimorfismos em mães de crianças com Síndrome de Down (SD) e controle, e sua relação. Em comparação ao nosso estudo, encontraram que: para polimorfismo C677T o genótipo TT teve uma frequência 13,9% e 9,2%, respectivamente em cada grupo. Para A1298C as frequências do genótipo CC foram de 5,1% e 4,1%, não havendo diferenças significativas na genotipagem encontrada ⁽⁵⁵⁾. Outro estudo realizado no HCPA, avaliou a prevalência de trombofilia em amostras de sangue de doadores, encontrando uma frequência de 6% do genótipo TT para C677T e 14% para o genótipo CC do polimorfismo A1298C ⁽⁵⁶⁾. Observa-se variações das frequências entre nossos resultados e os estudos mencionados, podendo ser ocasionadas por ser populações com características distintas.

Por sua parte, as medidas padrão ouro para avaliar a presença do RCV são os indicadores de aterosclerose precoce, como a espessura médio-intimal e/ou a presença de placas na artéria carótida ^(20,33). Os índices de riscos AC e Castelli são ferramentas precisas e disponíveis para avaliar o risco cardiometabólico, havendo correlação direta entre os níveis desses índices e os riscos cardiometabólicos⁽²³⁾.

Hamguchi *et al.*, determinaram que a presença de *MASLD* pode ser um indicador robusto de RCV, assim como a SM⁽²⁴⁾. Recentemente, Tharer *et al.*, demonstraram a forte associação entre a presença de DM2 em pacientes *MASLD* e eventos cardiovasculares futuros, tais associações ocorrem de forma multifatorial, ocasionando a formação da aterosclerose, fortemente associada à SM, obesidade

e dislipidemia⁽²⁷⁾. Em nosso estudo, nós utilizamos os Índices de Castelli I e II para avaliar o RCV em pacientes com *MASLD*, e a maioria deles apresentaram índices de risco cardiovascular classificados com baixo risco. Tal resultado foi contrário ao esperado, dado o resultado genético obtido (51,7% apresentou o genótipo homozigoto doente (CC) para A1298C MTHFR). Acreditamos que a presença de baixo risco cardiovascular nos pacientes pode estar relacionado com o fato que os mesmos se encontram sob cuidado médico, o que pode chegar a influenciar no desenvolvimento do RCV. Contudo, apesar de contraditório a baixa presença de risco cardiovascular, nossos resultados encontrados estão em consonância com os achados de Sangouni AA *et al.*, que investigaram a utilização de suplementos de ômega 3 em pacientes com *MASLD* e um grupo controle, avaliando os marcadores de risco cardiovascular. Notavelmente, neste estudo, foi observado que os pacientes apresentavam baixo risco cardiovascular, com base nos valores apresentados para os Índice de Castelli I e II, tanto antes quanto após a intervenção⁽⁵⁷⁾. Semelhante a este resultado, Naseri *et al.*, observaram a presença de baixo risco cardiovascular, com base do Índice de Castelli, em sua amostra de pacientes *MASLD*⁽⁵⁷⁻⁵⁹⁾. Klisic *et al.* investigaram se os índices lipídicos e os marcadores de estresse oxidativo estavam associados à presença de *MASLD*. Ao utilizar os escores de CR-I e CRI-II, observaram que a população estudada apresentou baixo risco cardiovascular com base nesses escores. No entanto, esses escores foram capazes de prever significativamente a presença de *MASLD*⁽⁵⁸⁾.

Contudo, Kouvari M *et al*, realizaram um estudo de coorte onde observaram que uma população com *MASLD* apresentou baixos níveis de fatores de risco cardiovascular, porém a presença dos mesmos a longo prazo, afetou a saúde

cardiometabólica, recomendando-se fortemente avaliar a presença de *MASLD*, mesmo em obesos aparentemente saudáveis⁽³⁾. Demonstrando que apesar de serem considerados com baixo risco cardiovascular, a presença a longo prazo destes fatores torna-se um risco para a saúde cardiometabólica dos pacientes.

