

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM HEPATOLOGIA**

Carolina Rigatti Hartmann

**O SIGNIFICADO DA EXPRESSÃO DO CD36 NA DOENÇA
HEPÁTICA ESTEATÓTICA ASSOCIADA A DISFUNÇÃO
METABÓLICA EM PACIENTES SUBMETIDOS À
POLISSONOGRRAFIA**

UFCSPA

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

Porto Alegre, 2024.

Carolina Rigatti Hartmann

**O significado da expressão do CD36 na
doença hepática esteatótica associada
a disfunção metabólica em pacientes
submetidos à polissonografia**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Hepatologia da
Fundação Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre
como requisito para a obtenção do grau
de Mestre

Orientadora: Profa. Dra. Gabriela
Perdomo Coral
Coorientador: Eduardo Garcia

Porto Alegre, 202

FICHA CATALOGRÁFICA

Catálogo na Publicação

Hartmann, Carolina Rigatti

O significado da associação do CD36 na doença hepática esteatótica associada a disfunção metabólica em pacientes submetidos a polissonografia / Carolina Rigatti Hartmann. -- 2024.

59 f. : il., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Hepatologia, 2024.

Orientador(a): Profa. Dra. Gabriela Perdomo Coral ;
coorientador(a): Prof. Dr. Eduardo Garcia.

1. Antígeno CD36. 2. Doença hepática gordurosa associada ao metabolismo. 3. Apneia Obstrutiva do Sono .
4. Estresse Oxidativo. I. Título.

AGRADECIMENTOS

A minha filha Laura, por ter me escolhido e ensinado o verdadeiro significado do mais puro e eterno amor. Por me fazer entender sobre força, nas mais profundas formas.

Ao meu esposo Rodrigo, por ser o melhor companheiro de tantas duras e pesadas batalhas, mas também de outros tantos momentos memoráveis. Pela compreensão, ajuda e parceria diária e incansável. Por sempre tornar mais leve e divertida a caminhada.

Aos meus pais Antonio e Rosaura – exemplos vivos de resiliência, persistência e afeto – pelo apoio incondicional, pelo exemplo de profissionalismo, vivacidade e retidão.

A minha orientadora Gabriela, por ser essa mulher, médica, escritora e professora, que inspira, com quem eu tenho o privilégio de conviver e aprender tanto. Por permitir tanta troca, com respeito e muito empenho.

Ao meu coorientador Eduardo, que desde os tempos de faculdade, é exemplo de médico e professor para mim, com sua incomparáveis cordialidade e atenção a cada uma dedicada.

Ao Luis Fernando, coautor do artigo, pela fundamental retaguarda nesse projeto, com disponibilidade e leveza.

A Graciela, por compartilhar comigo toda a riqueza de dados coletados.

A UFCSPA pela oportunidade de, novamente, me permitir aprender tanto, sob os mais diversos aspectos, durante esse processo, bem como proporcionar reencontros memoráveis com muitos dos meus mais inspiradores mestres.

RESUMO

Contexto

A doença hepática esteatótica associada ao metabolismo (MASLD) [anteriormente referida como Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (NAFLD)] é um problema de saúde global. A avaliação da esteatose e da esteato-hepatite associada à disfunção metabólica (MASH) [anteriormente conhecida como esteato-hepatite não alcoólica (NASH)] é rotina para patologistas hepáticos. MASH e fibrose são fatores prognósticos para o desenvolvimento de cirrose hepática e mortalidade relacionada à doença. A proteína translocase de ácidos graxos CD36 regula a entrada de ácidos graxos livres nos hepatócitos e está implicada na inflamação e na apoptose. Além disso, pode estar associada à apneia, um fator prognóstico para MASH avançada.

Objetivo

Este estudo visa a analisar a superexpressão de CD36 na MASH e sua relação com condições clínicas e achados histológicos associados ao MASLD, incluindo apneia obstrutiva do sono (AOS).

Método

Trata-se de um estudo transversal. Dados clínicos, antropométricos e séricos foram coletados. Os pacientes também foram submetidos à polissonografia. A imunomarcagem com anticorpo anti-CD36 foi realizada em biópsias de fígado fixadas em formalina e incluídas em parafina. As lâminas coradas pelos métodos de hematoxilina e eosina, tricrômio de Masson e Perls foram avaliadas. A expressão de CD36 na membrana plasmática e no citoplasma dos hepatócitos foi acessada, assim como na membrana plasmática do ducto biliar. O escore NAS foi aplicado, com avaliação complementar, incluindo fibrose e reação ductular.

Resultados

A imunorreatividade de CD36 foi observada em 65,63% dos pacientes. O grau mais avançado de atividade da MASH foi perfeitamente correlacionado com a positividade para CD36 ($p=0,000$), e houve uma correlação moderada entre a atividade da MASH e a positividade para CD36 ($R\ 0,418$; $p=0,017$). A presença de hepatite de interface foi mais frequente em pacientes positivos para CD36 ($p=0,001$), e a inflamação lobular demonstrou uma correlação moderada com o padrão de expressão citoplasmática hepatocitária ($p=0,022$). O nível de ALT foi correlacionado com a positividade para CD36 no citoplasma do hepatócito e no epitélio do ducto biliar ($p=0,002$ e $p=0,005$, respectivamente). Da mesma forma, a AST foi correlacionada com a positividade citoplasmática hepatocitária de CD36 ($p=0,007$). Houve uma maior chance de dislipidemia em pacientes negativos para CD36, corroborada pela correlação negativa com a expressão positiva para CD36 no epitélio do ducto biliar ($p=0,045$). Em relação

ao colesterol total, houve uma correlação inversa com a positividade para CD36 na expressão citoplasmática hepatocitária ($p=0,026$).

O IMC foi maior em pacientes positivos para CD36 ($p=0,004$). O HDL estava mais baixo em pacientes positivos para CD36 ($p=0,032$) e os níveis médios de glicose, embora elevados em ambos os grupos, eram mais baixos em pacientes positivos para CD36 ($p=0,03$). Em relação às plaquetas, embora estivessem em níveis normais em ambos os grupos, eram mais baixas (em média) em pacientes positivos para CD36 ($p=0,031$). Um escore NAS mais alto correlacionou-se moderadamente com a positividade para CD36 no citoplasma ($p=0,028$).

Em relação aos dados da polissonografia e à AOS, os grupos foram semelhantes nos níveis de saturação de oxigênio, índice de dessaturação de oxigênio, índice de apneia-hipopneia, apneia-hipopneia na posição supina e na porcentagem de saturação inferior a 90% em minutos.

Conclusões

O CD36 foi expresso em pacientes com maior índice de IMC, reforçando a relação entre a obesidade na composição do tecido adiposo e o aumento dos ácidos graxos com a superexpressão de CD36. Também houve uma correlação entre a positividade de CD36 com AST, ALT, escore NAS e intensidade da inflamação. Os achados referentes a AOS não foram estatisticamente significativos. Assim, este estudo sugere que o CD36 pode ser um biomarcador da atividade inflamatória e do prognóstico da MASLD.

Palavras-chave

Antígeno CD36, Apneia Obstrutiva do Sono, Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica, Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

Background

Metabolic-associated steatotic liver disease (MASLD) [previously referred to as Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)] is a worldwide health problem. Evaluation of steatosis and metabolic dysfunction associated steatohepatitis (MASH) [previously known as nonalcoholic steatohepatitis (NASH)] is current for liver pathologists. MASH and fibrosis are prognostic factors for the development of cirrhosis and mortality. Fatty acid translocase CD36 protein regulates the free fatty acid entrance in hepatocytes and is implicated in inflammation and apoptosis. Moreover, it can be associated with apnea, a prognostic factor for advanced MASH.

Goal

This study aims to analyze CD36 overexpression in MASH and its relationship with clinical conditions and histological findings associated with MASLD, including obstructive sleep apnea (OSA).

Method

This was a transversal study. Clinical, anthropometrical, and serum data were collected. Patients were also submitted to polysomnography. Anti-CD36 antibody immunostaining was performed on formalin-fixed paraffin-embedded liver biopsy. The hematoxylin-eosin, Masson's Trichrome, and Perl's slides were evaluated. The CD36 expression on hepatocyte plasmatic membrane and cytoplasm was accessed, as well as the plasmatic membrane of the biliary duct. NAS score was applied, with complementary evaluation, including fibrosis and ductular reaction.

Results

The CD36 immunoreactivity was observed in 65.63% of patients. The more advanced degree of MASH activity was perfectly correlated with CD36 positivity ($p=0.000$), and there was a moderate correlation between MASH activity and CD36 positivity $R\ 0.418$ ($p=0.017$). The presence of interface hepatitis was more frequent in CD36-positive patients ($p=0.001$), and lobular inflammation demonstrated a moderate correlation with the cytoplasmatic expression pattern ($p=0.022$). ALT level was correlated with CD36 positivity in the cytoplasm and the bile duct epithelium ($p=0.002$ and $p=0.005$,

respectively). Similarly, AST was correlated with CD36 cytoplasmatic positivity ($p=0.007$).

There was a greater chance of dyslipidemia in CD36-negative patients, corroborated by the negative correlation with CD36-positive expression in the bile duct epithelium ($p=0.045$). Regarding total cholesterol, there was an inverse correlation with CD36 positivity in the cytoplasmatic expression ($p=0.026$).

BMI was higher in CD36-positive patients ($p=0.004$). HDL was lower in CD36-positive patients ($p=0.032$) and average glucose levels, although elevated in both groups, were lower in CD36-positive patients ($p=0.03$). Concerning platelets, although at normal levels in both groups, they were lower (on average) in CD36-positive patients ($p=0.031$). A higher NAS score moderately correlated with CD36 positivity in the cytoplasm ($p=0.028$).

Concerning polysomnography data and OSA, groups were similar in oxygen saturation level, oxygen desaturation index, apnea-hypopnea index, apnea-hypopnea in the supine position, and saturation percentage less than 90% in minutes.

Conclusions

CD36 was expressed in patients with a higher BMI index, reinforcing the relationship between obesity on adipose tissue composition and increased fatty acids with CD36 overexpression. The findings related to OSA were not statistically significant. There was a correlation between CD36-positivity with AST, ALT, NAS score, and inflammation intensity. Thus, this study suggests CD36 can be a biomarker of inflammatory activity and prognosis of MASLD.

Keywords

CD36 Antigens, Obstructive Sleep Apnea, Non-alcoholic Fatty Liver Disease, Oxidative Stress.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS	11
1.0 REFERENCIAL TEÓRICO	13
1.1 Doença hepática esteatótica associada à disfunção metabólica (MASLD)	13
1.1.1 Conceitos gerais e definições	13
1.1.2 Epidemiologia	15
1.1.3 Fatores de risco	16
1.1.4 Fisiopatologia	16
1.1.5 O papel do CD36	19
1.1.6 Apresentação clínica e diagnóstico	20
1.1.7 Classificação histológica	22
1.1.8 Prognóstico	23
1.1.9 Tratamento	24
1.2 Apneia obstrutiva do sono (AOS)	24
1.2.1 Conceitos gerais epidemiologia e apresentação clínica	24
1.2.2 Diagnóstico e tratamento	25
1.2.3 Associação da apneia obstrutiva do sono e a doença hepática esteatótica não alcoólica	26
1.2.4 Interface do CD36 com a apneia obstrutiva do sono e a doença hepática esteatótica não alcoólica	27
2.0 JUSTIFICATIVA	28
3.0 OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo Geral	28
3.2 Objetivos Específicos	28
4.0 REFERÊNCIAS	29
5.0 ARTIGO CIENTÍFICO	38
6.0 CONCLUSÃO	58

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Fluxograma de critérios diagnósticos para MAFLD.....	14
Figura 2 Conceitos atuais nas vias de esteatose e de esteato-hepatite.....	18
Figura 3 O mecanismo de ação do CD36 nos hepatócitos.....	20
Figura 4 Gatilhos e resolução do MASH.....	23

ARTIGO

LISTA DE TABELAS

Table 1.1. Sample characterization data: continuous data.....	53
Table 1.2. Sample characterization data: categoric data	55
Table 2 Correlations of the location of CD36 expressions with other variables using Spearman's Correlation Coefficient	56

LISTA DE FIGURAS

Figure1. Histological and immunohistochemical findings	57
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AOS - apneia obstrutiva do sono
ALT - alanino aminotransferase
APRI - índice da relação aspartato aminotransferase sobre plaquetas
ATP III - Adult Treatment Panel III
AST – aspartate aminotransferase
CK 18 – citoqueratina 18
CPAP - Continuous Positive Airway Pressure
DHGNA - doença hepática gordurosa não alcoólica
DP - desvio padrão
EHNA - esteatohepatite não alcoólica
FA - fosfatase alcalina
GGT - gamaglutamiltransferase
HAS - hipertensão arterial sistêmica
HCI - hipóxia crônica intermitente
HIF 2 a - fator indutor de hipoxia 2 Alpha
HD - lipoproteína de alta densidade
HOMA-IR - homeostasis model assessment
IAH - índice apneia/hipopneia
IL6 – interleucina 6
IMC - índice de massa corpórea
LDL - lipoproteína de baixa densidade
MASLD – doença hepática esteatótica associada a disfunção metabólica
MASH – esteato-hepatite associada a disfunção metabólica
miRNA – micro ácidos ribonucleicos
NF- κ B - fator nuclear kappa beta
NAS – escore de atividade de NAFLD
PCR - proteína C reativa
PSQI - Pittsburgh Sleep Quality Index
ROS – espécies reativas de oxigênio
SM - síndrome metabólica
TNF α - fator de necrose tumoral alfa
TP - tempo de protrombina

T2DM - diabetes mellito

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 DOENÇA HEPÁTICA ESTEATÓTICA METABÓLICA (MASLD)

1.1.1 DEFINIÇÕES

Os primeiros relatos de acúmulo de gordura no fígado remontam ao século 19 (1). Mais tarde, já no século 20, modelos experimentais já descreviam, na década de 1950, os achados histológicos evidenciados nos sujeitos com esteatose hepática, incluindo balonização e alterações de contorno dos componentes celulares (2). Leevy (3) define o fígado gorduroso como a presença de gordura em espécimes de biópsia hepática na ausência de outras alterações histológicas primárias. Foi também proposta a graduação da esteatose hepática em níveis (leve, moderada e acentuada), com os pontos de corte de 10%, 30% e 70%, semelhante à usada hoje.

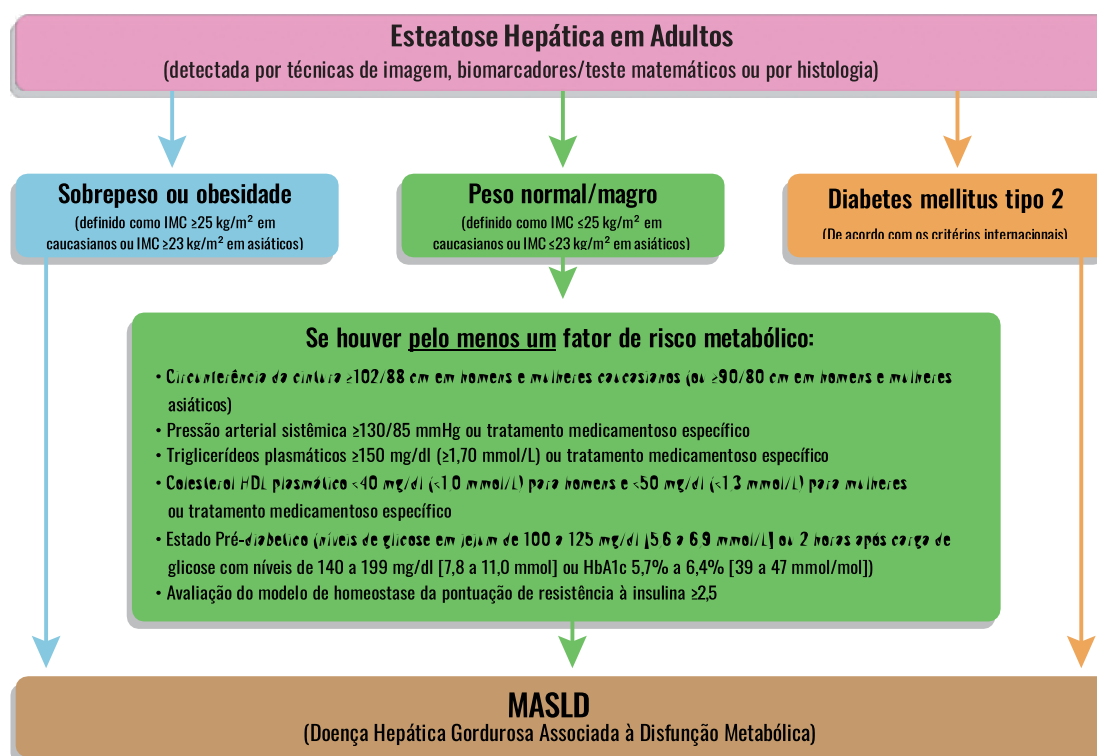
O conceito de doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) surgiu em 1980, com base em achados histológicos (4). O excesso de acúmulo de gordura (sob a forma de triglicerídeos), quando presente em mais de 5% dos hepatócitos, na ausência de correlação com o consumo de álcool, foi definida como esteatose hepática não alcoólica (5). Quando havia um componente de inflamação e balonização hepatocitária, juntamente com a esteatose, essa doença foi, na época, denominada esteato-hepatite não alcoólica (EHNA).

