

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE**

**Juliano Machado de Oliveira**

**Síndrome de Supercrescimento Bacteriano do Intestino Delgado associada à  
Síndrome Metabólica e à Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica**

Juiz de Fora

2019

**Juliano Machado de Oliveira**

**Síndrome de Supercrescimento Bacteriano do Intestino Delgado associada à  
Síndrome Metabólica e à Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde, da Faculdade de Medicina de Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Saúde - Área de concentração: Saúde Brasileira.

Orientador: Prof. Dr. Lincoln Eduardo Villela Vieira de Castro Ferreira

Coorientador: Prof. Dr. Fábio Heleno de Lima Pace

Juiz de Fora

2019

Oliveira, Juliano Machado de.

Síndrome de supercrescimento bacteriano do intestino delgado associada à síndrome metabólica e à doença hepática gordurosa não alcoólica / Juliano Machado de Oliveira. -- 2019.

63 f. : il.

Orientador: Lincoln Eduardo Villela Vieira de Castro Ferreira

Coorientador: Fábio Heleno de Lima Pace

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira, 2019.

1. Doença hepática gordurosa não alcoólica. 2. Microbiota intestinal. 3. Síndrome metabólica. 4. Esteato-hepatite. 5. Disbiose. I. Ferreira, Lincoln Eduardo Villela Vieira de Castro, orient. II. Pace, Fábio Heleno de Lima, coorient. III. Título.

**Juliano Machado de Oliveira**

**Síndrome de Supercrescimento Bacteriano do Intestino Delgado associada à  
Síndrome Metabólica e à Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde, da Faculdade de Medicina de Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Saúde - Área de concentração: Saúde Brasileira.

Aprovada em

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Lincoln Eduardo Villela Vieira de Castro Ferreira - Orientador  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof. Dr. Fábio Heleno de Lima Pace - Coorientador  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof. Dr. Aécio Flávio Meirelles de Souza  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Profa. Dra. Kátia Valéria Bastos Dias Barbosa  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Profa. Dra. Nathalie Carvalho Leite  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof. Dr. Rodrigo de Oliveira Moreira  
Universidade Presidente Antônio Carlos

Dedico este trabalho aos pacientes, principais motivadores na busca por novos conhecimentos.

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Saúde da UFJF (PPgS) da Faculdade de Medicina da UFJF, em nome de seus coordenadores e secretárias, que mantém estrutura exemplar, conceito 5 pela CAPES, investindo na formação de docentes e pesquisadores.

Ao Hospital Universitário – EBSEH da UFJF pelo reconhecimento da importância da pesquisa com a colaboração dos setores de Ambulatório do Serviço de Gastroenterologia, Laboratório de Gastroenterologia e Laboratório de Análises Clínicas.

Ao Laboratório de Ecologia e Biologia Molecular de Microrganismos da UFJF, na pessoa da Profa. Dra. Dionéia Evangelista César, pela participação nessa intrigante busca pelo conhecimento do microbioma intestinal.

Ao CIDAP – Centro de Investigação e Diagnóstico em Anatomia Patológica, na pessoa do Dr. Emílio Augusto Campos Pereira de Assis, pela cuidadosa análise das biópsias hepáticas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento deste projeto de pesquisa.

Ao meu orientador, Lincoln EVVC Ferreira, pela parceria que se iniciou há mais de 15 anos sempre pautada na confiança mútua e amizade que é coroada com essa tese.

Ao meu coorientador, Fábio de Lima Pace, parceiro inseparável na pesquisa, na profissão e na vida.

Ao Aécio Flavio Meirelles de Souza que me acolheu em sua maravilhosa equipe de amigos-hepatologistas da qual tenho enorme orgulho de participar e aprender a cada dia mais.

À Kátia VBD Barbosa pelo exemplo de parceria, dedicação e retidão no dia a dia.

À Tarsila Campanha Ribeiro, incentivadora incansável dessa tese desde o início de nosso convívio na docência.

Ao Júlio Maria Fonseca Chebli, professor do Núcleo de Pesquisa em Gastroenterologia, pelo acolhimento e pelo exemplo na dedicação pela pesquisa.

Às secretárias, residentes, acadêmicos e médicos do Serviço de Gastroenterologia do Hospital Universitário da UFJF pelo suor dedicado ao trabalho compreendendo a importância da interface assistência-pesquisa.

À Fabiana de Faria Ghetti, pela parceria afinada que pavimentou essa tese com a certeza do trabalho bem feito na pesquisa, na produção científica e, especialmente, na assistência de excelência aos pacientes envolvidos.

À toda minha família que apoia e vibra com minhas vitórias, não pela ciência, mas pelo prazer de ver minha felicidade. Amo vocês.