Assim, embora nossos pacientes não apresentem alto risco cardiovascular, a correlação entre *MASLD* e a SM, juntamente com sua associação com fatores de risco cardiovasculares é amplamente reconhecida na literatura^(1,60). Por isso, para melhorar a taxa de sobrevivência e a qualidade de vida dos pacientes afetados pela *MASLD*, são recomendadas diversas diretrizes que envolvem mudanças no estilo de vida e tratamentos medicamentosos⁽⁶¹⁾. Recomenda-se fortemente o manejo da dislipidemia a fim de reduzir ou manter baixo o RC em pacientes *MASLD*⁽⁶²⁾.

10. Conclusão

Em suma, conclui-se que embora os pacientes eram *MASLD* e a maioria apresentaram o genótipo heterozigoto ou homozigoto doente para o polimorfismo A1298C no gene da *MTHFR*, isto não foi refletido no resultado do fenótipo: a presença de alto risco cardiovascular. Para o polimorfismo C677T não houveram pacientes com o fenótipo doente.

Considerando a fisiopatologia da *MASLD*, investigações futuras podem explorar de forma mais aprofundada as interações genéticas e ambientais na doença, contribuindo para estratégias personalizadas para a prevenção e tratamento.

11. Considerações finais

Com base em pesquisas recentes, somos o primeiro estudo a avaliar os polimorfismos C677T e A1298C no gene da MTHFR, em pacientes com *MASLD* no Rio Grande do Sul e determinar sua relação no risco cardiovascular. Esta contribuição será importante para futuras pesquisas que avaliem a frequência dos polimorfismos em pacientes com *MASLD*.

12. Referências bibliográficas

1. New MASLD Nomenclature | AASLD [Internet]. [citado 27 de novembro de 2023]. Disponível em: <https://www.aasld.org/new-masld-nomenclature>
2. Lim GEH, Tang A, Ng CH, Chin YH, Lim WH, Tan DJH, et al. An Observational Data Meta-analysis on the Differences in Prevalence and Risk Factors Between MAFLD vs NAFLD. *Clin Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 1º de março de 2023 [citado 6 de dezembro de 2023];21(3):619-629.e7. Disponível em: [https://www.cghjournal.org/article/S1542-3565\(21\)01276-3/fulltext](https://www.cghjournal.org/article/S1542-3565(21)01276-3/fulltext)
3. Kouvari M, Chrysohoou C, Skoumas J, Pitsavos C, Panagiotakos DB, Mantzoros CS. The presence of NAFLD influences the transition of metabolically healthy to metabolically unhealthy obesity and the ten-year cardiovascular disease risk: A population-based cohort study. *Metab - Clin Exp* [Internet]. 1º de março de 2022 [citado 4 de fevereiro de 2024];128. Disponível em: [https://www.metabolismjournal.com/article/S0026-0495\(21\)00193-1/fulltext](https://www.metabolismjournal.com/article/S0026-0495(21)00193-1/fulltext)
4. Mary E. Rinella, Jeffrey V. Lazarus, Ratziu V, Francque SM, Sanyal AJ, Kanwal F, et al. A multisociety Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature. *Hepatology* [Internet]. [citado 27 de novembro de 2023];10.1097/HEP.0000000000000520. Disponível em: <https://journals.lww.com/hep/pages/articleviewer.aspx?year=9900&issue=00000&article=00488&type=Fulltext>
5. Younossi ZM, Golabi P, Paik JM, Henry A, Van Dongen C, Henry L. The global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH): a systematic review. *Hepatology* [Internet]. abril de 2023 [citado 10 de dezembro de 2023];77(4):1335. Disponível em: https://journals.lww.com/hep/fulltext/2023/04000/the_global_epidemiology_of_nonalcoholic_fatty.27.aspx
6. Amorim FG, Rezende LCD de, Coitinho LB, Freitas JV de, Scherr JA, Dettogni RS. BIOQUÍMICA CLÍNICA DA ATEROSCLEROSE PROVOCADA POR HIPERHOMOCISTEINEMIA. *Rev Eletrônica Farmácia* [Internet]. 5 de abril de 2011 [citado 27 de novembro de 2023];8(1):24–24. Disponível em: <https://revistas.ufg.br/REF/article/view/13812>
7. Morais CC de. Metabolismo da homocisteína e perfil lipídico de adolescentes com fatores de risco cardiovascular: relações com polimorfismos no gene da metilenotetra-hidrofolato redutase. 27 de março de 2015 [citado 11 de dezembro de 2023]; Disponível em: <http://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/4778>
8. Polyzos SA, Kountouras J, Patsiaoura K, Katsiki E, Zafeiriadou E, Deretzi G, et al. Serum homocysteine levels in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol* [Internet]. 1º de janeiro de 2012 [citado 26 de novembro de 2023];11(1):68–76. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1665268119314887>
9. Ceperković Z. [The role of increased levels of homocysteine in the development of cardiovascular diseases]. *Med Pregl*. 2006;59(3–4):143–7.
10. Finkelstein JD, Martin JJ. Homocysteine. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 1º de abril de 2000 [citado 26 de novembro de 2023];32(4):385–9. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357272599001387>
11. Hu Y, Liu J, Dong X, Xu Y, Leng S, Wang G. Clinical Study of Serum Homocysteine and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Euglycemic Patients. *Med Sci Monit Int Med J*