A DHGNA compreende um espectro de anormalidades histológicas no fígado, abrangendo desde a esteatose isolada, com nenhuma ou mínima atividade inflamatória, sem evidência de dano celular até quadros de EHNA e de fibrose, culminando em cirrose (6)(7), na exclusão de outras etiologias (8). Além disso, para o diagnóstico, deve ser excluído um consumo de álcool de 21 doses em média por semana para homens e mais de 14 doses em média para mulheres (9).

Recentemente, a DHGNA foi renomeada para doença hepática gordurosa associada à disfunção metabólica (MAFLD do inglês) (10). Esta é uma revisão do termo DHGNA, o qual vinha sendo questionado por não refletir claramente a etiologia da doença em questão (11). Os critérios propostos para o diagnóstico de MAFLD, sumarizados na figura 1, foram baseados em evidências de esteatose (detectada por exames de imagem ou por amostragem histológica de biópsia hepática), além de obesidade ou sobrepeso (IMC maior ou igual a 25kg/m²), diabetes tipo 2 (do inglês

T2DM), ou, ainda, em pacientes com peso normal na presença de pelo menos dois fatores de risco metabólicos (circunferência abdominal aumentada - maior ou igual a 102/88 cm em homens e mulheres caucasianos e maior ou igual a 90/80 cm em homens e mulheres asiáticos, hipertensão arterial sistêmica - maior ou igual a 130/85 mmHg ou tratamento medicamentoso para hipertensão arterial, triglicerídeos séricos elevados - maiores ou iguais a 150 mg/dL para homens e menor que 50mg/dL para mulheres ou tratamento medicamentoso específico, colesterol HDL baixo, estado de pré-DM2, resistência insulínica elevada - escore de resistência a insulina maior ou igual a 2.5 ou ainda proteína C reativa elevada - maior ou igual a 2 mg/L) (12).

Figura 1. Fluxograma de critérios diagnósticos para MAFLD



Adaptado do artigo A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement, Mohammed Eslam, Philip N. Newsome², Shiv K. Sarin, Quentin M. Anstee, Giovanni Targher, Manuel Romero-Gomez, Shira Zelber-Sagi, Vincent Wai-Sun Wong, Jean-François Dufour, Jörn M. Schattenberg, Takumi Kawaguchi, Marco Arrese, Luca Valenti, Gamal Shiha, Claudio Tiribelli, Hannele Yki-Järvinen, Jian-Gao Fan, Henning Grønbaek, Yusuf Yilmaz, Helena Cortez-Pinto, Claudia P. Oliveira, Pierre Bedossa, Leon A. Adams, Ming-Hua Zheng, Yasser Fouad, Wah-Kheong Chan, Nahum Mendez-Sanchez, Sang Hoon Ahn, Laurent Castera, Elisabetta Bugianesi, Vlad Ratzu, Jacob George, 2020.

Pouco tempo após a proposta de alteração de nomenclatura, e como muitos pacientes advogaram se sentir estigmatizados pelas palavras “gordurosa” e “não alcoólica”, um consenso renomeou MAFLD como doença hepática esteatótica associada à disfunção metabólica (MASLD do inglês) (13). Essa mudança reflete

melhor a fisiopatologia e as alterações cardiometabólicas dessa doença comum (14).

1.1.2 – EPIDEMIOLOGIA

A MASLD é, mais recentemente, a causa mais comum de alteração de enzimas hepáticas nos países ocidentais (5). Desde o ano 2000, a MASLD se tornou a doença hepática crônica mais comum nos Estados Unidos (5). A prevalência global é estimada em 25,24% (8). A prevalência reportada de MASLD varia amplamente a depender da população estudada e da definição utilizada (9). Nos países africanos e asiáticos, a epidemiologia da MASLD é moldada pela grande variedade de estilo de vida e crescimento econômico, bem como da variação entre comunidades rurais e urbanas, dentro de um mesmo país. Como exemplo, a prevalência gira em torno de 30% nas áreas urbanas e costeiras da China e se reduz a cerca de 1% nas áreas rurais (5). Dados europeus estimam, igualmente, que essa doença ocorra em um quarto da população atingida (15). Em 2016, a população mundial estimada com MASLD era de 25% e 31% na América do Sul (16). A prevalência global de MASLD atingiu 38% em 2016 (17).

Em estudo multicêntrico nacional, MASLD foi evidenciada mais frequentemente em assintomáticos (18). No sul do Brasil, em pacientes submetidas (população feminina neste estudo) a cirurgia bariátrica, a prevalência chega a 84% (19). Em um estudo do nosso meio com pacientes obesos mórbidos submetidos a cirurgia bariátrica, a esteatose foi diagnosticada em cerca de 90% dos pacientes, MASH em 70% e cirrose em cerca de 1% (20).

Uma pequena proporção de pessoas com MASLD desenvolve MASH com consequente maior risco de complicações como fibrose hepática, cirrose e carcinoma hepatocelular. Uma recente revisão sistemática sugere uma prevalência global de MASH de 5,27% (17).

A fibrose hepática, que aumenta o risco de descompensação hepática e morte (21), foi detectada em até 48% dos pacientes com obesidade mórbida submetidos à cirurgia bariátrica em nosso país. Os pacientes portadores de MASH tem sobrevida menor do que a população geral devida tanto a causas cardiovasculares quanto à progressão do dano hepático (22).

A epidemia mundial de TDM2 e de obesidade, bem como a nova definição MASLD pode aumentar a prevalência da doença no futuro (23). Em pacientes com TDM2 há

risco aumentado tanto para esteatose severa quanto para fibrose severa (24). Além disso, a MASLD está se tornando a causa mais comum de carcinoma hepatocelular em países desenvolvidos (25).

1.1.3 - FATORES DE RISCO

Estudos dos anos 90 descreviam os pacientes como mulheres de meia-idade, tipicamente obesas com hepatomegalia assintomática, portadoras de T2DM ou hiperlipidemia, sem outras doenças relacionadas (26). Pacientes portadores de obesidade mórbida, além do risco de MASLD, apresentam esteato-hepatite associada ao metabolismo (MASH) com frequência (20). Portanto, os fatores de risco estabelecidos para MASLD incluem obesidade e diabetes tipo 2 (T2DM) (27), além da idade avançada, sedentarismo, tipo de dieta, estilo de vida e tabagismo (22).

Pacientes portadores da mutação do gene PNPLA3 (“Patatin-like Phospholipase Domain-Containing Protein 3”), o qual tem papel importante no acúmulo hepático de triglicerídeos, tem tendência a desenvolver MASLD (22). Essa hiperexpressão genética é associada a padrões histológicos mais agressivos (28), bem como a graus mais avançados de fibrose (29).

1.1.4 - FISIOPATOLOGIA

Em 1998, surgiu a hipótese de dois eventos exitosos (“hits”) para a evolução da esteatose para a MASH. O primeiro evento seria a resistência insulínica, secundária à obesidade e o segundo inclui estresse oxidativo, citocinas inflamatórias e endotoxinas bacterianas. Infere-se que tal complexidade é fator relevante para a dificuldade em desenvolver modelos animais de pesquisa (30).

A fisiopatologia da MASLD, demonstrada na figura 2, é complexa e multifatorial (31). Nos pacientes obesos, muitos fatores contribuem para o acúmulo de lipídeos no fígado. O ganho de peso, inicialmente, é associado a marcada expansão do tecido adiposo, levando à disfunção dos adipócitos e eventual morte celular. Essa disfunção ativa a resposta inflamatória (32). A obesidade também resulta em ativação de rotas pró-inflamatórias de serinas quinases, as quais geram resistência insulínica. Este processo de ativação tem importante papel nas vias inflamatórias e citotóxicas na MASLD relacionada à obesidade (33).

Como consequência da disfunção do tecido adiposo e da resistência insulínica sistêmica relacionados à obesidade, o fígado fica exposto aos altos níveis de ácidos graxos e insulina circulantes (32). A absorção hepática de ácidos graxos pode ser facilitada pela translocase de ácidos graxos (sigla em inglês FAT), também conhecida como CD36, pela proteína ácido graxo ligante hepática (sigla em inglês L-FABP) e pelas proteínas de transporte de ácidos graxos (sigla em inglês FATPs). Todas essas proteínas são reguladas pela expressão gênica correspondente (34). O acúmulo dos ácidos graxos nos hepatócitos induz a síntese de triglicerídeos (32).

Seriam considerados fatores intra-hepáticos da MASH o estresse oxidativo, o estresse retículo endoplasmático, a lipotoxicidade e a disfunção mitocondrial (6). A ativação dessas rotas e a regulação positiva do CD36 pelo estresse oxidativo pode ser um importante mecanismo no desenvolvimento da fibrose hepática (35). A inflamação crônica leva à fibrose hepática ativando o sistema imunológico e uma miríade de eventos relacionados, incluindo ativações e inibições gênicas, com consequências nas respectivas expressões proteicas, bem como as interações entre macrófagos, neutrófilos e linfócitos (36) (37).

Estudos recentes demonstraram que a microbiota intestinal afeta o metabolismo hepático e também influencia no balanço entre efetores pró e anti-inflamatórios hepáticos, os quais afetam diretamente na MASLD e sua progressão para MASH (5) (10) (22). Alguns estudos mostram que espécies de bactérias se associam a fibrose hepática, bem como outras, quando presentes parecem ser menos associadas à MASLD (38).

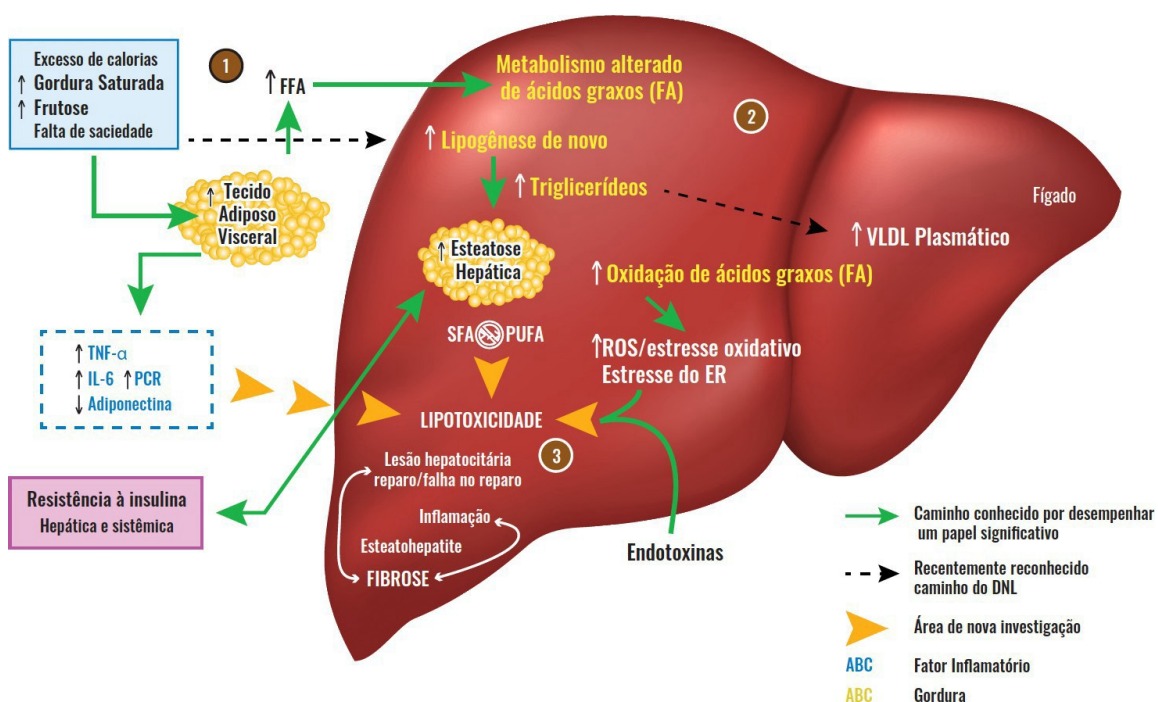
Outros mecanismos envolvidos nesse processo de progressão para esteato-hepatite incluem: inflamação, através de citocinas como a interleucina 6 (IL-6), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e a interleucina 1 beta (IL-1 β); resistência à insulina, através da fosforilação aberrante dos substratos receptores de insulina 1 e 2 (do inglês IRS-1 e IRS-2); metabolismo tóxico de ácidos graxos, com alteração da expressão da proteína transportadora de ácidos graxos 2 (do inglês, FATP2), disfunção mitocondrial, com a formação de ROS; ativação macrofágica no tecido adiposo periférico, determinando diminuição da adesão de monócitos; expressão gênica alterada, como a hiperexpressão gênica de CD36, a do receptor ativador-proliferativo do peroxissomo gama (PPAR- γ), além dos pleomorfismos genéticos do PNPLA 3; modificações epigenéticas, como metilação do DNA, acetilação proteica (não somente

das histonas), silenciamento gênico e micro-RNAs, entre outros (37–44).

Uma linha teórica recente vem encontrando resultados relacionados a alterações pró-inflamatórias das plaquetas circulantes e ao acúmulo de plaquetas no parênquima hepático, ambos os mecanismos associados à gravidade da MASLD (45). Está cada vez mais claro que, além de seu papel central na hemostasia e na reparação de lesões vasculares, as plaquetas são protagonistas em múltiplas condições fisiopatológicas, incluindo as que envolvem o metabolismo hepático, bem como os processos inflamatórios mediados por linfócitos T e as doenças associadas a essa via imune. Já está documentado o protagonismo das células de Kupffer no recrutamento de plaquetas intra-hepáticas nos estágios iniciais e avançados da MASLD e da MASH (46).

A interação entre status genético e fatores ambientais pode explicar parte da variabilidade de manifestações do fenótipo e da severidade da MASLD entre indivíduos (22). O papel de fatores epigenéticos começa a emergir, explicitando a integração de informações de expressão gênica com informações relacionadas ao metabolismo celular (32).

Figura 2. Conceitos atuais nas vias de esteatose e de esteato-hepatite



Muitos dos conceitos atuais de DHGNA são destacados. Existem três componentes principais que se cruzam: (1) aumento do tecido adiposo visceral (do inglês, VAT) e alteração sistêmica e resposta hepática ao aumento da insulina (resistência à insulina); (2) exportação, oxidação e dessaturação alteradas de ácidos graxos hepáticos (do inglês, FA) intra hepatocitária; e (3) o início e os efeitos subsequentes da lipotoxicidade. As setas verdes destacam os caminhos que são conhecidos por desempenharem um papel significativo. As setas amarelas indicam áreas de investigação mais recente e destacam trabalhos em desenvolvimento que mostram que a esteatose e a esteato-hepatite são não necessariamente processos interdependentes. Aumento da ingestão calórica, em combinação com aumento de gordura saturada e consumo de frutose, levam ao aumento do VAT; o consumo de frutose também estimula a lipogênese de novo (do inglês, DNL) e não causa a sinalização da saciedade como ocorre com a glicose. O VAT é um tecido metabolicamente ativo que produz numerosas citocinas pró-inflamatórias [fator de necrose tumoral alfa (do inglês, TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e proteína C reativa (PCR)] e está associado à diminuição da adiponectina, uma adipocina que é anti-inflamatória. Tanto o VAT quanto a esteatose hepática causam e são causados por hiperinsulinemia e resistência à insulina em uma relação de retroalimentação. O VAT também aumenta a entrega de ácidos graxos livres (do inglês, FFA) ao fígado através da circulação portal, resultando em aumento da carga do metabolismo dos FAs no fígado. DNL, aumento da reesterificação de triglicerídeos e aumento da oxidação são todos afetados. Em alguns pacientes, os mecanismos compensatórios para prevenir a lipotoxicidade do metabolismo alterado dos FAs falham, e os resultados são a esteato-hepatite e a fibrose. As citocinas pró-inflamatórias circulantes do VAT, a falta de dessaturação adequada de ácidos graxos saturados (do inglês, SFA) aos ácidos graxos poliinsaturados (do inglês, PUFA), o aumento de espécies reativas de oxigênio (do inglês, ROS) do estresse oxidativo e do retículo endoplasmático (do inglês, ER). Especula-se que o estresse e o aumento da endotoxina portal desempenham um papel na lipotoxicidade. Falha no reparo e inflamação dos hepatócitos perpetuam o(s) processo(s) que iniciam e promovem a fibrose. Abreviatura: VLDL, lipoproteína de densidade muito baixa.