Aos meus filhos pela compreensão nos momentos de ausência e nos momentos de tensão. Isso também é por vocês, Pedro e Letícia. Vocês impulsionam meus esforços para ser uma pessoa melhor a quem possam admirar e espelhar-se.

À Lize não cabem agradecimentos. Seu significado em minha trajetória é de plenitude. Minha sensação é de unidade. Não vou agradecer por nossos esforços e dedicação incansáveis no cuidado dos pacientes, nas noites em claro e nos fins de semana debruçados no computador. À Lize cabem os parabéns!!! Mais uma grande vitória NOSSA!!!

“Assim os homens se comportam diante da verdade. Pegam apenas uma parte, pensam que é o todo, e continuam tolos!”

Os cegos e o Elefante – parábola do folclore Hindu.

## RESUMO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) tem etiopatogenia multifatorial, sendo na maioria dos casos associada à síndrome metabólica (SM). A microbiota intestinal tem potencial envolvimento tanto em distúrbios metabólicos como na DHGNA. O objetivo deste estudo foi avaliar a microbiota intestinal em pacientes com DHGNA com diferentes perfis metabólicos. Foram avaliados 36 pacientes com esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) comprovada por biópsia. Os indivíduos foram divididos em dois grupos de acordo com seu perfil metabólico. Foram selecionados 16 pacientes com SM, 13 do gênero feminino, com média de idade de 49,5 anos. No grupo sem SM, foram 20 pacientes, 15 do gênero masculino, com média de idade de 47,5 anos. Foram analisadas suas características em relação à doença hepática e à microbiota intestinal. Os grupos foram semelhantes na avaliação laboratorial e histológica da doença hepática. Para avaliação da microbiota, foram realizados teste de respiratório para pesquisa de supercrescimento bacteriano do intestino delgado (SBID) e análise da microbiota fecal por hibridização por fluorescência *in situ* (FISH). O teste respiratório foi positivo em 43,8% dos pacientes com SM e em 50% daqueles sem SM. Houve alta frequência de SBID nos dois grupos, sem diferença significativa entre eles. À análise da microbiota fecal, houve diferença significativa quanto à ordem Verrucomicrobiales. Sua concentração média foi de  $0,84 \times 10^8$  células  $g^{-1}$  no grupo sem SM e de  $1,44 \times 10^8$  células  $g^{-1}$  naqueles com SM ( $p < 0,01$ ). A quantificação de Verrucomicrobiales também se correlacionou inversamente com ferritina sérica e balonização hepatocitária, marcadores de inflamação associados à EHNA. Essa ordem de bactérias, através de seu representante na microbiota humana, *Akkermansia muciniphila*, está associada a proteção da mucosa intestinal e a melhor perfil metabólico. Diante desses achados, sugere-se que a menor concentração de Verrucomicrobiales esteja associada a maior atividade inflamatória em pacientes com DHGNA sem SM, na qual a etiopatogenia da doença não possui seu substrato metabólico clássico.

Palavras-chave: Doença hepática gordurosa não alcoólica. Microbiota intestinal. Síndrome metabólica. Esteato-hepatite. Disbiose.

## ABSTRACT

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) has multifactorial etiopathogenesis, and in most cases is associated with metabolic syndrome (MS). The intestinal microbiota has potential involvement in both metabolic disorders and NAFLD. The aim of this study was to evaluate the intestinal microbiota in NAFLD patients with different metabolic profiles. Thirty-six patients with biopsy-proven nonalcoholic steatohepatitis (NASH) were evaluated. Subjects were divided into two groups according to their metabolic profile. We selected 16 patients with MS, 13 female, with mean age of 49.5 years. In the group without MS, there were 20 patients, 15 male, with mean age of 47.5 years. Their characteristics in relation to liver disease and intestinal microbiota were analyzed. The groups were similar in the laboratory and histological evaluation of liver disease. For microbiota evaluation, a breathing test for small intestinal bacterial overgrowth (SIBO) and *in situ* fluorescence hybridization (FISH) fecal microbiota analysis were performed. Breathing test was positive in 43.8% of patients with MS and 50% of those without MS. There was a high frequency of SIBO in both groups, with no significant difference between them. The fecal microbiota analysis showed significant difference in order Verrucomicrobiales. Its average concentration was  $0.84 \times 10^8$  cells  $g^{-1}$  in the group without MS and  $1.44 \times 10^8$  cells  $g^{-1}$  in those with MS ( $p < 0.01$ ). Verrucomicrobiales quantification also inversely correlated with serum ferritin and hepatocyte ballooning, markers of inflammation associated with NASH. This order of bacteria, through its representative in the human microbiota, *Akkermansia muciniphila*, is associated with intestinal mucosa protection and better metabolic profile. Given these findings, it is suggested that the lower concentration of Verrucomicrobiales is associated with higher inflammatory activity in patients with NAFLD without MS, in which the etiopathogenesis of the disease does not have its classic metabolic substrate.