- Exp Clin Res [Internet]. 2 de novembro de 2016 [citado 11 de dezembro de 2023];22:4146–51. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5103834/>
12. Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and Atherothrombosis. *N Engl J Med* [Internet]. 9 de abril de 1998 [citado 27 de novembro de 2023];338(15):1042–50. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJM199804093381507>
 13. Kasapoglu B, Turkay C, Yalcin KS, Kosar A, Bozkurt A. MTHFR 677C/T and 1298A/C mutations and non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Med* [Internet]. junho de 2015 [citado 27 de novembro de 2023];15(3):248–51. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4953108/>
 14. Chita DS, Tudor A, Christodorescu R, Buleu FN, Sosdean R, Deme SM, et al. MTHFR Gene Polymorphisms Prevalence and Cardiovascular Risk Factors Involved in Cardioembolic Stroke Type and Severity. *Brain Sci* [Internet]. agosto de 2020 [citado 6 de fevereiro de 2024];10(8):476. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-3425/10/8/476>
 15. admin. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and MTHFR 1298A > C gene polymorphism [Internet]. *European Review*. 2014 [citado 11 de dezembro de 2023]. Disponível em: <https://www.europeanreview.org/article/6544>
 16. ResearchGate [Internet]. [citado 24 de abril de 2024]. Figure 1. The spectrum of the different stages of fatty liver disease... Disponível em: https://www.researchgate.net/figure/The-spectrum-of-the-different-stages-of-fatty-liver-disease-FLD-and-its-progression_fig1_344288710
 17. Kim H, Lee CJ, Ahn SH, Lee KS, Lee BK, Baik SJ, et al. MAFLD Predicts the Risk of Cardiovascular Disease Better than NAFLD in Asymptomatic Subjects with Health Check-Ups. *Dig Dis Sci* [Internet]. 1º de outubro de 2022 [citado 10 de dezembro de 2023];67(10):4919–28. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10620-022-07508-6>
 18. Tanaka N, Kimura T, Fujimori N, Nagaya T, Komatsu M, Tanaka E. Current status, problems, and perspectives of non-alcoholic fatty liver disease research. *World J Gastroenterol* [Internet]. 1º de janeiro de 2019 [citado 21 de novembro de 2023];25(2):163. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6337019/>
 19. Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, Ray KK, Packard CJ, Bruckert E, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J* [Internet]. 21 de agosto de 2017 [citado 21 de novembro de 2023];38(32):2459–72. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5837225/>
 20. Yavuz F, Kilic S, Kaplan M, Yıldırım A, Kucukosmanoglu M, Dogdus M. Impacto dos Índices Aterogênicos em Estenose do Enxerto de Veia Safena. *Arq Bras Cardiol* [Internet]. 28 de setembro de 2020 [citado 23 de novembro de 2023];115:538–44. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abc/a/DBbZyMFNbGmGBrG34cGFzsM/?lang=pt>
 21. Barcelos STA. Doença hepática gordurosa não-alcoólica e risco cardiovascular: efeitos da suplementação com probióticos. 2020 [citado 21 de novembro de 2023]; Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/219426>
 22. Zhou XD, Cai J, Targher G, Byrne CD, Shapiro MD, Sung KC, et al. Metabolic dysfunction-associated fatty liver disease and implications for cardiovascular risk and disease prevention. *Cardiovasc Diabetol* [Internet]. 3 de dezembro de 2022 [citado 10 de dezembro de 2023];21:270. Disponível em:

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9719631/>
23. 2013 ACC/AHA Guideline on the Assessment of Cardiovascular Risk | Circulation [Internet]. [citado 21 de novembro de 2023]. Disponível em: https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/01.cir.0000437741.48606.98?rfr_dat=cr_pub++0pubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org
 24. Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, Nagata C, Takeda J, Sarui H, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is a novel predictor of cardiovascular disease. *World J Gastroenterol WJG* [Internet]. 14 de março de 2007 [citado 21 de novembro de 2023];13(10):1579–84. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4146902/>
 25. Motamed N, Rabiee B, Poustchi H, Dehestani B, Hemasi GR, Khonsari MR, et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and 10-year risk of cardiovascular diseases. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* [Internet]. 1º de fevereiro de 2017 [citado 21 de novembro de 2023];41(1):31–8. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2210740116301048>
 26. Pisetta C, Chillè C, Pelizzari G, Pigozzi MG, Salvetti M, Paini A, et al. Evaluation of Cardiovascular Risk in Patient with Primary Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *High Blood Press Cardiovasc Prev* [Internet]. 1º de agosto de 2020 [citado 26 de novembro de 2023];27(4):321–30. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40292-020-00389-8>
 27. Targher G, Byrne CD, Lonardo A, Zoppini G, Barbui C. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident cardiovascular disease: A meta-analysis. *J Hepatol* [Internet]. 1º de setembro de 2016 [citado 11 de dezembro de 2023];65(3):589–600. Disponível em: [https://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168-8278\(16\)30199-4/fulltext](https://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168-8278(16)30199-4/fulltext)
 28. Abdelbasset WK, Tantawy SA, Kamel DM, Alqahtani BA, Elnegamy TE, Soliman GS, et al. Effects of high-intensity interval and moderate-intensity continuous aerobic exercise on diabetic obese patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 6 de março de 2020 [citado 24 de abril de 2024];99(10):e19471. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7478706/>
 29. Cai H, Qin YL, Shi ZY, Chen JH, Zeng MJ, Zhou W, et al. Effects of alternate-day fasting on body weight and dyslipidaemia in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomised controlled trial. *BMC Gastroenterol* [Internet]. 18 de dezembro de 2019 [citado 24 de abril de 2024];19(1):219. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12876-019-1132-8>
 30. Castellino G, Nikolic D, Magán-Fernández A, Malfa GA, Chianetta R, Patti AM, et al. Altlix® Supplement Containing Chlorogenic Acid and Luteolin Improved Hepatic and Cardiometabolic Parameters in Subjects with Metabolic Syndrome: A 6 Month Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Nutrients* [Internet]. 25 de outubro de 2019 [citado 24 de abril de 2024];11(11):2580. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6893885/>
 31. Draz RS, Serry ZMH, Rahmy AF, El Bardesi M saber, Taha MM. Electroacupuncture Versus Aerobic Interval Training on Liver Functions in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver. *J Altern Complement Med* [Internet]. janeiro de 2020 [citado 24 de abril de 2024];26(1):51–7. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/acm.2019.0182>
 32. Treeprasertsuk S, Leverage S, Adams LA, Lindor KD, Sauver J, Angulo P. THE FRAMINGHAM RISK SCORE AND HEART DISEASE IN NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE. *Liver Int* [Internet]. julho de 2012 [citado 11 de dezembro de 2023];32(6):945–50. Disponível em:

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3348257/>
33. Fracanzani AL, Burdick L, Raselli S, Pedotti P, Grigore L, Santorelli G, et al. Carotid Artery Intima-media Thickness in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Am J Med* [Internet]. 1º de janeiro de 2008 [citado 21 de novembro de 2023];121(1):72–8. Disponível em: [https://www.amjmed.com/article/S0002-9343\(07\)00976-X/fulltext](https://www.amjmed.com/article/S0002-9343(07)00976-X/fulltext)
 34. Ward M. Homocysteine, Folate, and Cardiovascular Disease. *Int J Vitam Nutr Res* [Internet]. maio de 2001 [citado 11 de dezembro de 2023];71(3):173–8. Disponível em: <https://econtent.hogrefe.com/doi/10.1024/0300-9831.71.3.173>
 35. Leach NV, Dronca E, Vesa SC, Sampelean DP, Craciun EC, Lupsor M, et al. Serum homocysteine levels, oxidative stress and cardiovascular risk in non-alcoholic steatohepatitis. *Eur J Intern Med* [Internet]. 1º de outubro de 2014 [citado 27 de novembro de 2023];25(8):762–7. Disponível em: [https://www.ejinme.com/article/S0953-6205\(14\)00252-0/fulltext](https://www.ejinme.com/article/S0953-6205(14)00252-0/fulltext)
 36. Li WX, Liao P, Hu CY, Cheng F, Zhang T, Sun YY, et al. Interactions of Methylene tetrahydrofolate Reductase Gene Polymorphisms, Folate, and Homocysteine on Blood Pressure in a Chinese Hypertensive Population. *Clin Lab* [Internet]. 2017 [citado 27 de novembro de 2023];63(04/2017). Disponível em: <http://www.clin-lab-publications.com/article/2437>
 37. Wang X, Zhou Y, Zhang M, Wang Y, Qin B. The methylene tetrahydrofolate reductase genotype 677CT and non-alcoholic fatty liver disease have a synergistic effect on the increasing homocysteine levels in subjects from Chongqing, China. *Genes Dis* [Internet]. 29 de julho de 2018 [citado 27 de novembro de 2023];6(1):88–95. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6411628/>
 38. Li WX, Dai SX, Zheng JJ, Liu JQ, Huang JF. Homocysteine Metabolism Gene Polymorphisms (MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G and MTRR A66G) Jointly Elevate the Risk of Folate Deficiency. *Nutrients* [Internet]. 10 de agosto de 2015 [citado 27 de novembro de 2023];7(8):6670–87. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4555142/>
 39. Xu B, Kong X, Xu R, Song Y, Liu L, Zhou Z, et al. Homocysteine and all-cause mortality in hypertensive adults without pre-existing cardiovascular conditions. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 24 de fevereiro de 2017 [citado 27 de novembro de 2023];96(8):e5862. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5569412/>
 40. Gálvez AS, Ramírez H, Placencia P, Rojas C, Urzúa X, Kalergis AM, et al. Single Nucleotide Polymorphisms in Apolipoprotein B, Apolipoprotein E, and Methylene tetrahydrofolate Reductase Are Associated With Serum Lipid Levels in Northern Chilean Subjects. A Pilot Study. *Front Genet* [Internet]. 20 de setembro de 2021 [citado 27 de novembro de 2023];12:640956. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8488364/>
 41. Sun K, Song J, Liu K, Fang K, Wang L, Wang X, et al. Associations between homocysteine metabolism related SNPs and carotid intima-media thickness: a Chinese sib pair study. *J Thromb Thrombolysis* [Internet]. 2017 [citado 27 de novembro de 2023];43(3):401–10. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5337241/>
 42. Association Between MTHFR Gene Common Variants, Serum Homocysteine, and Risk of Early-Onset Coronary Artery Disease: A Case–Control Study | *Biochemical Genetics* [Internet]. [citado 27 de novembro de 2023]. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10528-019-09937-x>