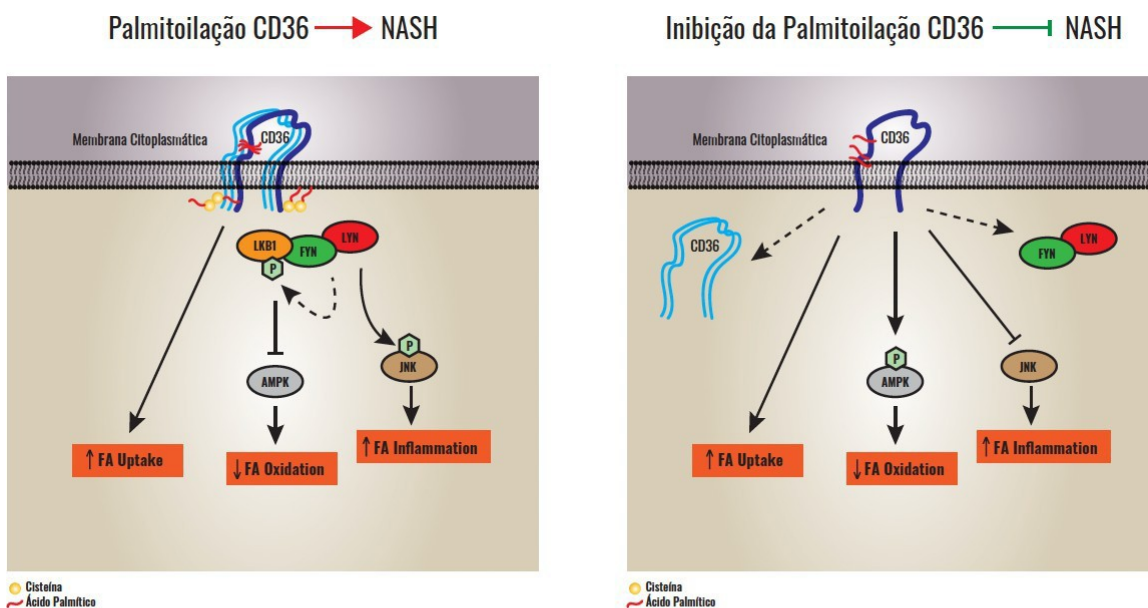
Fonte: Adaptado do artigo Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathology and Pathogenesis, Dina G. Tiniakos, Miriam B. Vos, and Elizabeth M. Brunt, 2010.

1.1.5 O PAPEL DO CD36

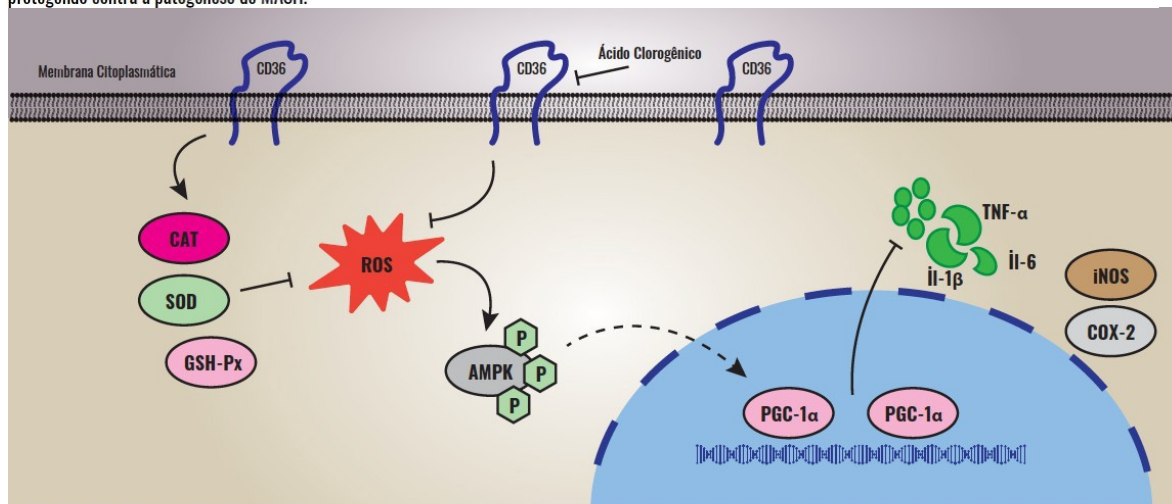
A translocase de ácidos graxos (FAT em inglês) ou CD36 é uma proteína transmembrana que conduz a entrada de ácidos graxos no hepatócito, portanto um transportador de ácidos graxos para o citoplasma celular (34). A expressão basal hepatocitária de CD36 é considerada baixa, mas aumenta significativamente em dietas ricas em gorduras (34).

Essa é uma molécula de sinalização também envolvida na resposta inflamatória (47). O aumento da expressão de CD36 no fígado pode contribuir para o desenvolvimento da MASLD (48). Já está estabelecido que o CD36 estabelece a mediação com os mecanismos moleculares envolvidos na ativação hepatocelular via estresse oxidativo (49). O gene que codifica a proteína CD36 é superexpresso em pacientes com MASLD (40), estimulando as vias de estresse oxidativo e de apoptose, pelos ligantes específicos, com mediação dos reguladores de transcrição, conforme apresentado na figura 3. A positividade do CD36 foi estudada por análise imuno-histoquímica em humanos e foi associada à resistência à insulina, hiperinsulinemia e piora da esteatose (50). A ativação da expressão do CD36 (por regulação do PPAR- γ) em macrófagos, está implicada na formação das placas ateroscleróticas (48).

Figura 3. O mecanismo de ação do CD36 nos hepatócitos



Mecanismos moleculares pelos quais a inibição da palmitoilação do CD36 protege camundongos da MASH. A dieta rica em gorduras aumenta a palmitoilação do CD36, promovendo a entrada do CD36 na membrana plasmática, facilitando a ligação/captação de ácidos graxos de cadeia longa e a formação do complexo CD36/Fyn/Lyn, já que o CD36 não apenas funciona como um transportador de ácidos graxos, mas também recruta a quinase da família src Fyn e Lyn para formar complexos de sinalização de proteínas. O desequilíbrio entre a disponibilidade de ácidos graxos (captação) e o consumo pela β -oxidação de ácidos graxos, assim como a ativação da resposta inflamatória, resulta no desenvolvimento de MASH. Quando a palmitoilação do CD36 foi inibida, a transdução de sinal inflamatório mediada por JNK [a quinase c-Jun NH(2)-terminal (JNK) contribui para a esteato-hepatite e a fibrose] é inibida e a homeostase celular de ácidos graxos é recuperada, protegendo contra a patogênese de MASH.



O ácido clorogênico (CGA) regula positivamente o PGC-1 α (do inglês, Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-alpha – um promotor da oxidação de ácidos graxos) ao inibir o CD36, diminuindo assim os níveis de expressão de IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX-2 (ciclooxigenase-2) e a síntese de indutível óxido nítrico (iNOS), para desencadear efeitos biológicos. Esses dados sugerem que o CGA previne respostas inflamatórias, e esse efeito pode ser mediado pela modulação da cascata CD36/AMPK/PGC-1 α .

1.1.6 – APRESENTAÇÃO CLÍNICA E DIAGNÓSTICO

A maioria dos pacientes com MASLD são assintomáticos (51), ou tem queixas inespecíficas, como fadiga, distúrbios do sono ou desconforto em hipocôndrio direito.

Hepatomegalia, apesar de infrequente, é o achado mais comum ao exame físico (32). Os parâmetros séricos tradicionais e comumente avaliados incluem ALT, AST, além de ferritina e outros (32). Mais recentemente, testes séricos de micro ácidos ribonucleicos (miRNA) parecem ter robusta eficácia diagnóstica para pacientes com MASLD (52). Tais testes, no entanto, não parecem ser adequados para todos os perfis de pacientes, tendo falhado ao estudar população específica de pacientes com T2DM (53). Atualmente, há uma série de biomarcadores, incluindo os com potencial preditor de desfechos, como a fibrose hepática, incluindo SteatoTest, Fatty Liver Index and NAFLD Liver Fat Score (31). Testes matemáticos indiretos também podem ser utilizados para estimar o risco de fibrose avançada, ou excluí-la, sendo os melhores o APRI e o FIB-4 (54).

Dentre os métodos de imagem utilizados estão a ultrassonografia convencional, a qual é o método mais utilizado, porém pode apresentar resultados falso negativos, a tomografia computadorizada e a ressonância nuclear magnética (exame mais específico). Embora esses métodos sejam confiáveis para a detecção não-invasiva de esteatose moderada a severa, eles não são capazes de diagnosticar MASH e fibrose. Tecnologias para a avaliação não invasiva de fibrose, como Fibroscan®, (impulso de força de radiação acústica), elastografia guiada por ultrassom e elastografia baseada em ressonância nuclear magnética são utilizadas para determinar a severidade da fibrose hepática associada a MASH (55). A elastografia transitória, ao ser comparada com elastografia guiada por ultrassom parece apresentar a melhor performance em relação ao padrão áureo (biópsia hepática) para o diagnóstico e exclusão de fibrose avançada em pacientes com MASLD (56). A ressonância nuclear magnética, em suas diversas modalidades descritas (31), tem ganhado espaço dentre os diferentes métodos citados, constando como recomendação atual para o manejo dos pacientes com MAFLD nas diretrizes propostas (57).

Finalmente, o valor da biópsia hepática como ferramenta diagnóstica, embora seja um procedimento invasivo, continua a ter relevância, principalmente em situações de discrepâncias nos resultados dos demais testes (32), bem como para exclusão de diagnósticos diferenciais. O diagnóstico da MASH é feito pela associação do acúmulo de gordura em mais de 5% do parênquima hepático com inflamação lobular ou portal e balonização hepatocelular, com ou sem fibrose (3). Em 1999, uma proposta para a

classificação e estadiamento desses achados foi apresentada (58).

1.1.7 – CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA

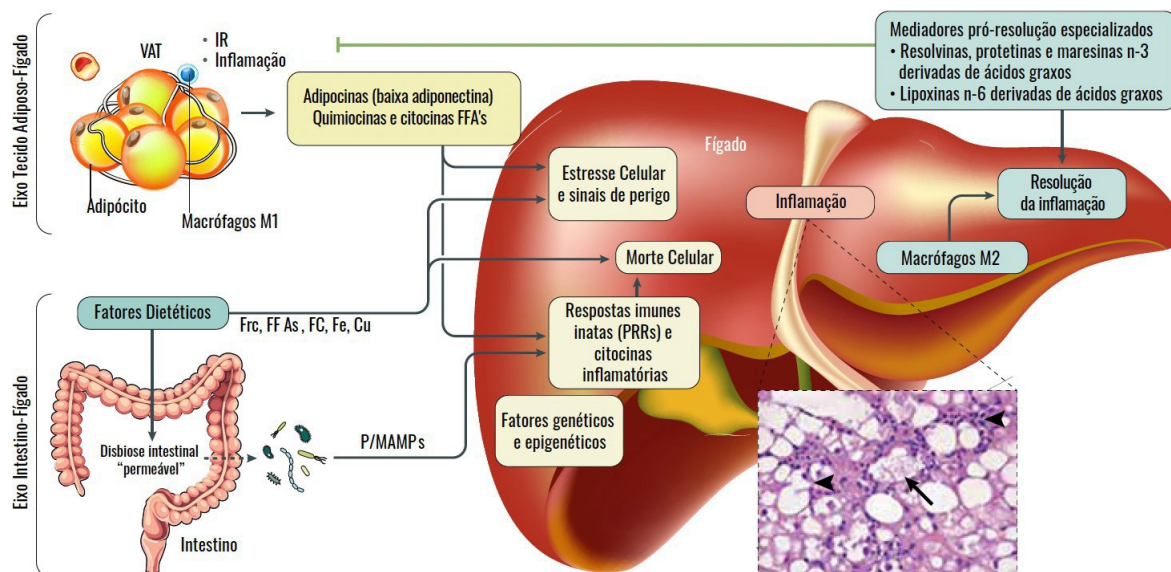
Em 2005, o Comitê de Patologistas do Grupo de Pesquisa Clínica para Esteatohepatite Não-alcoólica aprimorou, desenhou e validou um sistema de pontos que discriminou todo o espectro da MASLD, propondo o escore de atividade de MASLD, chamado NAS (do inglês NAFLD score), amplamente difundido. O escore engloba quatorze diferentes categorias de achados histológicos, quatro dos componentes de forma semiquantitativa: esteatose (graduada de 0 a 3), inflamação lobular (graduada de 0 a 3), a balonização (graduada de 0 a 2) e a fibrose (em escores 0 (ausência de fibrose), 1a (fibrose sinusoidal leve), 1b (fibrose sinusoidal moderada), 1c (fibrose portal), 2 (fibrose perisinusoidal associada ao periportal), 3 (fibrose septal) e 4 (cirrose)). Adicionalmente, a inflamação portal crônica e a localização da esteatose foram incluídos (59).

Mais tarde, em 2012, Bedossa desenvolve um algoritmo para avaliar e subclassificar as biópsias hepáticas de pacientes obesos mórbidos. A avaliação semiquantitativa de esteatose, balonização hepatocitária e inflamação lobular foi utilizada. Foi sugerido o escore SAF, que incluiu esteatose (S), atividade (A) e fibrose (F) (60).

A recomendação atual é de que o laudo contenha os resultados descritos através de padrões estabelecidos, incluindo a presença ou não de fibrose e de esteato-hepatite, bem como a graduação destes, quando presentes, sendo sugerido o uso do escore NAS (57).

Na tentativa constante de aprimorar, bem como detectar marcadores objetivos que confirmem a presença das alterações citológicas hepatocitárias, incluindo a balonização, o uso de estudo imunoistoquímico complementar com avaliação da citoqueratina 18 (CK18) pode ser utilizado (61–63). Os achados até aqui descritos estão contemplados na figura 4.

Figura 4. Gatilhos e Resolução de MASH



O fígado deve abordar uma infinidade de moléculas sinalizadoras provenientes de diferentes fontes, como o tecido adiposo periférico (do inglês, VAT) e o trato gastrointestinal. O aumento da gordura visceral (VAT) é associado ao aumento da infiltração de macrófagos M1, o que desencadeia resistência à insulina (do inglês, IR) e a um perfil alterado de adipocinas (baixos níveis de adiponectina e altos níveis de leptina e fator de necrose tumoral). Macrófagos do VAT secretam quimiocinas e citocinas que induzem inflamação hepática e IR hepática. O aumento de ácidos graxos livres (FFA) circulantes devido à lipólise pode induzir efeitos lipotóxicos hepáticos e morte celular, alimentando ainda mais a inflamação hepática. Fatores dietéticos, como frutose (do inglês, Frc), FFAs, colesterol livre (do inglês, FC), ferro (Fe) e baixos níveis de cobre (Cu), contribuem para um efeito pró-inflamatório intra hepático, induzindo efeitos lipotóxicos, disfunção mitocondrial, estresse do retículo endoplasmático, estresse oxidativo e apoptose. A disfunção da barreira intestinal leva ao aumento da translocação bacteriana e dos níveis circulantes de padrões moleculares associados a patógenos ou associados a microrganismos (P/MAMPs), que podem induzir uma resposta inflamatória através da ativação de células inflamatórias hepáticas. Além disso, a suscetibilidade a um estado inflamatório hepático depende do contexto genético e epigenético. A inflamação hepática pode ser resolvida por mecanismos macrofágicos e por mediadores pró-resolução especializados. O tecido hepático na EHNA (detalhe) é caracterizado por esteatose macrovesicular proeminente, infiltrado inflamatório misto (ponta de seta) e balonização de hepatócitos com presença de corpúsculos de Mallory-Denk (seta).

Fonte: Adaptado de Triggering and resolution of inflammation in NASH, Susanne Schuster, Daniel Cabrera, Marco Arrese and Ariel E. Feldstein, 2018.

1.1.8 - PROGNÓSTICO

O índice de progressão de MASLD para MASH é discrepante nos dados da literatura, considerando-se as diferentes formas de avaliação diagnóstica utilizadas nos estudos clínicos. Segundo Younossi (8), as taxas de incidência para progressão de fibrose, o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular e a mortalidade foram, respectivamente, 41%, 5,29% e 2,56% em pacientes com MASH. Pacientes com MASLD tem índices inferiores: 0,44% para desenvolvimento de carcinoma hepatocelular e 1,05% para mortalidade por doença hepática.

O estágio de fibrose prediz tanto mortalidade global quanto específica nesses pacientes. Por outro lado, o escore NAS (que avalia esteatose, inflamação e balonização hepatocitária) não parece ser efetivo nesta avaliação (64). A habilidade,

portanto, de detectar a fibrose precocemente, em pacientes com MASLD parece ser crítica para controlar a mortalidade associada a esta doença de elevada prevalência (65).

1.1.9 - TRATAMENTO

Até o momento, as diretrizes de tratamento são multimodais (57). Historicamente, o principal tratamento para MASLD consiste na remoção dos agentes causadores, incluindo drogas hepatotóxicas, medidas que promovam a perda de peso, como a dieta, o controle de T2DM e de hiperlipidemia. O foco do manejo é amenizar os efeitos dos fatores de risco para MASH, prevenindo assim a progressão da doença ou até mesmo a regressão de esteatose hepática ou MASH já estabelecida (66). O exercício físico faz parte das recomendações para esses pacientes, conforme as diretrizes atuais (57).

Dentro das modalidades terapêuticas, incluem-se as de mudança de hábitos, com melhora da qualidade de vida, medicações orais e, em pacientes obesos mórbidos, a cirurgia bariátrica é tratamento eficaz (5). Os fármacos incluídos nas diretrizes incluem medicações indutoras de perda ponderal, bem como medicamentos com potenciais benefícios hepáticos, como terapias baseadas em incretinas, inibidores de SGLT-2, pioglitazona, com recomendação de nível B pelas atuais diretrizes (57). Publicações atuais incluem estudo clínico de fase 2b para avaliar a tirzepatida como tratamento para disfunção metabólica (67). Neste ano, o resmetirom, um anti-fibrótico constituído de um agonista do receptor de hormônio tireoidiano- β foi aprovado para uso, associado a dieta e exercício, para o tratamento de adultos com NASH com e fibrose hepática moderada a avançada (consistente com os estágios de fibrose F2 a F3), sem cirrose (68).

1.2 APNEIA OBSTRUTIVA DO SONO

1.2.1 CONCEITOS GERAIS, EPIDEMIOLOGIA E APRESENTAÇÃO CLÍNICA

As primeiras descrições de apneia obstrutiva do sono (AOS) foram publicadas a década de 1960 e tem por característica a alteração da musculatura craniofaríngea

(69), incluindo retrognatia, macroglossia, a redução excessiva do tônus muscular durante o sono, permitindo o colapso da via aérea (70).

AOS é uma condição comum que afeta de 2% a 4% da população geral e de 35% a 45% dos indivíduos obesos. Dentre os últimos, a prevalência é de 42% a 48% em homens e de 8% a 38% em mulheres (71). Essa disparidade provavelmente se deve a fatores como o perfil hormonal, a distribuição da gordura corporal e as diferenças anatômicas nas vias aéreas superiores entre os sexos (71). Os sintomas noturnos incluem ronco alto, despertares noturnos frequentes, além do relato testemunhal de apneia. Já o diurno é a sonolência excessiva, com tendência a adormecer em determinadas circunstâncias não usuais (70).

Apneia é definida pela redução do fluxo de ar de mais de 90% durante a respiração em relação ao valor basal. Hipopneia é a redução do fluxo de ar de mais de 30%, por um tempo ≥ 10 segundos, resultando em dessaturação de oxigênio de pelo menos 3% a 4% (70,72). A classificação da gravidade da AOS é realizada com base no índice de apneia/hipopneia por hora de sono (IAH). O índice de dessaturação de oxigênio é determinado pelo número de episódios em que ocorre uma dessaturação de oxigênio maior ou igual a 3% a 4% durante cada hora do tempo total de sono. Em indivíduos adultos saudáveis, a pontuação do IAH é inferior a 5. Os pacientes com apneia do sono são categorizados pelos protocolos conforme os níveis de IAH: aqueles com índices entre 5 e 14 são considerados com grau leve, entre 15 e 29 com grau moderado, e aqueles com IAH igual ou superior a 30 são classificados como grave (73).

1.2.2 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

Na avaliação clínica de pacientes com sintomas sugestivos de apneia obstrutiva do sono (AOS), diversas escalas e questionários são utilizados para diagnóstico e triagem. O Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI), validado para o português em 2009, fornece uma combinação de informações quantitativas e qualitativas sobre o sono no mês anterior e consiste na aplicação de 19 questões autoaplicadas, além de 5 questões respondidas por acompanhantes. Essas últimas são utilizadas apenas para fins de informação clínica. Todas são agrupadas em sete componentes, com pesos variando de 0 a 3. Os componentes do PSQI incluem: qualidade subjetiva do sono, latência do sono, duração do sono, eficiência habitual do

sono, distúrbios do sono, uso de medicamentos para dormir e disfunção diurna. As pontuações desses componentes são somadas para gerar um escore global que varia de 0 a 21, sendo que uma pontuação acima de 10 indica má qualidade do sono (74). O estudo do sono é a investigação mais importante para o processo de diagnóstico da AOS (70). A polissonografia é o padrão áureo para diagnosticar a doença (75).

O tratamento da AOS é predominantemente realizado por meio do uso de CPAP (do inglês *Continuous Positive Airway Pressure*), um dispositivo que gera e direciona um fluxo contínuo de ar por meio de um tubo flexível para uma máscara nasal ou oronasal adequadamente ajustada ao rosto do paciente. Quando a pressão positiva é aplicada através das narinas, ocorre a dilatação de todo o trajeto das vias aéreas superiores. Os benefícios associados ao uso do CPAP incluem a eliminação das apneias, o aumento da saturação de oxi-hemoglobina e a diminuição dos despertares noturnos relacionados a eventos respiratórios. Como resultado, se observa uma redução da sonolência diurna excessiva, bem como uma melhoria nas funções neuropsíquicas, nos sintomas depressivos e na qualidade de vida (76).

Além disso, outras modalidades incluem cirurgias craniofaciais, mudanças comportamentais de estilo de vida, bem como perda de peso, com ou sem cirurgia bariátrica (70).

1.2.3 ASSOCIAÇÃO DA APNEIA OBTRUTIVA DO SONO E A DOENÇA HEPÁTICA ASSOCIADA A DISFUNÇÃO METABÓLICA

Evidências crescentes apontam que a AOS predispõe, à hipertensão arterial sistêmica, à dislipidemia e à hiperglicemia, independentemente da obesidade visceral (77). A interação fisiopatológica entre a AOS e as doenças metabólicas e suas repercussões hepáticas (em obesos e não obesos), é complexa, abrangendo fatores humorais, mecânicos, hemodinâmicos, neurais e do ritmo circadiano. O estresse oxidativo e a disfunção endotelial configuram-se como os principais mecanismos envolvidos (70,72,78–83).

Estudos indicam que a hipoxemia crônica intermitente (HCI), resultante da AOS, pode promover o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, disfunção endotelial, estresse oxidativo, desregulação metabólica e resistência à insulina, evidenciando a correlação entre os fatores da AOS e da MASLD (84–86). A HCI provoca um desequilíbrio entre os agentes oxidantes e antioxidantes, o que pode

resultar na formação de espécies reativas de oxigênio (do inglês ROS), lipoperoxidação e dano hepático (83). Adicionalmente, está descrito que o acúmulo de adipocinas está relacionado à AOS via regulação gênica (87).

Foi demonstrado que a HCl induz hiperglicemia e peroxidação lipídica hepática, além de aumentar a atividade do fator nuclear kappa beta (NF- κ B), que é um regulador da resposta inflamatória (83,88). A hipóxia, por si só, pode regular a expressão de genes lipogênicos, reduzir a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico e, dessa forma, promover o acúmulo de triglicerídeos hepáticos, necrose, inflamação e fibrose, estando, portanto, também relacionada à progressão da doença hepática esteatótica não alcoólica (MASLD) (89). Diversos estudos tem examinado a relação entre a apneia AOS e os achados histopatológicos (81,82,90).

Há uma associação reconhecida entre a síndrome da apneia obstrutiva do sono (do inglês OSAS) e a SM, designada síndrome Z. A obesidade central está associada à OSAS e à SM, e há evidências de que a AOS é um fator de risco independente para obesidade, intolerância à glicose e resistência à insulina. Os mecanismos implicados resultam da ativação do sistema nervoso simpático e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal; ativação de marcadores pró-inflamatórios, como a IL-6 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α); e a redução nos níveis de adiponectina, principalmente desencadeada pela HCl relacionada à apneia. Apesar de tais evidências, os resultados são controversos quanto aos benefícios do tratamento da AOS com CPAP na presença dessas alterações metabólicas. Além disso, os poucos estudos que abordaram a AOS como um fator de risco para dislipidemia apresentaram resultados conflitantes (91).

1.2.4 INTERFACE DO CD36 COM A APNEIA OBSTRUTIVA DO SONO E A DOENÇA HEPÁTICA ASSOCIADA A DISFUNÇÃO METABÓLICA

A expressão do CD36 nos diferentes constituintes celulares é crítica para a regulação de sua atividade funcional como transportador de ácidos graxos livres (do inglês FFA), facilitando a captação e o influxo de FFA para as células, permanecendo funcionalmente inativo nos estoques intracelulares e ativo quando translocado para a membrana plasmática (92). O CD36 está amplamente localizado na membrana plasmática dos hepatócitos, tanto em pacientes com MASH quanto em camundongos com características histológicas de MASH, indicando o papel de fenômenos

bioquímicos na regulação da translocação do CD36 para a membrana plasmática dos hepatócitos (93). Há evidências indicando que o fator indutível por hipóxia 2 alfa (HIF2 α) regula positivamente a expressão e a função do CD36 nos hepatócitos e pode contribuir para o início da esteatose hepática (92).

Em modelos animais, é relatado indução da biossíntese lipídica hepática exacerbada por HIC em camundongos obesos (94). Foi demonstrado que a expressão de CD36 está aumentada no fígado de pacientes com AOS e em camundongos expostos à hipoxia intermitente (IH), que é a característica clínica da AOS. Alguns resultados indicam que o acúmulo excessivo de lipídios observado nos fígados de camundongos sob condições de IH é provavelmente devido à regulação positiva do CD36, que está envolvido na captação de ácidos graxos livres pelos hepatócitos, juntamente com a expressão de genes implicados na lipogênese de novo, levando assim ao início da esteatose hepática. Estima-se que o CD36 possa ser alvo potencial para novas terapias farmacológicas para pacientes com MASLD (95).

2. JUSTIFICATIVA

A elevada incidência de MASLD, associada a um pior prognóstico da sua forma evolutiva, a esteato-hepatite, justificam o estudo desta patologia. Há um potencial para novas pesquisas que avaliem a ativação do CD36, um fator implicado no prognóstico da MASLD e sua expressão histológica por imunoistoquímica. Além disso, existe uma possibilidade de estudar melhor a relação entre a AOS, outro fator de risco de pior prognóstico, e o CD36.

3. OBJETIVOS

3.1- OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão imunoistoquímica do anticorpo CD36 na doença hepática associada ao metabolismo (MASLD).

3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão imunoistoquímica do anticorpo CD36 na MASH e sua gravidade.
- Avaliar a expressão imunoistoquímica do anticorpo CD36 na MASH com a presença de fibrose e sua graduação.
- Correlacionar a expressão imunoistoquímica do anticorpo CD36 com os dados clínico laboratoriais e histológicos dos pacientes, incluindo síndrome metabólica.
- Avaliar a expressão imunoistoquímica do anticorpo CD36 nas diferentes populações celulares hepáticas, bem como nos diferentes constituintes celulares hepatocitários.
- Correlacionar a expressão do CD36 em pacientes com AOS.

4. REFERÊNCIAS

1. Ayonrinde OT. Historical narrative from fatty liver in the nineteenth century to contemporary NAFLD – Reconciling the present with the past. Vol. 3, JHEP Reports. Elsevier B.V.; 2021.
2. Zelman S. The liver in obesity. Arch Intern Med. 1952 Aug 1;90(2):141.
3. Leevy CM. Fatty liver: a study of 270 patients with biopsy proven fatty liver and a review of the literature. Medicine. 1962 Sep;41(3):249–78.
4. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. Mayo Clin Proc. 1980 Jul;55(7):434–8.
5. Brunt EM, Wong VWS, Nobili V, Day CP, Sookoian S, Maher JJ, et al. Nonalcoholic fatty liver disease. Nat Rev Dis Primers. 2015 Dec 17;1.
6. Schuster S, Cabrera D, Arrese M, Feldstein AE. Triggering and resolution of inflammation in NASH. Vol. 15, Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology. 2018.
7. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Yao Chang Liu, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: A spectrum of clinical and pathological severity. Gastroenterology. 1999;116(6).
8. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. Hepatology. 2016;64(1).
9. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, 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*. 2012;55(6).

10. Eslam M, Sanyal AJ, George J, Sanyal A, Neuschwander-Tetri B, Tiribelli C, et al. MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2020 May;158(7):1999-2014.e1.
11. Eslam M, Sanyal AJ, George J. Toward More Accurate Nomenclature for Fatty Liver Diseases. Vol. 157, *Gastroenterology*. W.B. Saunders; 2019. p. 590–3.
12. Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, Anstee QM, Targher G, Romero-Gomez M, et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. Vol. 73, *Journal of Hepatology*. 2020.
13. Rinella ME, Lazarus J V., Ratziu V, Francque SM, Sanyal AJ, Kanwal F, et al. A multisociety Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature. *J Hepatol*. 2023 Dec;79(6):1542–56.
14. Bilson J, Mantovani A, Byrne CD, Targher G. Steatotic liver disease, MASLD and risk of chronic kidney disease. Vol. 50, *Diabetes and Metabolism*. Elsevier Masson s.r.l.; 2024.
15. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: Trends, predictions, risk factors and prevention. Vol. 15, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2018.
16. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease-Meta-Analytic Assessment of Prevalence, Incidence, and Outcomes. 2015; Available from: <http://www.prisma-statement.org/>.
17. 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*. 2023 Apr 1;77(4):1335– 47.
18. Cotrim HP, Parise ER, Oliveira CPMS, Leite N, Martinelli A, Galizzi J, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in Brazil. Clinical and histological profile. *Ann Hepatol*. 10(1):33–7.
19. D’Incao RB, Tovo CV, Mattevi VS, Borges DO, Ulbrich JM, Coral GP, et al. Adipokine Levels Versus Hepatic Histopathology in Bariatric Surgery Patients. *Obes Surg*. 2017 Aug 10;27(8):2151–8.
20. Losekann A, Weston AC, de Mattos AA, Tovo C v., de Carli LA, Espindola MB, et al. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH): Risk factors in morbidly obese patients. *Int J Mol Sci*. 2015;16(10).
21. Vilar-Gomez E, Calzadilla-Bertot L, Wai-Sun Wong V, Castellanos M, Aller-de la Fuente R, Metwally M, et al. Fibrosis Severity as a Determinant of Cause-Specific Mortality in Patients With Advanced Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Multi- National Cohort Study. *Gastroenterology*. 2018 Aug 1;155(2):443-457.e17.

22. Juanola O, Martínez-López S, Francés R, Gómez-Hurtado I. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Metabolic, Genetic, Epigenetic and Environmental Risk Factors. *Int J Environ Res Public Health*. 2021 May 14;18(10):5227.
23. Xian YX, Weng JP, Xu F. MAFLD vs. NAFLD: shared features and potential changes in epidemiology, pathophysiology, diagnosis, and pharmacotherapy. *Chin Med J (Engl)*. 2020 Dec 14;134(1):8–19.
24. Strey CBM, de Carli LA, Fantinelli M, Gobbato SS, Bassols GF, Losekann A, et al. Impact of Diabetes Mellitus and Insulin on Nonalcoholic Fatty Liver Disease in the Morbidly Obese. *Ann Hepatol*. 17(4):585–91.
25. BaRy G, Brunt EM, Caldwell SH. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: An emerging menace. Vol. 56, *Journal of Hepatology*. 2012. p. 1384– 91.
26. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, 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*. 2012 Jun;55(6):2005–23.
27. Perumpail BJ, Khan MA, Yoo ER, Cholankeril G, Kim D, Ahmed A. Clinical epidemiology and disease burden of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2017 Dec 21;23(47):8263–76.
28. Carpino G, Pastori D, Baratta F, Overi D, Labbadia G, Polimeni L, et al. PNPLA3 variant and portal/periportal histological pattern in patients with biopsy-proven non-alcoholic fatty liver disease: a possible role for oxidative stress. *Sci Rep*. 2017 Nov 17;7(1):15756.
29. Al-Qarni R, Iqbal M, Al-Otaibi M, Al-Saif F, Alfadda AA, Alkhalidi H, et al. Validating candidate biomarkers for diRerent stages of non-alcoholic fatty liver disease. *Medicine*. 2020 Sep 4;99(36):e21463.
30. Day CP, James OFW. Steatohepatitis: A tale of two “Hits”? Vol. 114, *Gastroenterology*. 1998.
31. Martinou E, Pericleous M, Stefanova I, Kaur V, Angelidi AM. Diagnostic Modalities of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: From Biochemical Biomarkers to Multi- Omics Non-Invasive Approaches. *Diagnostics*. 2022 Feb 1;12(2).
32. Brunt EM, Wong VWS, Nobili V, Day CP, Sookoian S, Maher JJ, et al. Nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2015 Dec 17;1(1):15080.
33. Maher JJ, Leon P, Ryan JC. Beyond insulin resistance: Innate immunity in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2008 Aug;48(2):670–8.
34. He J, Lee JH, Febbraio M, Xie W. The emerging roles of fatty acid translocase/CD36 and the aryl hydrocarbon receptor in fatty liver disease. Vol. 236, *Experimental Biology and Medicine*. 2011.

35. Liu J, Yang P, Zuo G, He S, Tan W, Zhang X, et al. Long-chain fatty acid activates hepatocytes through CD36 mediated oxidative stress. *Lipids Health Dis.* 2018 Dec 17;17(1):153.
36. Koyama Y, Brenner DA. Liver inflammation and fibrosis. Vol. 127, *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation; 2017. p. 55–64.
37. Harmon RC, Tiniakos DG, Argo CK. Inflammation in nonalcoholic steatohepatitis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011 Apr 10;5(2):189–200.
38. Schuster S, Cabrera D, Arrese M, Feldstein AE. Triggering and resolution of inflammation in NASH. Vol. 15, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. Nature Publishing Group; 2018. p. 349–64.
39. Berson A, Beco V DE, Lett  Ron P, Anne Robin M, Moreau C, Kahwaji J EL, et al. Steatohepatitis-Inducing Drugs Cause Mitochondrial Dysfunction and Lipid Peroxidation in Rat Hepatocytes.
40. Greco D, Kotronen A, Westerbacka J, Puig O, Arkkila P, Kiviluoto T, et al. Gene expression in human NAFLD. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology.* 2008 May;294(5):G1281–7.
41. Doege H, Grimm D, Falcon A, Tsang B, Storm TA, Xu H, et al. Silencing of hepatic fatty acid transporter protein 5 in vivo reverses diet-induced non-alcoholic fatty liver disease and improves hyperglycemia. *Journal of Biological Chemistry.* 2008 Aug 8;283(32):22186–92.
42. Mitsuyoshi H, Yasui K, Harano Y, Endo M, Tsuji K, Minami M, et al. Analysis of hepatic genes involved in the metabolism of fatty acids and iron in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology Research.* 2009;39(4):366–73.
43. Falcon A, Doege H, Fluit A, Tsang B, Watson N, Kay MA, et al. FATP2 is a hepatic fatty acid transporter and peroxisomal very long-chain acyl-CoA synthetase. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010 Sep;299(3).
44. Geng Y, Faber KN, de Meijer VE, Blokzijl H, Moshage H. How does hepatic lipid accumulation lead to lipotoxicity in non-alcoholic fatty liver disease? Vol. 15, *Hepatology International*. Springer; 2021. p. 21–35.
45. Miele L, Alberelli MA, Martini M, Liguori A, Marrone G, Cocomazzi A, et al. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) severity is associated to a nonhemostatic contribution and proinflammatory phenotype of platelets. *Translational Research.* 2021 May;231:24–38.
46. Malehmir M, Pfister D, Gallage S, Szydlowska M, Inverso D, Kotsiliti E, et al. Platelet GPIIb  is a mediator and potential interventional target for NASH and subsequent liver cancer. *Nat Med.* 2019 Apr 1;25(4):641–55.
47. Han B, Wang J, Wu J, Yan F, Wang Y, Li J. High glucose-induced upregulation of CD36 promotes inflammation stress via NF- B in H9c2 cells. *Mol Med Rep.* 2021 Nov 1;24(5).