43. Predicting Hyperhomocysteinemia by Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism in Chinese Patients With Hypertension - Yu Wang, Xin Xu, Yong Huo, Dahai Liu, Yimin Cui, Zeyuan Liu, Zhigang Zhao, Xiping Xu, Lisheng Liu, Xiaoying Li, Shanqun Jiang, 2015 [Internet]. [citado 27 de novembro de 2023]. Disponível em: https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1076029613519849?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed
44. Sun MY, Zhang L, Shi SL, Lin JN. Associations between Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Polymorphisms and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Risk: A Meta-Analysis. PLoS ONE [Internet]. 29 de abril de 2016 [citado 13 de dezembro de 2023];11(4):e0154337. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4851382/>
45. Franco Brochado MJ, Domenici FA, Candolo Martinelli A de L, Zucoloto S, de Carvalho da Cunha SF, Vannucchi H. Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Polymorphism and Serum Homocysteine Levels in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Ann Nutr Metab [Internet]. 19 de setembro de 2013 [citado 27 de novembro de 2023];63(3):193–9. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000353139>
46. Orlovskiy V, Kuchma N, Murenets N, Orlovskiy A. [C677T AND A1298C ALLELE POLYMORPHISM GENE OF METHYLENETETRAHYDRAFOLATEREDUCTASE IN PATIENTS WITH NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE AND TYPE 2 DIABETES]. Georgian Med News. outubro de 2015;(247):38–43.
47. Qin X, Spence JD, Li J, Zhang Y, Li Y, Sun N, et al. Interaction of serum vitamin B12 and folate with MTHFR genotypes on risk of ischemic stroke. Neurology [Internet]. 17 de março de 2020 [citado 27 de novembro de 2023];94(11):e1126–36. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7220236/>
48. Arcanjo CL, Piccirillo LJ, Machado I do V, Andrade Jr CRM de, Clemente EL, Gomes M de B. Avaliação de dislipidemia e de índices antropométricos em pacientes com Diabetes Mellitus tipo 1. Arq Bras Endocrinol Metabol [Internet]. dezembro de 2005 [citado 28 de fevereiro de 2024];49:951–8. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abem/a/jmpNZ4Z8yKDNb8y4CCyFDGx/>
49. Ali Sangouni A, Abdollahi S, Mozaffari-Khosravi H. Effect of resveratrol supplementation on hepatic steatosis and cardiovascular indices in overweight subjects with type 2 diabetes: a double-blind, randomized controlled trial. BMC Cardiovasc Disord [Internet]. 10 de maio de 2022 [citado 28 de dezembro de 2023];22:212. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9088077/>
50. Melina, Belén Keingeski. PAPEL DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES EN LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD HEPÁTICA ESTEATÓTICA ASOCIADA A DISFUNCIÓN METABÓLICA (MASLD) [Internet]. Porto Alegre, Brasil; 2023 [citado 10 de outubro de 2023]. Disponível em: <file:///C:/Users/Anelise/OneDrive/Documentos/Tese%20Doutorado%20Melina%20Keingeski%2029.11.23.pdf>
51. Sazci A, Ergul E, Aygun C, Akpınar G, Senturk O, Hulagu S. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in patients with nonalcoholic steatohepatitis (NASH). Cell Biochem Funct [Internet]. 2008 [citado 4 de março de 2024];26(3):291–6. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cbf.1424>
52. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): incidence of mutations C677T and A1298C in Brazilian population and its correlation with plasma homocysteine levels in spina bifida - Perez - 2003 - American Journal of Medical Genetics Part A - Wiley Online