48. He J, Lee JH, Febbraio M, Xie W. The emerging roles of fatty acid translocase/CD36 and the aryl hydrocarbon receptor in fatty liver disease. Vol. 236, *Experimental Biology and Medicine*. 2011. p. 1116–21.
49. Liu J, Yang P, Zuo G, He S, Tan W, Zhang X, et al. Long-chain fatty acid activates hepatocytes through CD36 mediated oxidative stress. *Lipids Health Dis*. 2018 Jul 17;17(1).
50. Miquilena-Colina ME, Lima-Cabello E, Sánchez-Campos S, García-Mediavilla MV, Fernández-Bermejo M, Lozano-Rodríguez T, et al. Hepatic fatty acid translocase CD36 upregulation is associated with insulin resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *Gut*. 2011 Oct;60(10):1394–402.
51. Cotrim HP, Parise ER, Oliveira CPMS, Leite N, Martinelli A, Galizzi J, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in Brazil. Clinical and histological profile. *Ann Hepatol*. 2011;10(1):33–7.
52. Xin S, Zhan Q, Chen X, Xu J, Yu Y. Efficacy of serum miRNA test as a non-invasive method to diagnose nonalcoholic steatohepatitis: A systematic review and meta-analysis. *BMC Gastroenterol*. 2020;20(1).
53. Bril F, McPhaul MJ, Caulfield MP, Castille JM, Poynard T, Soldevila-Pico C, et al. Performance of the SteatoTest, ActiTest, NashTest and FibroTest in a multiethnic cohort of patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Investigative Medicine*. 2019 Feb;67(2):303–11.
54. De Carli MAL, De Carli LA, Correa MB, Junqueira G, Tovo CV, Coral GP. Performance of noninvasive scores for the diagnosis of advanced liver fibrosis in morbidly obese with nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2020 Mar 1;32(3):420–5.
55. Tovo CV, Mattos AZ de, Coral GP, Branco FS, Suwa E, Mattos AA de. Noninvasive imaging assessment of non-alcoholic fatty liver disease: Focus on liver scintigraphy. *World J Gastroenterol*. 2015 Apr 21;21(15):4432–9.
56. Tovo C v., Villela-Nogueira CA, Leite NC, Panke CL, Port GZ, Fernandes S, et al. Transient hepatic elastography has the best performance to evaluate liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Ann Hepatol*. 2019;18(3).
57. Fan JG, Xu XY, Yang RX, Nan YM, Wei L, Jia JD, et al. Guideline for the Prevention and Treatment of Metabolic Dysfunction-associated Fatty Liver Disease (Version 2024). *J Clin Transl Hepatol*. 2024 Nov 4;000(000):000–000.
58. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic Steatohepatitis: A Proposal for Grading and Staging The Histological Lesions. *American Journal of Gastroenterology*. 1999 Sep;94(9):2467–74.
59. Kleiner DE, Brunt EM, van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design

and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005 Jun;41(6):1313–21.

60. Bedossa P, Poitou C, Veyrie N, Bouillot JL, Basdevant A, Paradis V, et al. Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology*. 2012 Nov;56(5):1751–9.
61. Brunt EM. Non-alcoholic fatty liver disease: what's new under the microscope? *Gut*. 2011 Aug;60(8):1152–8.
62. Brunt EM. Pathology of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010 Apr 2;7(4):195–203.
63. Lackner C, Gogg-Kamerer M, Zatloukal K, Stumptner C, Brunt EM, Denk H. Ballooned hepatocytes in steatohepatitis: the value of keratin immunohistochemistry for diagnosis. *J Hepatol*. 2008 May;48(5):821–8.
64. Ekstedt M, Hagström H, Nasr P, Fredrikson M, Stål P, Kechagias S, et al. Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatology*. 2015 May;61(5):1547–54.
65. Lin B, Ma Y, Wu S, Liu Y, Liu L, Wu L. Novel Serum Biomarkers for Noninvasive Diagnosis and Screening of Nonalcoholic Fatty Liver Disease-Related Hepatic Fibrosis. *OMICS*. 2019 Apr;23(4):181–9.
66. El-Kader SMA. Non-alcoholic fatty liver disease: The diagnosis and management. *World J Hepatol*. 2015;7(6):846.
67. Vuppalanchi R, Loomba R, Sanyal AJ, Nikooie A, Tang Y, Robins DA, et al. Randomised clinical trial: Design of the SYNERGY-NASH phase 2b trial to evaluate tirzepatide as a treatment for metabolic dysfunction-associated steatohepatitis and modification of screening strategy to reduce screen failures. *Aliment Pharmacol Ther*. 2024 Jul;60(1):17–32.
68. Keam SJ. Resmetirom: First Approval. *Drugs*. 2024 Jun 21;84(6):729–35.
69. Kurtz D, Krieger J, Stierle JC. EMG activity of cricothyroid and chin muscles during wakefulness and sleeping in the sleep apnea syndrome. Vol. 45, *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*. 1978.
70. Lévy P, Kohler M, McNicholas WT, Barbé F, McEvoy RD, Somers VK, et al. Obstructive sleep apnoea syndrome. *Nat Rev Dis Primers*. 2015 Jun 25;1.
71. Chen X, Lin X, Chen LD, Lin QC, Chen GP, Yu YH, et al. Obstructive sleep apnea is associated with fatty liver index, the index of nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2016 Jun;28(6):650–5.
72. Wang L, Liu H, Zhou L, Zheng P, Li H, Zhang H, et al. Association of Obstructive Sleep

Apnea with Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Evidence, Mechanism, and Treatment. Vol. 16, *Nature and Science of Sleep*. Dove Medical Press Ltd; 2024. p. 917–33.

73. Ruehland WR, Rochford PD, O'Donoghue FJ, Pierce RJ, Singh P, Thornton AT. The New AASM Criteria for Scoring Hypopneas: Impact on the Apnea Hypopnea Index. *Sleep*. 2009 Feb;32(2):150–7.
74. Bertolazi AN, Fagundes SC, HoR LS, Dartora EG, da Silva Miozzo IC, de Barba MEF, et al. Validation of the Brazilian Portuguese version of the Pittsburgh Sleep Quality Index. *Sleep Med*. 2011 Jan;12(1):70–5.
75. Kapur VK, Auckley DH, Chowdhuri S, Kuhlmann DC, Mehra R, Ramar K, et al. Clinical Practice Guideline for Diagnostic Testing for Adult Obstructive Sleep Apnea: An American Academy of Sleep Medicine Clinical Practice Guideline. *Journal of Clinical Sleep Medicine*. 2017 Mar 15;13(03):479–504.
76. Kushida CA, Littner MR, Hirshkowitz M, Morgenthaler TI, Alessi CA, Bailey D, et al. Practice Parameters for the Use of Continuous and Bilevel Positive Airway Pressure Devices to Treat Adult Patients With Sleep-Related Breathing Disorders. *Sleep*. 2006 Mar;29(3):375–80.
77. Kono M, Tatsumi K, Saibara T, Nakamura A, Tanabe N, Takiguchi Y, et al. Obstructive Sleep Apnea Syndrome Is Associated With Some Components of Metabolic Syndrome. *Chest*. 2007 May;131(5):1387–92.
78. Polotsky VY, Patil SP, Savransky V, LaRan A, Fonti S, Frame LA, et al. Obstructive Sleep Apnea, Insulin Resistance, and Steatohepatitis in Severe Obesity. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 Feb 1;179(3):228–34.
79. Jouët P, Sabaté JM, Maillard D, Msika S, Mechler C, Ledoux S, et al. Relationship between Obstructive Sleep Apnea and Liver Abnormalities in Morbidly Obese Patients: A Prospective Study. *Obes Surg*. 2007 Apr 1;17(4):478–85.
80. Tanné F, Gagnadoux F, Chazouillères O, Fleury B, Wendum D, Lasnier E, et al. Chronic liver injury during obstructive sleep apnea. *Hepatology*. 2005 Jun;41(6):1290–6.
81. Hany M, Abouelnasr AA, Abdelkhalek MH, Ibrahim M, Aboelsoud MR, Hozien AI, et al. Effects of obstructive sleep apnea on non-alcoholic fatty liver disease in patients with obesity: a systematic review. Vol. 47, *International Journal of Obesity*. Springer Nature; 2023. p. 1200–13.
82. Lin QC, Chen LD, Chen GP, Zhao JM, Chen X, Huang JF, et al. Association between nocturnal hypoxia and liver injury in the setting of nonalcoholic fatty liver disease. *Sleep and Breathing*. 2015 Mar 29;19(1):273–80.
83. Meliante PG, Zoccali F, Cascone F, Di Stefano V, Greco A, de Vincentiis M, et al. Molecular Pathology, Oxidative Stress, and Biomarkers in Obstructive Sleep Apnea. Vol. 24,

International Journal of Molecular Sciences. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.

84. Ciftci TU, Kokturk O, Bukan N, Bilgihan A. The relationship between serum cytokine levels with obesity and obstructive sleep apnea syndrome. *Cytokine*. 2004 Oct;28(2):87–91.
85. Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Selective Activation of Inflammatory Pathways by Intermittent Hypoxia in Obstructive Sleep Apnea Syndrome. *Circulation*. 2005 Oct 25;112(17):2660–7.
86. Christou K, Markoulis N, Moulas AN, Pastaka C, Gourgoulisanis KI. Reactive Oxygen Metabolites (ROMs) as an Index of Oxidative Stress in Obstructive Sleep Apnea Patients. *Sleep and Breathing*. 2003 Jul;7(3):105–9.
87. Piguet AC, Stroka D, Zimmermann A, Dufour JF. Hypoxia aggravates non-alcoholic steatohepatitis in mice lacking hepatocellular PTEN. *Clin Sci*. 2010 Mar 1;118(6):401–10.
88. Savransky V, Nanayakkara A, Vivero A, Li J, Bevans S, Smith PL, et al. Chronic intermittent hypoxia predisposes to liver injury. *Hepatology*. 2007 Apr;45(4):1007–13.
89. Musso G, Cassader M, Olivetti C, Rosina F, Carbone G, Gambino R. Association of obstructive sleep apnoea with the presence and severity of non-alcoholic fatty liver disease. A systematic review and meta-analysis. *Obesity Reviews*. 2013 May 6;14(5):417–31.
90. Krolow GK, Garcia E, Schoor F, Araujo FBS, Coral GP. Obstructive sleep apnea and severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2021 Aug 1;33(8):1104–9.
91. Carneiro G, Fontes FH, Togeiro SMGP. Consequências metabólicas na SAOS não tratada. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2010 Jun;36(suppl 2):43–6.
92. Rey E, Meléndez-Rodríguez F, Marañón P, Gil-Valle M, Carrasco AG, Torres-Capelli M, et al. Hypoxia-inducible factor 2 α drives hepatosteatosis through the fatty acid translocase CD36. *Liver International*. 2020 Oct 10;40(10):2553–67.
93. Zhao L, Zhang C, Luo X, Wang P, Zhou W, Zhong S, et al. CD36 palmitoylation disrupts free fatty acid metabolism and promotes tissue inflammation in non- alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*. 2018 Sep 1;69(3):705–17.
94. Li J, Grigoryev DN, Ye SQ, Thorne L, Schwartz AR, Smith PL, et al. Chronic intermittent hypoxia upregulates genes of lipid biosynthesis in obese mice. *J Appl Physiol*. 2005 Nov;99(5):1643–8.
95. Rey E, del Pozo-Maroto E, Marañón P, Beeler B, García-García Y, Landete P, et al. Intrahepatic Expression of Fatty Acid Translocase CD36 Is Increased in Obstructive

Sleep Apnea. Front Med (Lausanne). 2020 Aug 11;7

5. ARTIGO

Artigo conforme as normas da Revista – European Journal of Gastroenterology and Hepatology

CD36HepatocyteExpressionbyImmunohistochemistryin MASH Patients

Carolina Rigatti Hartmann

Hepatology Post-Graduate Program, Post-graduate program in Medicine: Hepatology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

Luís Fernando Ferreira

Hepatology Post-Graduate Program, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

School of Electronics, Electrical Engineering and Computer Science, Queen's University of Belfast, Northern Ire

Luís Henrique Hartmann Sebastiany

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

Eduardo Garcia

Department of Internal Medicine, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA), RS, Brazil

Graciela Krolow

Hospital São Lucas da PUCRS de Porto Alegre, RS, Brazil

Gabriela Perdomo Coral

Department of Hepatology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

Correspondence to Luís Fernando Ferreira, Queen's University Belfast – Computer Sciences Building (EEECS-QUB). 16 Malone Rd, Belfast BT9 6SB, Northern Ireland, United Kingdom. E-mail: proVernandof@gmail.com. Phone: +55 51 980707053.

ABSTRACT

Background Metabolic-associated steatotic liver disease (MASLD) [previously referred to as Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)] is a worldwide health problem. Evaluation of steatosis and metabolic dysfunction associated steatohepatitis (MASH) [previously known as nonalcoholic steatohepatitis (NASH)] is current for liver pathologists. MASH and fibrosis are prognostic factors for the development of cirrhosis and mortality. Fatty acid translocase CD36 protein regulates the free fatty acid entrance in hepatocytes and is implicated in inflammation and apoptosis. Moreover, it can be associated with apnea, a prognostic factor for advanced MASH.

Goal This study aims to analyze CD36 overexpression in MASH and its relationship with clinical conditions and histological findings associated with MASLD, including obstructive sleep apnea (OSA).

Method This was a transversal study. Clinical, anthropometrical, and serum data were collected. Patients were also submitted to polysomnography. Anti-CD36 antibody immunostaining was performed on formalin-fixed paraffin-embedded liver biopsy. The hematoxylin-eosin, Masson's Trichrome, and Perl's slides were evaluated. The CD36 expression on hepatocyte plasmatic membrane and cytoplasm was accessed, as well as the plasmatic membrane of the biliary duct. NAS score was applied, with complementary evaluation, including fibrosis and ductular reaction. Statistical analysis were assessed using Student's T-Test and Spearman's Correlation Coefficient.

Results The CD36 immunoreactivity was observed in 65.63% of patients. The more advanced degree of MASH activity was perfectly correlated with CD36 positivity ($p=0.000$), and there was a moderate correlation between MASH activity and CD36 positivity $R\ 0.418$ ($p=0.017$). The presence of interface hepatitis was more frequent in CD36-positive patients ($p=0.001$), and lobular inflammation demonstrated a moderate correlation with the cytoplasmatic expression pattern ($p=0.022$). ALT level was correlated with CD36 positivity in the cytoplasm and the bile duct epithelium ($p=0.002$ and $p=0.005$, respectively). Similarly, AST was correlated with CD36 cytoplasmatic positivity ($p=0.007$).

There was a greater chance of dyslipidemia in CD36-negative patients, corroborated by the negative correlation with CD36-positive expression in the bile duct epithelium ($p=0.045$). Regarding total cholesterol, there was an inverse correlation with CD36 positivity in the cytoplasmatic expression ($p=0.026$).

BMI was higher in CD36-positive patients ($p=0.004$). HDL was lower in CD36-positive patients ($p=0.032$) and average glucose levels, although elevated in both groups, were lower in CD36-positive patients ($p=0.03$). Concerning platelets, although at normal levels in both groups, they were lower (on average) in CD36-positive patients ($p=0.031$). A higher NAS score moderately correlated with CD36 positivity in the cytoplasm ($p=0.028$).

Concerning polysomnography data and OSA, groups were similar in oxygen saturation level, oxygen desaturation index, apnea-hypopnea index, apnea-hypopnea in the supine position, and saturation percentage less than 90% in minutes.

Conclusions CD36 was expressed in patients with a higher BMI index, reinforcing the

relationship between obesity on adiposetissue composition and increased fatty acids with CD36 overexpression. The findings related to OSA were not statistically significant. There was a correlation between CD36-positivity with AST, ALT, NAS score, and inflammation intensity. Thus, this study suggests CD36 can be a biomarker of inflammatory activity and prognosis of MASLD.