- Library [Internet]. [citado 4 de março de 2024]. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajmg.a.10059>
53. Carvalho S. Avaliação de polimorfismos no gene do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e da metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) em pacientes com carcinoma hepatocelular e infecção pelo vírus da hepatite C [Internet] [Doutorado em Ciências em Gastroenterologia]. [São Paulo]: Universidade de São Paulo; 2019 [citado 11 de dezembro de 2023]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5168/tde-17042019-092036/>
 54. Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimarães PEM, Ferreira ACS, Bandelt HJ, Pena SDJ, et al. The Ancestry of Brazilian mtDNA Lineages. *Am J Hum Genet* [Internet]. agosto de 2000 [citado 29 de fevereiro de 2024];67(2):444–61. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1287189/>
 55. Brandalize APC, Bandinelli E, dos Santos PA, Roisenberg I, Schüler-Faccini L. Evaluation of C677T and A1298C polymorphisms of the MTHFR gene as maternal risk factors for Down syndrome and congenital heart defects. *Am J Med Genet A*. outubro de 2009;149A(10):2080–7.
 56. Dick-Guareschi J, Fontana JC, Sanseverino MTV, Kubaski F, Sekine L, Mesquita NF, et al. Prevalence of thrombophilia-associated genetic risk factors in blood donors of a regional hospital in southern Brazil. *Hematol Transfus Cell Ther* [Internet]. 2022 [citado 6 de março de 2024];44(3):379–85. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9477773/>
 57. Sangouni AA, Orang Z, Mozaffari-Khosravi H. Effect of omega-3 supplementation on cardiometabolic indices in diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomized controlled trial. *BMC Nutr* [Internet]. 15 de dezembro de 2021 [citado 9 de fevereiro de 2024];7:86. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8672492/>
 58. Klisic A, Kavarić N, Ninic A, Kotur-Stevuljevic J. Oxidative stress and cardiometabolic biomarkers in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Sci Rep* [Internet]. 16 de setembro de 2021 [citado 9 de fevereiro de 2024];11:18455. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8445952/>
 59. Naseri K, Saadati S, Yari Z, Askari B, Mafi D, Hoseinian P, et al. Curcumin Offers No Additional Benefit to Lifestyle Intervention on Cardiometabolic Status in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrients* [Internet]. 6 de agosto de 2022 [citado 21 de novembro de 2023];14(15):3224. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9370510/>
 60. Gomes MB, Santos DC, Drummond K, Pinheiro A, Muniz LH, Leal F, et al. Prevalence of overweight/obesity and its relationship with metabolic syndrome and fatty liver index in adult patients with type 1 diabetes. A Brazilian multicenter study. *Diabetol Metab Syndr* [Internet]. 23 de fevereiro de 2023 [citado 10 de dezembro de 2023];15:28. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9948365/>
 61. I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. *Arq Bras Cardiol* [Internet]. abril de 2005 [citado 21 de novembro de 2023];84:3–28. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abc/a/qWzJH647dkF7H5dML8x8Nym/?lang=pt>
 62. American Association of Clinical Endocrinology Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Primary Care and Endocrinology Clinical Settings - Endocrine Practice [Internet]. [citado 9 de fevereiro de 2024]. Disponível em: [https://www.endocrinepractice.org/article/S1530-891X\(22\)00090-8/fulltext](https://www.endocrinepractice.org/article/S1530-891X(22)00090-8/fulltext)

13. Dados suplementares

Resultados

Tabela suplementar 1: Classificação do risco cardiovascular da população estudada com base nos critérios pré-estabelecidos.

Variável	Baixo Risco Cardiovascular n (%)	Alto Risco Cardiovascular) n (%)	p-valor
Índice de Castelli I (n=142)	116 (81,7)	26 (18,3)	<0.001(a)*
Índice de Castelli II (n = 140)	115 (82,1)	25 (17,9)	<0.001(a)*
Coeficiente Aterosclerótico (n = 137)	83 (56,5)	36,7 (60,6)	0.027(a)*
(a) Teste do Qui-Quadrado			

Para o Índice de Castelli I, foram avaliados 142 pacientes, destes, apenas 18,3% apresentaram alto risco cardiovascular. Dados do Índice de Castelli II foram avaliados de 140 pacientes, destes, somente 17,9% apresentaram alto risco cardiovascular. O coeficiente aterosclerótico foi analisado, revelando que dos 137 pacientes avaliados 60% apresentou um elevado risco cardiovascular, enquanto 56% demonstrou um baixo risco em relação a esse escore. Esses resultados foram considerados estatisticamente significativos.

Tabela suplementar 2: Distribuição do risco cardiovascular entre os grupos estudados. Dados expressos em n absoluto e porcentagem.