Keywords

CD36 Antigens, Obstructive Sleep Apnea, Non-alcoholic Fatty Liver Disease, Oxidative Stress

INTRODUCTION

Lipidic liver accumulation has been reported since the 19th century [1]. The concept of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) came in 1980, based on histological findings [2]. Global prevalence reached 25.24% recently [3]. Liver fibrosis, which raises the risk of cirrhosis and death from liver-related causes [4], was detected in up to 48% of morbidly obese patients submitted to bariatric surgery in Brazil [5].

Recently, NAFLD was renamed fatty liver disease associated with metabolic dysfunction (MAFLD)[6]. This is a review of the term non-alcoholic fatty liver disease, which had been questioned mainly because it did not reflect the disease etiology [7]. Criteria proposed for MAFLD diagnosis were based on evidence of fat liver accumulation in addition to obesity/overweight, type 2 diabetes (T2DM), or metabolic dysregulation evidence. As many advocates, patients felt stigmatized by the words “fatty” and “nonalcoholic”, a consensus renamed MAFLD as metabolic dysfunction–associated steatotic liver disease (MASLD) [8]. This change reflects this common disease pathophysiology and cardiometabolic alterations [9].

The pathophysiology of MASLD is a lot complex and multifactorial [10]. In 1998, the idea of a two-hit event explained the evolution from steatosis to metabolic dysfunction associated steatohepatitis (MASH) [previously known as nonalcoholic steatohepatitis (NASH)] [11]. Recent studies have shown the multiple mechanisms involved in this process, including inflammation, insulin resistance, fatty acids metabolism, mitochondrial dysfunction, altered gene expression, epigenetic modifications, microbiota dysfunction, environmental exposure, and others [12], [13], [14], [15], [16], [17], [18], [19], [20], [21]. Chronic inflammation leads to liver fibrosis by activating the immune system and related events [22]. An important mechanism is fatty acid toxicity. Furthermore, it is well-stabilized that fatty acid toxicity plays a role in inflammation and apoptosis [23]. Among comorbidities, Obstructive sleep apnea (OSA), which leads to chronic intermittenthypoxia (CIH), plays a crucial role, inducing an imbalance between oxidants and antioxidants, which can result in the formation of reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation, and liver damage [24].

Regarding fatty acid metabolism, CD36 is a transmembrane protein that translocates fatty acids into cell cytoplasm [25] and is a signaling molecule involved in

inflammatory response [26]. Increased hepatic CD36 expression may contribute to MASLD [27]. It is already established that CD36 mediates molecular mechanisms involved in hepatocyte activation of oxidative stress [28]. The gene that encodes CD36 protein is overexpressed in MASLD patients [14]. In animal models, the report of induction of hepatic lipid biosynthesis was exacerbated by intermittent hypoxia in obese mice [29]. The CD36 upregulation in the OSA population was studied with immunohistochemical analysis in human patients and was associated with insulin resistance, hyperinsulinemia, and increased steatosis [30]. Given the above, this study aims to analyze automatized immunohistochemistry CD36 expression in liver biopsies from a MASH population submitted to polysomnography and its relationship with clinical conditions associated with MASLD, including apnea.

METHODS

Study Design

Cross-sectional study conducted under the Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) Statement, evaluating CD36 expression through immunohistochemistry.

Study Setting

All participants were recruited from the outpatient clinic in a tertiary hospital in south Brazil, Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA). The recruitment took place between April 2017 and April 2018 for a previous study [31]. Immunohistochemical analysis and the histological review were made between October 2023 and August 2024. The sample was assessed by convenience, including all patients treated at the outpatient clinic during one year of recruitment who met the inclusion criteria and accepted the participation by signing the informed consent form (ICF).

Participants

Inclusion criteria were patients over 18 years old, who met at least one of metabolic syndrome (MS) criteria: systemic arterial hypertension (SAH); obesity; altered serum fast glucose level or T2DM; elevated serum triglycerides or lower levels of high-density lipoprotein (HDL), according to Adult Treatment Panel [32].

Exclusion criteria were the presence of viral hepatitis B or C, autoimmune hepatitis, Wilson's disease, hemochromatosis, primary biliary cholangitis, secondary biliary cirrhosis, or primary sclerosing cholangitis. Patients who took hepatotoxic drugs or drugs that may cause steatosis (corticosteroids, chemotherapy medications, among others), and had alcohol consumption above

30 g/d for male patients and 20 g/d for female patients [33], [34]. Not enough liver tissue available on paraffin block to immunohistochemistry was also an exclusion criterion.

Evaluations and Procedures

Clinical and anthropometric data were collected from the original database following the previous study [31]. The anthropometric data involving BMI waist

circumference were calculated and interpreted according to the following recommendations [35]. Health conditions and habits evaluated involved chronic diseases, medications, and smoking were also collected.

Laboratory tests included ALT and AST levels, total platelet count, total cholesterol, low-density lipoprotein (LDL), HDL, triglycerides, fasting serum glucose, gamma-glutamyl transferase (GGT), C-reactive protein (CRP), ferritin and arterial blood gas. Insulin resistance was estimated by homeostasis model assessment (HOMA-IR) [36]. APRI (AST to Platelet Ratio Index) [37], FIB4 [38], and NAS scores were also assessed [39].

The liver biopsy was preferentially guided by ultrasound using an 18G needle. Exceptional opportunity liver surgical biopsy was also acceptable. The gross evaluation included counting and measuring the received sample. Specimens were formalin-fixed, submitted to histological processing, and stained by hematoxylin-eosin, Perl's, and Masson's trichrome technique for fibrosis evaluation.

All biopsies were analyzed by the same pathologist and 'blinded' to clinical information. Portal spaces were counted in an intermediate magnification objective (10x) (Olympus, CX 33, Tokyo, Japan). The steatosis pattern was evaluated by classifying it into microvesicular, macrovesicular, or mixed patterns. The simple steatosis or MASH classification was based on Kleiner et al. [39]. The NAS score [40] was the algorithm for classifying MASH biopsies. The diagnosis of MASH required the presence of steatosis above 5% associated with hepatocellular ballooning and inflammatory infiltration. Portal and interface chronic inflammation were scored according to Ishak's index [41]. Perl's stain slides surveyed siderosis accumulation. Fibrosis was classified using Masson's trichrome [39]. For the statistical analysis, fibrosis was classified as mild (1a, 1b, or 1c) or moderate to severe (2, 3, or 4).

Paraffin-embedded extra sections were submitted to total automatized CD36 immunostaining Benchmark Ultra from Ventana. The protocol was adjusted using recent studies for other purposes [42], [43]. Antibody validation was carried out with normal and mature adipose tissue, non-steatotic liver from non-neoplastic tissue of a metastatic colon carcinoma without chemotherapy, and MASH biopsy from bariatric surgery liver sampling. The standard antigen retrieval method is Heat Induced Epitope Retrieval (HIER) in Tris-EDTA buffer pH 7.8 at 95°C for 64 minutes (standard cell conditioning solution - CC1) and one hour from the primary antibody (clone EPR6573, 1:100 dilution, Abcam) on four mm-thick sections, counterstained in hematoxylin, using adipose normal tissue and NASH as positive controls. Hepatocyte membrane, cytoplasm, and biliary duct positive expression were evaluated in all surface sections using a high magnification objective (40x)

(Olympus, CX 33, Tokyo, Japan). Additionally, expression intensity was noted based on well-established methods [44].

For statistical analysis, positive CD36 overexpression was considered diffusely with moderate or strong intensity. Mild or focal expressions were considered negative, as normal liver tissue expresses CD36 weakly [45]. Subjects were divided into two groups using the CD36 overexpression as a reference. Light microscopy micrographs were captured by a Videocam Olympus SC50 connected to an Olympus CX 33 light microscope and

processed with the CellSens 2.3 Image Analysis System (Olympus, Tokyo, Japan).

All patients were evaluated before polysomnography with the Pittsburgh Sleep Quality Index (a questionnaire validated in Brazilian Portuguese in 2008) [46]. Polysomnography was performed with a StarDust II portable sleep recorder (Respironics, MNc, Murrysville, Pennsylvania, USA). All polysomnography exams were executed in the Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA) sleep laboratory and interpreted by the same pulmonologist. OSA is an airflow reduction of more than 90% associated with persistent respiratory movements. Hypopnea corresponds to partial airflow closure, with a decrease of 30% or more from baseline and oxygen desaturation of more than 3% from baseline [47], [48]. OSA was classified under specific guidelines [49].

Ethical Aspects

The original project was approved by the ISCMPA Research Ethics Committee (approval letter 1971.946) in March 2017, and the new analyses by the same ethics committee in July 2024 (approval letter 6.072.041). Volunteers read and signed the Informed Consent Form. The entire research was conducted following Resolution 196/96 of the National Health Council (Brazil) and adhered to the principles of the Declaration of Helsinki for research involving human subjects. Data were processed following the General Data Protection Law (Brazilian Law N° 13.709/2018).

Statistical Analysis

The description of qualitative variables was expressed in absolute and relative frequency. The results of the quantitative variables are presented in mean and standard deviation (SD). Data were tested for normality using Shapiro-Wilk's test. Comparisons between groups were assessed using Student's T-Test for independent samples, and the correlations were evaluated by Spearman's Correlation Coefficient (rS). The p-value 1 0.05 was adopted as significant, and the rS was accepted as low when 0.1-0.29, moderate when 0.3-0.59, strong when 0.6- 0.89, and very strong when 1 0.9. The analysis was performed in the statistical software SPSS (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 18.0, IBM Corp., Armonk, USA).

RESULTS

Of the original 61 individuals recruited, six refused polysomnography, and four did not undergo liver biopsies. Furthermore, in 19 cases, there was not enough tissue to perform immunostaining. Then, thirty-two patients had both polysomnography and liver biopsytissue available and were analyzed.

Sample characterization data, including continuous and categorical data, are presented in Tables 1.1 and 1.2, respectively. Of all 32 patients, the majority were male, and the median age was around 57. BMI index mean was 32.9 kg/m². All of them presented MS, and 81.25% had visceral obesity. Over 70% of patients had TDM2, the same with SAH. Dyslipidemia was found in 65.63% of the total of patients. The predominance of nonsmokers was 56.25%. The mean total cholesterol was 193.25 mg/dL, with a 52.2 mg/dL HDL fraction and 105.9 mg/dL LDL fraction. The triglyceride mean was 170 mg/dL, and the

serum fastglucose mean was 135.5 mg/dL. The ALT mean was 35.68 U/L, and AST was 29.43 U/L. The serum platelets mean was 251.344 μ L $\pm$ 82.009. Eleven individuals had no apnea/hypopnea, corresponding to 34.38% of the patients; 46.8% of the total sample had mild apnea/hypopnea. Six subjects had moderate or severe apnea/hypopnea.

The CD36 immunoreactivity was observed in 21 of 32 patients. In Table 1.1, it is observed that the BMI was higher in CD36-positive patients ($p=0.004$). Regarding HDL, it was lower in CD36-positive patients ($p=0.032$). Although elevated in both groups, the average glucose levels were lower in CD36-positive patients ($p=0.03$). Platelets, albeit at normal levels in both groups, were lower (on average) in CD36-positive patients ($p=0.031$).

ALT and AST were similar between groups ($p=0.084$ and $p=0.092$ respectively). Insulin, alkaline phosphatase (AP), gamma-glutamyl transferase (GGT), triglycerides, RCP, and serum ferritin were not different statistically between CD 36-positive and CD36-negative groups. FIB-4 and APRI evaluations were very similar between groups ($p=0.988$ for both variables).

One of the 32 patients was submitted for surgical biopsy, and 31 for needle biopsy. The number of fragments median was three. The median length was 13.5 millimeters, and the median number of portal spaces per sample was 13. Steatosis was observed in all the samples. From the total, 50% of the patients had severe steatosis. All of them presented MASH. Steatohepatitis activity grade was moderate or severe in 25% of patients. Portal inflammation was a common finding (84.37% of the subjects), and most of the sample had mild portal inflammation (68.75%). Lobular inflammation was found in 90.62% of the sample and interface hepatitis in 25%. Siderosis was diagnosed in 18.75% of the total sample. Liver fibrosis was found in 78.13% of the patients, and 46.88% presented moderate or severe grade.

Ductular reaction was found in 62.5% of the total sample, and glycogenic nuclear vacuolation in 56.25%.

In Table 1.2, it is visible that there was a greater chance of dyslipidemia occurrence in CD36-negative patients, which is corroborated by the negative correlation with CD36 in the bile duct epithelium ($p=0.045$) in Table 2. The more advanced degree of MASH activity was correlated with CD36 positivity ($p=0.000$) in Table 1.2. This finding is supported by the moderate correlation between MASH activity and CD36 positivity (Table 2). The presence of interface hepatitis was surprisingly ordinary and was noteworthy more frequent in CD36-positive patients ($p=0.001$), table 1.2. On the other hand, the presence of fibrosis ($p=0.326$) and even the grade ($p=0.422$) have shown no correlation between both groups.

The lobular inflammation ($p=0.835$), portal inflammation ($p=0.067$), and inflammatory infiltrate pattern ($p=0.558$) were not different between groups. The steatosis score was also similar between groups ($p=0.185$), as well as other histological findings, including nuclear glycogenic vacuolization ($p=0.246$), siderosis ($p=0.103$), and ductular reaction ($p=0.162$) (table 1.2). Histological and immunohistochemistry findings are demonstrated in Figure 1.

Concerning polysomnography data and OSA (tables 1.1 and 1.2), groups were similar in: oxygen saturation level ($p=0.584$), oxygen desaturation index ($p=0.053$),

apnea-hypopnea index ($p=0.349$), apnea-hypopnea in the supine position ($p=0.278$), and saturation percentage less than 90% in minutes ($p=0.931$).

Table 2 shows only the statistically significant correlations. It can be observed that there is a moderate correlation between elevated ALT levels and CD36 positivity in the cytoplasm and the bile duct epithelium ($p=0.002$ and $p=0.005$, respectively). Similarly, AST was correlated with CD36 cytoplasmatic positivity ($p=0.007$). Regarding total cholesterol, there was an inverse correlation with CD36 positivity in the cytoplasmatic expression ($p=0.026$). A higher NAFLD score showed a moderate correlation with CD36 positivity in the cytoplasm ($p=0.028$). Finally, lobular inflammation moderately correlated with the same expression pattern ($p=0.022$).

DISCUSSION

To the best of our knowledge, this is the first article that correlates automatized CD36 expression and the histology of MASLD. The demonstration that the severity of inflammatory activity was more frequent in CD36-positive patients is an important finding. The persistent inflammatory activity over time results in chronic inflammation that deteriorates tissue injury and contributes to MASH development [19]. MASLD is associated with peripheral lipolysis and consequent influx of free fatty acids to the liver. The metabolism of CD36 causes liver damage [50].

The statistically significantly high BMI in the CD36-positive group reinforces the idea of the impact of obesity on adipose tissue composition. Alterations in cell type populations and changes in gene expression profiles of the adipose tissue already published [51] may explain oxidative stress activation in this group of patients. On the other hand, the frequency of dyslipidemia was superior in the CD36-negative group of patients. As it is hypothetical that CD36 has a major role in coordinating cellular uptake and processing fatty acids [52], it is no longer a surprise that patients who do not express CD36 will present dyslipidemia, as the liver may fail to store those molecules adequately. This capacity to adequately store fatty acids inside hepatocytes and in adipose peripheral tissue, as well, may be correlated to lower serum levels of these substances.

The liver determines the cholesterol circulating concentration by activating or suppressing genes responsible for restoring hepatic cholesterol content. Three major routes are responsible for coordinating this process. The synthesis increases through the stimulation of multiple enzymes. The production of more (or less) hepatic LDL cholesterol receptors, whose activity determines the rates of cholesterol uptake (as LDL) from the blood. Finally, modify excrete free cholesterol into the biliary system to alter the hepatic cholesterol content. These feedback functions change to keep the hepatic cholesterol level relatively constant [53]. The elevated HDL in CD36-negative patients reflects and confirms the importance of this ligand in cholesterol liver metabolism.

Shirakawa and colleagues demonstrate that chronic exposure to high concentrations of glucose and free fatty acids in the blood affects pancreatic B-cell function, lipid synthesis in the liver, and lipid storage in adipose tissue [54]. Experimental data have also shown that hyperglycemia may have a regulatory effect on CD36 expression [26]. The finding of a higher fast glucose serum in the CD36- negative group probably reflects this modulation mechanism.

Despite the significant difference between the CD36-positive group and the negative on the BMI, correlation analysis showed only a tendency to significance between BMI and CD-36 membrane expression ($p=0.599$) and in biliary duct membrane expression ($p=0.052$). Conversely, dyslipidemia correlated negatively with the biliary duct CD36-positive expression. This interesting finding should lead to the idea that there must be an additional alteration to activate free fatty acid storage and the CD36 via, with consequent immunohistochemical expression. It is important to look for these mechanisms as inflammation, obesity, and MASH are involved even in carcinogenesis, especially in biliary neoplasms [55]. Considering all evolution in recent studies, perhaps in the short future, drugs that can bind CD36

ligand or regulate its function [56] can be used to avoid all oxidative cascade and reduce its consequences, including MASH [57], insulin resistance [30], and atherosclerosis [58], as well as neoplasms and metastasis in some cancer types [59].

Lipotoxic lipid species derived from the excess of fatty acids in hepatocytes mediate cellular injury, with MASH and liver fibrosis as consequences [23] and even apoptosis [60]. Not only fatty acids, however, play a role in the evolution of MASLD from MASH. Experimental models have already proved that platelet recruitment, mediated by Kupffer cells, plays a role in this pathophysiological condition [61]. Despite that, the same article did not show serum platelet level alteration in animal models. Our data show a statistically significant difference in serum platelet levels between the CD36-positive and negative groups. CD36 is known to be expressed in platelets [59], reinforcing the active role of this cell in liver damage [62]. Platelet consumption in advanced liver disease is a common finding [63] and has proved to be an independent risk factor for progression from MASLD to MASH [64]. The CD36-positive group probably reflects a severe liver damage population.

Interface hepatitis is characterized by the extension of portal inflammation beyond the limiting plate into the adjacent lobule with damage and progressive loss of hepatocytes at the portal-lobular interface. It is a common finding in autoimmune hepatitis [65]. The unexpected finding of interface hepatitis statistically significantly different between groups is very intriguing and certainly needs further investigation. The macrophage's role in MASH [50] and even lymphocyte response [13] combined may contribute to this phenomenon. Association with CD68, interleukins, and CK18 [66] to identify cell damage could contribute to widening the understanding of those mechanisms. Gene [67], [68] and protein [64] expression are vital to a complete comprehensive of pathophysiology, together with the histological and immunohistochemical aspects. All these tools combined would bring better data. Further investigation is essential to explain better the interface hepatitis results.

The correlation with OSA in animal model previously [69] was not found in our study. Differences in immunostaining methods may be one of the main dissemblances between each other and the small sample with apnea in the present study. In contrast, the O₂ desaturation index shows a tendency to correlate. OSA is already described as a risk factor for MASLD [31], [70]. The increase in reactive oxygen species (ROS) production occurs in hypoxemia states, leading to cell damage and increasing disease severity [24], [31], [47].

As a limitation of this study, this is a retrospective study with a relatively small

sample. However, this research is at the forefront of this topic and should be understood as a baseline. Further investigation with larger samples and different designs (longitudinal and/or experimental) should be conducted to deepen these findings. Despite numerically higher levels of indirect inflammatory markers in the CD36-positive group, such as ferritin and CRP, no statistical difference could corroborate that evidence.

The idea of using immunohistochemistry to evaluate CD36 expression emerged because it is more accessible and inexpensive than polymerase chain reactions (PCR) methods, considering that CD36 altered gene expression has already been demonstrated in the MASH population [30]. Still, other ancillary studies, such as immunofluorescence [26], and immunoelectron microscopy [17] demand fresh tissue samples, usually not available in our daily practice, even as cell culture [71].

About twenty years ago, the role of fatty acids uptake by the cluster of differentiation 36 (CD36) was described [72] as an analog to fatty acid translocase (FAT) in mouse models. Until now, from our knowledge, this is the first time automatized CD36 immunoreactivity in MASH human patients submitted to polysomnography was evaluated. Few studies focused on CD36 liver expression, and we couldn't find any automatized immunohistochemistry demonstration on NAFLD liver biopsies CD36.

In conclusion, this study showed CD36 was expressed in patients with a higher BMI index, reinforcing the relationship between obesity on adipose tissue composition and increased fatty acids with CD36 overexpression. There was also a correlation between CD36-positivity with AST, ALT, NAS score, and inflammation intensity. The findings related to OSA were not statistically significant. Thus, this study suggests CD36 can be a biomarker of inflammatory activity and prognosis of MASLD.

No funding was received for this study.

REFERENCES

- [1] O. T. Ayonrinde, "Historical narrative from fatty liver in the nineteenth century to contemporary NAFLD – Reconciling the present with the past," Jun. 01, 2021, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.jhepr.2021.100261.
- [2] J. Ludwig, T. R. Viggiano, D. B. McGill, and B. J. Oh, "Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease.," *Mayo Clin Proc*, vol. 55, no. 7, pp. 434–8, Jul. 1980.
- [3] Z. M. Younossi, P. Golabi, J. M. Paik, A. Henry, C. Van Dongen, and L. Henry, "The global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH): a systematic review," *Hepatology*, vol. 77, no. 4, pp. 1335–1347, Apr. 2023, doi: 10.1097/HEP.0000000000000004.
- [4] E. Vilar-Gomez *et al.*, "Fibrosis Severity as a Determinant of Cause-Specific Mortality in Patients With Advanced Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Multi-National Cohort Study," *Gastroenterology*, vol. 155, no. 2, pp. 443– 457.e17, Aug. 2018, doi:

10.1053/j.gastro.2018.04.034.

- [5] A. Losekann *et al.*, “Non-alcoholic steatohepatitis (NASH): Risk factors in morbidly obese patients,” *Int J Mol Sci*, vol. 16, no. 10, pp. 25552–25559, Oct. 2015, doi: 10.3390/ijms161025552.
- [6] M. Eslam *et al.*, “MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease,” *Gastroenterology*, vol. 158, no. 7, pp. 1999-2014.e1, May 2020, doi: 10.1053/j.gastro.2019.11.312.
- [7] M. Eslam, A. J. Sanyal, and J. George, “Toward More Accurate Nomenclature for Fatty Liver Diseases,” Sep. 01, 2019, *W.B. Saunders*. doi: 10.1053/j.gastro.2019.05.064.
- [8] M. E. Rinella *et al.*, “A multisociety Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature,” *J Hepatol*, vol. 79, no. 6, pp. 1542–1556, Dec. 2023, doi: 10.1016/j.jhep.2023.06.003.
- [9] J. Bilson, A. Mantovani, C. D. Byrne, and G. Targher, “Steatotic liver disease, MASLD and risk of chronic kidney disease,” Jan. 01, 2024, *Elsevier Masson s.r.l.* doi: 10.1016/j.diabet.2023.101506.
- [10] E. Martinou, M. Pericleous, I. Stefanova, V. Kaur, and A. M. Angelidi, “Diagnostic Modalities of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: From Biochemical Biomarkers to Multi-Omics Non-Invasive Approaches,” *Diagnostics*, vol. 12, no. 2, Feb. 2022, doi: 10.3390/diagnostics12020407.
- [11] C. P. Day and O. F. W. James, “Steatohepatitis: A Tale of Two ‘Hits’?,” *Gastroenterology*, vol. 114, no. 842, pp. 842–845, Apr. 1998.
- [12] A. Berson *et al.*, “Steatohepatitis-Inducing Drugs Cause Mitochondrial Dysfunction and Lipid Peroxidation in Rat Hepatocytes.”
- [13] J. J. Maher, P. Leon, and J. C. Ryan, “Beyond insulin resistance: Innate immunity in nonalcoholic steatohepatitis,” Aug. 2008. doi: 10.1002/hep.22399.
- [14] D. Greco *et al.*, “Gene expression in human NAFLD,” *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol. 294, pp. 1281–1287, 2008, doi: 10.1152/ajpgi.00074.2008.-Despite.
- [15] H. Doege *et al.*, “Silencing of hepatic fatty acid transporter protein 5 in vivo reverses diet-induced non-alcoholic fatty liver disease and improves hyperglycemia,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 32, pp. 22186– 22192, Aug. 2008, doi: 10.1074/jbc.M803510200.
- [16] H. Mitsuyoshi *et al.*, “Analysis of hepatic genes involved in the metabolism of fatty acids and iron in nonalcoholic fatty liver disease,” *Hepatology Research*, vol. 39, no. 4, pp. 366–373, 2009, doi: 10.1111/j.1872- 034X.2008.00464.x.

- [17] A. Falcon *et al.*, “FATP2 is a hepatic fatty acid transporter and peroxisomal very long-chain acyl-CoA synthetase,” *Am J Physiol Endocrinol Metab*, vol. 299, no. 3, Sep. 2010, doi: 10.1152/ajpendo.00226.2010.
- [18] R. C. Harmon, D. G. Tiniakos, and C. K. Argo, “Inflammation in nonalcoholic steatohepatitis,” *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, vol. 5, no. 2, pp. 189– 200, Apr. 2011, doi: 10.1586/egh.11.21.
- [19] S. Schuster, D. Cabrera, M. Arrese, and A. E. Feldstein, “Triggering and resolution of inflammation in NASH,” Jun. 01, 2018, *Nature Publishing Group*. doi: 10.1038/s41575-018-0009-6.
- [20] Y. Geng, K. N. Faber, V. E. de Meijer, H. Blokzijl, and H. Moshage, “How does hepatic lipid accumulation lead to lipotoxicity in non-alcoholic fatty liver disease?,” Feb. 01, 2021, *Springer*. doi: 10.1007/s12072-020-10121-2.
- [21] O. Juanola, S. Martínez-López, R. Francés, and I. Gómez-Hurtado, “Non- alcoholic fatty liver disease: Metabolic, genetic, epigenetic and environmental risk factors,” May 02, 2021, *MDPI*. doi: 10.3390/ijerph18105227.
- [22] Y. Koyama and D. A. Brenner, “Liver inflammation and fibrosis,” Jan. 03, 2017, *American Society for Clinical Investigation*. doi: 10.1172/JCI88881.
- [23] E. M. Brunt *et al.*, “Nonalcoholic fatty liver disease,” *Nat Rev Dis Primers*, vol. 1, Dec. 2015, doi: 10.1038/nrdp.2015.80.
- [24] P. G. Meliante *et al.*, “Molecular Pathology, Oxidative Stress, and Biomarkers in Obstructive Sleep Apnea,” Mar. 01, 2023, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/ijms24065478.
- [25] X. Su and N. A. Abumrad, “Cellular fatty acid uptake: a pathway under construction,” *Trends in Endocrinology & Metabolism*, vol. 20, no. 2, pp. 72– 77, Mar. 2009, doi: 10.1016/j.tem.2008.11.001.
- [26] B. Han, J. Wang, J. Wu, F. Yan, Y. Wang, and J. Li, “High glucose-induced upregulation of CD36 promotes inflammation stress via NF-κB in H9c2 cells,” *Mol Med Rep*, vol. 24, no. 5, Nov. 2021, doi: 10.3892/mmr.2021.12404.
- [27] J. He, J. H. Lee, M. Febbraio, and W. Xie, “The emerging roles of fatty acid translocase/CD36 and the aryl hydrocarbon receptor in fatty liver disease,” Oct. 2011. doi: 10.1258/ebm.2011.011128.
- [28] J. Liu *et al.*, “Long-chain fatty acid activates hepatocytes through CD36 mediated oxidative stress,” *Lipids Health Dis*, vol. 17, no. 1, Jul. 2018, doi: 10.1186/s12944-018-0790-9.
- [29] J. Li *et al.*, “Chronic intermittent hypoxia upregulates genes of lipid biosynthesis in obese mice,” *J Appl Physiol*, vol. 99, no. 5, pp. 1643–1648, Nov. 2005, doi:

10.1152/japplphysiol.00522.2005.

- [30] M. E. Miquilena-Colina *et al.*, “Hepatic fatty acid translocase CD36 upregulation is associated with insulin resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C,” *Gut*, vol. 60, no. 10, pp. 1394–1402, Oct. 2011, doi: 10.1136/gut.2010.222844.
- [31] G. K. Krolow, E. Garcia, F. Schoor, F. B. S. Araujo, and G. P. Coral, “Obstructive sleep apnea and severity of nonalcoholic fatty liver disease,” *Eur J Gastroenterol Hepatol*, vol. 33, no. 8, pp. 1104–1109, Aug. 2021, doi: 10.1097/MEG.0000000000001920.
- [32] E. and T. of H. B. C. in A. Expert Panel on Detection, “Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III),” *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, vol. 285, no. 19, pp. 2486–2497, May 2001, doi: 10.1001/jama.285.19.2486.
- [33] N. Chalasani *et al.*, “The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases,” *Hepatology*, vol. 67, no. 1, pp. 328–357, Jan. 2018, doi: 10.1002/hep.29367.
- [34] B. J. Perumpail, M. A. Khan, E. R. Yoo, G. Cholankeril, D. Kim, and A. Ahmed, “Clinical epidemiology and disease burden of nonalcoholic fatty liver disease,” *World J Gastroenterol*, vol. 23, no. 47, pp. 8263–8276, Dec. 2017, doi: 10.3748/wjg.v23.i47.8263.
- [35] C. E. Ndumele *et al.*, “A Synopsis of the Evidence for the Science and Clinical Management of Cardiovascular-Kidney-Metabolic (CKM) Syndrome: A Scientific Statement From the American Heart Association,” *Circulation*, vol. 148, no. 20, pp. 1636–1664, Nov. 2023, doi: 10.1161/CIR.0000000000001186.
- [36] D. R. Matthews, J. P. Hosker, A. S. Rudenski, B. A. Naylor, D. F. Treacher, and R. C. Turner, “Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta- cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man,” *Diabetologia*, vol. 28, no. 7, pp. 412–419, Jul. 1985, doi: 10.1007/BF00280883.
- [37] C.-T. Wai *et al.*, “A Simple Noninvasive Index Can Predict Both Significant Fibrosis and Cirrhosis in Patients With Chronic Hepatitis C,” *Hepatology*, vol. 38, no. 2, pp. 518–526, Aug. 2003, doi: 10.1053/jhep.2003.50346.
- [38] R. K. Sterling *et al.*, “Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection,” *Hepatology*, vol. 43, no. 6, pp. 1317–1325, Jun. 2006, doi: 10.1002/hep.21178.
- [39] D. E. Kleiner *et al.*, “Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease,” *Hepatology*, vol. 41, no. 6, pp. 1313–1321, Jun. 2005, doi: 10.1002/hep.20701.

- [40] E. M. Brunt, C. G. Janney, A. M. Di Bisceglie, B. A. Neuschwander-Tetri, and B. R. Bacon, "Nonalcoholic Steatohepatitis: A Proposal for Grading and Staging The Histological Lesions," *American Journal of Gastroenterology*, vol. 94, no. 9, pp. 2467–2474, Sep. 1999, doi: 10.1111/j.1572-0241.1999.01377.x.
- [41] K. Ishak *et al.*, "Histological grading and staging of chronic hepatitis," *J Hepatol*, vol. 22, no. 6, pp. 696–699, Jun. 1995, doi: 10.1016/0168-8278(95)80226-6.
- [42] S. Haidari *et al.*, "Fatty Acid Receptor CD36 Functions as a Surrogate Parameter for Lymph Node Metastasis in Oral Squamous Cell Carcinoma," *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 16, p. 4125, Aug. 2021, doi: 10.3390/cancers13164125.
- [43] J. C. Pardo *et al.*, "Prognostic Impact of CD36 Immunohistochemical Expression in Patients with Muscle-Invasive Bladder Cancer Treated with Cystectomy and Adjuvant Chemotherapy," *J Clin Med*, vol. 11, no. 3, p. 497, Jan. 2022, doi: 10.3390/jcm11030497.
- [44] J. M. Harvey, G. M. Clark, C. K. Osborne, and D. C. Allred, "Estrogen Receptor Status by Immunohistochemistry Is Superior to the Ligand-Binding Assay for Predicting Response to Adjuvant Endocrine Therapy in Breast Cancer," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 17, no. 5, pp. 1474–1474, May 1999, doi: 10.1200/JCO.1999.17.5.1474.
- [45] E. Rey *et al.*, "Hypoxia-inducible factor 2 α drives hepatosteatosis through the fatty acid translocase CD36," *Liver International*, vol. 40, no. 10, pp. 2553–2567, Oct. 2020, doi: 10.1111/liv.14519.
- [46] A. N. Bertolazi *et al.*, "Validation of the Brazilian Portuguese version of the Pittsburgh Sleep Quality Index," *Sleep Med*, vol. 12, no. 1, pp. 70–75, Jan. 2011, doi: 10.1016/j.sleep.2010.04.020.
- [47] P. Lévy *et al.*, "Obstructive sleep apnoea syndrome," *Nat Rev Dis Primers*, vol. 1, Jun. 2015, doi: 10.1038/nrdp.2015.15.
- [48] R. B. Berry *et al.*, "Rules for Scoring Respiratory Events in Sleep: Update of the 2007 AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events," *Journal of Clinical Sleep Medicine*, vol. 08, no. 05, pp. 597–619, Oct. 2012, doi: 10.5664/jcsm.2172.
- [49] V. K. Kapur *et al.*, "Clinical Practice Guideline for Diagnostic Testing for Adult Obstructive Sleep Apnea: An American Academy of Sleep Medicine Clinical Practice Guideline," *Journal of Clinical Sleep Medicine*, vol. 13, no. 03, pp. 479–504, Mar. 2017, doi: 10.5664/jcsm.6506.
- [50] K. Kazankov *et al.*, "The role of macrophages in nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis," Mar. 01, 2019, *Nature Publishing Group*. doi: 10.1038/s41575-018-0082-x.
- [51] D. J. Duerre and A. Galmozzi, "Deconstructing Adipose Tissue Heterogeneity One Cell at

a Time,” Mar. 25, 2022, *Frontiers Media S.A.* doi: 10.3389/fendo.2022.847291.