	Esteatose, n (%)	MASH, n (%)	Cirrose, n (%)	p-valor
Baixo risco cardiovascular	29 (32,6)	24 (28,1)	33 (39,3)	0.601(a)
Alto risco cardiovascular,	19 (32,8)	20 (34,4)	18 (32,8)	
p-valor	0.597(b)			
a. Teste do Qui-quadrado; b. Monte Carlo				

Ao categorizar o risco cardiovascular nos distintos estágios da doença, observa-se proporções semelhantes, havendo uma prevalência de pacientes com baixo risco cardiovascular. Estas distribuições não foram consideradas significativas.

14. Anexo I: TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nº do CAAE: 69919923500005327

Título do projeto: A frequência do polimorfismo A1298C e C677T no risco cardiovascular de pacientes com *MASLD*.

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa aninhada à pesquisa “Avaliação da Expressão de miR-34a em Pacientes com Diagnóstico de Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica em Diferentes Estádios Evolutivos da Doença e Caracterização desta População”, da qual você já participa. As duas pesquisas são do mesmo grupo de pesquisa, e nós gostaríamos de utilizar as amostras da pesquisa da qual você já faz parte, também neste estudo. Ressaltamos que você não é obrigado a participar do atual projeto mesmo tendo participado do primeiro, sem prejuízo à participação do projeto já aceito.

A *MASLD* é uma doença que apresenta vários estádios que poderiam ser identificados precocemente. A doença começa (primeiro estágio) quando a gordura se acumula no fígado. O sistema imune do corpo responde à gordura atacando as células do fígado e gerando inflamação (segundo estágio). Com o tempo, as células do fígado ficam danificadas formando tecido de cicatrização (fibrose) dentro do fígado, onde antes estavam as células saudáveis. Quando possui bastante cicatriz, o fígado é chamado de cirrótico (terceiro estágio). Um fígado cirrótico sofre o risco de falhar (estádio final). Portanto, identificar esses estádios da doença é de grande utilidade para evitar a progressão dela e melhorar a qualidade da saúde dos pacientes.

A sua amostra de sangue que foi previamente coletada durante a sua participação no estudo intitulado “Título do projeto: Avaliação da Expressão de miR-34a em Pacientes com Diagnóstico de Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica em Diferentes Estádios Evolutivos da Doença e Caracterização desta População” (Nº do CAAE: 38556920.2.0000.5327), está devidamente armazenada. Se você estiver de acordo, iremos utilizar esta amostra já

armazenada para a avaliar a frequência dos polimorfismos A1298C e C677T com o objetivo de avaliar novos marcadores de detecção precoce do RC associado à *MASLD*. Também utilizaremos outros resultados avaliados na pesquisa anterior, como a caracterização dos participantes com diagnóstico de doença hepática gordurosa não- Alcoólica. Ainda, exames de interesse desta pesquisa já realizados assistencialmente, como AST, ALT, caso você autorize, serão consultados diretamente do seu prontuário.

Para evitar riscos de vazamento de dados, todos os pesquisadores estão cientes de suas responsabilidades e reafirmam o compromisso ético e moral assim como respeito à sua dignidade. Os possíveis benefícios da participação na pesquisa não trarão benefícios diretos aos participantes; porém, poderá contribuir para o aumento do conhecimento sobre o assunto estudado, e, se aplicável, poderá beneficiar futuros pacientes. Você terá a oportunidade de esclarecer dúvidas relacionadas à sua doença hepática.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você receberá ou poderá vir a receber na instituição. Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos. Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, pode entrar em contato com o pesquisador responsável Dr. Mario Reis, ou com a pesquisadora Anelise da Silva Pinto ou Melina Belén Keingeski, ou ainda, pessoalmente na zona 15 do HCPA a partir das 12 horas ou no Serviço de Gastroenterologia, segundo andar (51- 3359-8307) ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Av. Protásio Alves, 211 - Portão 4 - 5º andar do Bloco C - Rio Branco - Porto Alegre/RS, de segunda à sexta, das 8h às 17h, pelo telefone (51) 33596246, e-mail cep@hcpa.edu.br .

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____

Rubrica do participante _____

Rubrica do pesquisador