- [52] M. Y. Pepino, O. Kuda, D. Samovski, and N. A. Abumrad, “Structure-Function of CD36 and Importance of Fatty Acid Signal Transduction in Fat Metabolism,” *Annu Rev Nutr*, vol. 34, no. 1, pp. 281–303, Jul. 2014, doi: 10.1146/annurev-nutr-071812-161220.
- [53] D. S. Schade, L. Shey, and R. P. Eaton, “Cholesterol Review: A Metabolically Important Molecule,” *Endocrine Practice*, vol. 26, no. 12, pp. 1514–1523, Dec. 2020, doi: 10.4158/EP-2020-0347.
- [54] J. Shirakawa *et al.*, “Diet-Induced Adipose Tissue Inflammation and Liver Steatosis Are Prevented by DPP-4 Inhibition in Diabetic Mice,” *Diabetes*, vol. 60, no. 4, pp. 1246–1257, Apr. 2011, doi: 10.2337/db10-1338.
- [55] P. L. Labib, G. Goodchild, and S. P. Pereira, “Molecular Pathogenesis of Cholangiocarcinoma,” *BMC Cancer*, vol. 19, no. 1, p. 185, Dec. 2019, doi: 10.1186/s12885-019-5391-0.
- [56] L. Zhao *et al.*, “CD36 palmitoylation disrupts free fatty acid metabolism and promotes tissue inflammation in non-alcoholic steatohepatitis,” *J Hepatol*, vol. 69, no. 3, pp. 705–717, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.jhep.2018.04.006.
- [57] F. Sheedfar *et al.*, “Increased hepatic CD36 expression with age is associated with enhanced susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease,” 2014. [Online]. Available: www.impactaging.com
- [58] M. Yang and R. L. Silverstein, “CD36 signaling in vascular redox stress,” May 20, 2019, *Elsevier Inc.* doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.02.021.
- [59] X. Zhou, M. Su, J. Lu, D. Li, X. Niu, and Y. Wang, “CD36: The Bridge between Lipids and Tumors,” Jan. 01, 2024, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/molecules29020531.
- [60] P. Rada, Á. González-Rodríguez, C. García-Monzón, and Á. M. Valverde, “Understanding lipotoxicity in NAFLD pathogenesis: is CD36 a key driver?,” Sep. 01, 2020, *Springer Nature*. doi: 10.1038/s41419-020-03003-w.
- [61] M. Malehmir *et al.*, “Platelet GPIIb/IIIa is a mediator and potential interventional target for NASH and subsequent liver cancer,” *Nat Med*, vol. 25, no. 4, pp. 641–655, Apr. 2019, doi: 10.1038/s41591-019-0379-5.
- [62] M. Iannacone *et al.*, “Platelets mediate cytotoxic T lymphocyte-induced liver damage,” *Nat Med*, vol. 11, no. 11, pp. 1167–1169, Nov. 2005, doi: 10.1038/nm1317.
- [63] J. Wang *et al.*, “Platelets in Alcohol-Associated Liver Disease: Interaction With Neutrophils,” *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, vol. 18, no. 1, pp. 41–52, 2024, doi: 10.1016/j.jcmgh.2024.03.001.

- [64] K. Kozumi *et al.*, “Transcriptomics Identify Thrombospondin-2 as a Biomarker for NASH and Advanced Liver Fibrosis,” *Hepatology*, vol. 74, no. 5, pp. 2452–2466, Nov. 2021, doi: 10.1002/hep.31995.
- [65] C. Covelli *et al.*, “Pathology of autoimmune hepatitis,” *Pathologica*, vol. 113, no. 3, pp. 185–193, Jun. 2021, doi: 10.32074/1591-951X-241.
- [66] C. Lackner, M. Gogg-Kamerer, K. Zatloukal, C. Stumptner, E. M. Brunt, and H. Denk, “Ballooned hepatocytes in steatohepatitis: the value of keratin immunohistochemistry for diagnosis,” *J Hepatol*, vol. 48, no. 5, pp. 821–8, May 2008, doi: 10.1016/j.jhep.2008.01.026.
- [67] Y. L. Liu *et al.*, “Carriage of the PNPLA3 rs738409 C >G polymorphism confers an increased risk of non-alcoholic fatty liver disease associated hepatocellular carcinoma,” *J Hepatol*, vol. 61, no. 1, pp. 75–81, Jul. 2014, doi: 10.1016/j.jhep.2014.02.030.
- [68] G. Carpino *et al.*, “PNPLA3 variant and portal/periportal histological pattern in patients with biopsy-proven non-alcoholic fatty liver disease: a possible role for oxidative stress,” *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, p. 15756, Nov. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-15943-z.
- [69] E. Rey *et al.*, “Intrahepatic Expression of Fatty Acid Translocase CD36 Is Increased in Obstructive Sleep Apnea,” *Front Med (Lausanne)*, vol. 7, Aug. 2020, doi: 10.3389/fmed.2020.00450.
- [70] Q.-C. Lin *et al.*, “Association between nocturnal hypoxia and liver injury in the setting of nonalcoholic fatty liver disease,” *Sleep and Breathing*, vol. 19, no. 1, pp. 273–280, Mar. 2015, doi: 10.1007/s11325-014-1008-7.
- [71] A. E. Loneker *et al.*, “Lipid droplets are intracellular mechanical stressors that impair hepatocyte function,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 120, no. 16, Apr. 2023, doi: 10.1073/pnas.2216811120.
- [72] N. A. Abumrad, M. R. el-Maghrabi, E. Z. Amri, E. Lopez, and P. A. Grimaldi, “Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36,” *J Biol Chem*, vol. 268, no. 24, pp. 17665–8, Aug. 1993.

Tables and Figures

Table 1.1. Sample characterization data: continuous data

Continuous Variables	Total Sample n=32/ 100%	Antibody CD36		p
		Negative n=11/ 34.38%	Positive n=21/ 65.63%	
Mean±SD				
Age, Years	57.375±8.099	55.727±9.35	58.238±7.463	.940
BMI, Kg/m ²	32.911±5.812	32.291±4.621	33.235±6.431	.004*
ALT, U/L	35.688±21.438	27±10.835	40.238±24.298	.084
AST, U/L	29.438±11.004	25.182±6.4	31.667±12.33	.092
Chol. Total, mg/dL	193.250±41.978	212.636±36.065	183.095±42.025	.777
Chol. HDL, mg/dL	52.281±21.421	60.273±33.941	48.095±9.038	.032*
Chol. LDL, mg/dL	105.906±36.171	113.273±35.702	102.048±36.676	.908
Triglycerides, mg/dL	170.063±61.468	196.455±75.553	156.238±49.178	.113
Glucose, mg/dL	135.531±58.937	152.273±74.173	126.762±48.972	.030*
Insuline, U/mL	18.426±13.115	19.273±15.551	17.960±11.986	.432
CRP, mg/dL	7.024±5.483	6.936±4.42	7.07±6.068	.136
Ferritine, ng/mL	178.969±191.992	154.273±157.986	191.905±210.104	.136
Platelets, mil/uL	251.344±82.009	285±112.932	233.714±55.663	.031*
GGT, U/L	69.344±58.729	55.909±49.266	76.381±63.097	.510
AP, U/L	78.375±38.547	82.818±41.373	76.048±37.824	.830
NAFLD	1.469±.507	1.455±.522	1.476±.512	.814
FIB-4	1.410±.631	1.286±.525	1.475±.683	.988
APRI	.379±.184	0.294±.122	.423±.198	.988
O2 Saturation, %	.975±.013	.973±.012	.977±.013	.584
O2 desaturation index	12.113±16.517	8.163±5.197	13.413±19.151	.053
AHI in supine position	18.550±18.811	11.791±11.465	22.09±21.083	.278
Sat. Time <90% m	11.781±27.577	12.091±23.737	11.619±29.949	.931

Legend: SD: standard deviation; n: total sample; %: relative sample; CD36: cluster of differentiation 36; p: Student's T-test for independent samples; *Statistically significant difference; BMI: body mass index; ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; Chol.: cholesterol; HDL: high-density lipoproteins; LDL: low-density lipoproteins; CRP: C-reactive protein; GGT: gamma-glutyl transferase; AP: alkaline phosphatase; NAFLD: nonalcoholic fatty liver disease score; FIB-4: fibrosis-4 score; APRI: AST-to-platelet ratio index; O2: oxygen; AHI: apnea/hypopnea index; Sat.: saturation; m: minutes.

Table 1.2. Sample characterization data: categoric data

Categoric variables n (%)	Total Sample n=32/ 100%	Antibody CD36 Negative n=11/ 34.38%	Antibody CD36 Positive n=21/ 65.63%	p
Gender, male	18 (56.25)	7 (63.64)	11 (52.38)	.246
SAH	25 (78.13)	8 (72.73)	17 (80.95)	.326
DM	23 (71.88)	9 (81.82)	14 (66.67)	.056
Dyslipidemia	21 (65.63)	9 (81.82)	12 (57.14)	.003*
MS	32 (100)	11 (100)	21 (100)	-.1
Non-Smoker	18 (56.25)	6 (54.55)	12 (57.14)	1.000
Visceral obesity	26 (81.25)	9 (81.82)	17 (80.95)	.908
Steatosis Score				.185
Mild	6 (18.75)	1 (9.09)	5 (23.81)	
Moderate	10 (31.25)	5 (45.45)	5 (23.81)	
Severe	16 (50)	5 (45.45)	11 (52.38)	
Degree of MASH				.000*
Mild	24 (75)	11 (100)	13 (61.9)	
Moderate/Severe	8 (25)	-	8 (38.1)	
Portal Inflammation				.067
Mild	22 (68.75)	8 (72.73)	14 (66.67)	
Moderate	4 (12.5)	-	4 (19.05)	
Severe	1 (3.13)	-	1 (4.76)	
Absent	5 (15.63)	3 (27.27)	2 (9.52)	
Lobular Inflammation				.835
Mild	21 (65.63)	8 (72.73)	13 (61.90)	
Moderate	8 (25.00)	2 (18.18)	6 (28.57)	
Absent	3 (9.38)	1 (9.09)	2 (9.52)	
Interface Hepatitis	8 (25)	1 (9.09)	7 (33.33)	.001*
Inflammatory Infiltrate				.558
Type				
Lymphomononuclear	9 (28.13)	4 (36.36)	5 (23.81)	
Mixed	20 (62.5)	6 (54.55)	14 (66.67)	
Absent	3 (9.38)	1 (9.09)	2 (9.52)	
Fibrosis	22 (68.75)	7 (63.64)	15 (71.43)	.326
Degree of Fibrosis				.422

Mild	7 (21.88)	3 (27.27)	4 (19.05)	
Moderate/Severe	10 (31.25)	4 (36.36)	6 (28.57)	
Ductular Reaction				.162
Absent	12 (37.5)	6 (54.55)	6 (28.57)	
Present	20 (62.5)	5 (45.45)	15 (71.43)	
NGV	18 (56.25)	7 (63.64)	11 (52.38)	.246
Siderosis	6 (18.75)	3 (9.38)	3 (9.38)	.103
A/H index				.349
No apnea	11 (34.38)	4 (36.36)	7 (33.33)	
Mild	15 (46.8)	6 (54.55)	9 (42.86)	
Moderate	3 (9.38)	1 (9.09)	2 (9.52)	
Severe	3 (9.38)	-	3 (14.29)	

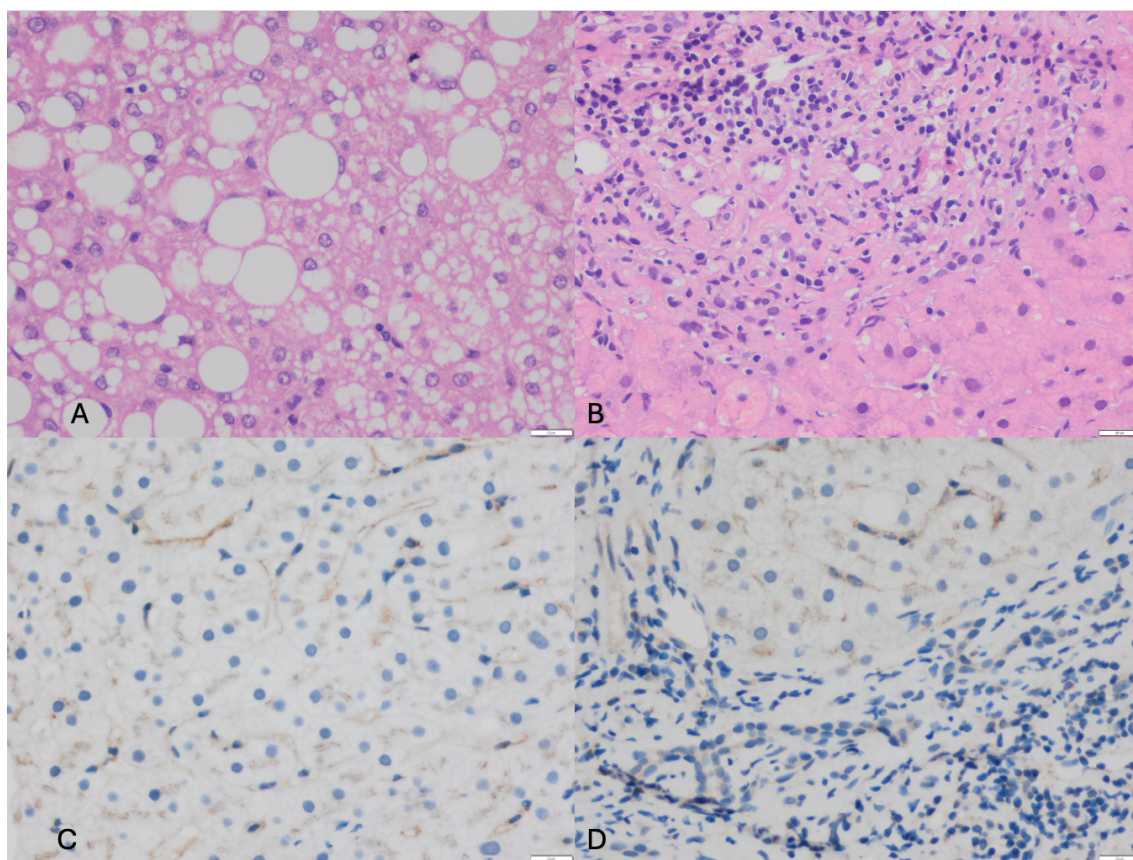
Legend: n: total sample; %: relative sample; CD36: cluster of differentiation 36; p: Student's T-test for independent samples; *Statistically significant difference; SAH: Systemic arterial hypertension; DM: diabetes mellitus; MS: metabolic syndrome; ¹Impossible to calculate the statistical difference; MASH: metabolic dysfunction associated steatohepatitis; NGV: nuclear glycogen vacuolation; A/H: apnea/hypopnea.

Table 2. Correlations of the location of CD36 expressions with other variables using Spearman's Correlation Coefficient.

Variables $r_s(p)$	Antibody CD36	CD36 Membrane	CD36 Cytoplasm	CD36 Bile Duct Epithelium
Dyslipidemia	-.247 (.173)	.129 (0.482)	.014 (.941)	-.357¹ (.045*)
BMI	.238 (.191)	-.097 (0.599)	.319 (.075)	.347 (.052)
ALT	.298 (.098)	-.05 (0.787)	.52¹ (.002*)	.481¹ (.005*)
AST	.284 (.115)	-.097 (0.596)	.469¹ (.007*)	.323 (.071)
Chol. total	-.34 (.057)	.323 (0.071)	-.392¹ (.026*)	-.014 (.939)
NAS Score	.021 (.911)	.105 (.568)	.387¹ (.028*)	.275 (.128)
NASH activity degree	.418¹ (.017*)	-.268 (.138)	.281 (.119)	.149 (.415)
Lobular Inflammation	.062 (.738)	.099 (.591)	.403¹ (.022*)	.134 (.463)
Ductular Reaction	.255 (.159)	-.162 (.377)	.341 (.056)	.2 (.272)

Legend: r_s and (p): statistical significance through Spearman's Correlation Coefficient. where $p < 0.05$ is considered significant (*). and r_s considered as ¹moderate when 0.3-0.59; CD36: cluster of differentiation 36; BMI: body mass index; ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; Col.: cholesterol; NAS: NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease) score; MASH: metabolic dysfunction associated steatohepatitis.

Figure1. Histological and immunohistochemical findings



Legend:

- A. Steatohepatitis with steatosis and ballooning hepatocytes – H&E
- B. Interface hepatitis – H&E
- C. CD36-positive case (cytoplasmatic and membrane expression)
- D. CD36-positive case (hepatocyte and biliary duct epithelium cytoplasmatic and membrane expression)

6. CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstrou diferença estatisticamente significativa entre a expressão positiva de CD36 com relação ao IMC e aos níveis de HDL. A presença de expressão de CD36 se correlacionou a níveis mais baixos de glicose sérica e de plaquetas séricas. Alguns desses achados são mais consistentes com as descrições na literatura. Ao comparar os grupos CD36-positivos e CD36-negativos, observou-se uma diferença entre os grupos e uma correlação entre CD36 e a gravidade da atividade da esteato-hepatite. Por outro lado, uma investigação adicional é essencial para explicar melhor os resultados da hepatite de interface. Foi demonstrada a diferença da expressão positiva do CD36 nos diferentes constituintes celulares hepatocitários, bem como na expressão do epitélio do ducto biliar

Em relação à AOS, assim como à presença de fibrose hepática, não houve correlação com a imunoexpressão de CD36.

Este estudo sugere que o CD36 possa ser um biomarcador de atividade inflamatória e prognóstico da MASH. Um grupo amostral maior deve fornecer outros dados correlacionados.

Considerando toda a evolução em estudos recentes, talvez em um curto espaço de tempo, medicamentos que possam se ligar ao CD36, impedindo sua ativação ou regular suas funções, possam ser usados para evitar toda a cascata oxidativa e reduzir suas consequências, incluindo a MASH, resistência à insulina e aterosclerose, além de neoplasias e metástases em alguns tipos de câncer.