Keywords: Non-alcoholic fatty liver disease. Intestinal microbiota. Metabolic syndrome. Steatohepatitis. Dysbiosis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mecanismos da ação da microbiota intestinal sobre o balanço energético .....	24
Quadro 1 – Classificação de Child-Pugh .....	30
Quadro 2 – Critérios de Síndrome Metabólica pelo National Cholesterol Education Program .....	30
Fluxograma 1 – Recrutamento de pacientes .....	37
Figura 2 – Teste respiratório para Supercrescimento Bacteriano do Intestino Delgado de acordo com o perfil metabólico .....	39
Figura 3 – Proporção dos grupos predominantes na microbiota intestinal com sua distribuição de acordo com o perfil metabólico .....	40
Figura 4 – Concentração de Verrucomicrobiales por frequência de indivíduos de acordo com o perfil metabólico .....	41
Figura 5 – Correlação inversa entre concentração de Verrucomicrobiales com ferritina sérica e balonização hepatocitária .....	42
Figura 6 – Comparação na distribuição de Verrucomicrobiales e Ruminococcaceae de acordo com o perfil metabólico .....	42

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Testes laboratoriais .....	32
Tabela 2 – Escore histológico de atividade NAS ( <i>NAFLD activity score</i> ) .....	33
Tabela 3 – Estadiamento histológico da fibrose pelo NAS ( <i>NAFLD activity score</i> ) .....	34
Tabela 4 – Sondas de oligonucleotídeos usadas para quantificação microbiana por hibridização fluorescente <i>in situ</i> .....	36
Tabela 5 – Avaliação clínica e laboratorial do perfil metabólico .....	38
Tabela 6 – Avaliação laboratorial e histológica da hepatopatia .....	38
Tabela 7 – Análise das concentrações dos grupos microbianos e sua distribuição de acordo com o perfil metabólico .....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAM	Anticorpo Antimitocôndria
AAML	Anticorpo Antimúsculo Liso
AGCC	Ácido Graxo de Cadeia Curta
AgHBs	Antígeno de Superfície do Vírus da Hepatite B
AGL	Ácidos Graxos Livres
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
CA	Circunferência Abdominal
CH <sub>4</sub>	Metano
CHC	Carcinoma Hepatocelular
ChREBP	Carbohydrate Responsive Element-Binding Protein
CYP2E1	Citocromo P450 2E1
DIOS	Dysmetabolic Iron Overload Syndrome
DHGNA	Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica
DM2	Diabetes Mellitus Tipo 2
EASL	European Association for the Study of the Liver
EHNA	Esteato-Hepatite Não Alcoólica
FA	Fosfatase Alcalina
FAN	Fator Antinúcleo
Fiaf	Fasting-Induced Adipocyte Factor
FIB-4	Fibrosis-4 Score
FISH	Hibridização <i>In Situ</i> Fluorescente
FTI	Ferritina
G	Glicose
GGT	Gamaglutamiltranspeptidase
GLP-1	Glucagon-Like Peptide-1
H <sub>2</sub>	Hidrogênio
HBV	Vírus da Hepatite B
HCV	Vírus da Hepatite C
HDL	High Density Lipoprotein
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HOMA-IR	Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance

HU-UFJF	Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora
IMC	Índice de Massa Corpórea
IRS-1	Insulin Receptor Substrate - 1
JNK	c-Jun N-terminal Cinase
LBP	LPS Binding Protein
LLP	Lipase Lipoproteica
LPS	Lipopolissacáride
MAPK	Mitogen-Activated Protein kinase
<i>MBOAT7</i>	gene Membrane Bound O-Acyltransferase Domain Containing 7
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NAS	NAFLD Activity Score
NCEP	National Cholesterol Education Program
NF $\kappa\beta$	Nuclear Factor $\kappa\beta$
NFS	NAFLD Fibrosis Score
OMS	Organização Mundial da Saúde
p	Valor de p
PA	Pressão Arterial
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PLT	Plaquetas
<i>PNPLA3</i>	gene patatin-like phospholipase domain containing 3
PPAR $\alpha$	Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Alfa
ppm	Partes por Milhão
R	Rô de Spearman
RI	Resistência Insulínica
RNI	Razão Normalizada Internacional
ROS	Reactive Oxygen Species
SAPK	Stress-Activated Protein Kinase
SBID	Supercrescimento Bacteriano do Intestino Delgado
SM	Síndrome Metabólica
SPSS	Windows. <i>SPSS Inc.</i> , Estados Unidos da América
TAG	Triacilglicerol
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGI	Trato Gastrointestinal

TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor $\alpha$
TRL-4	Toll Like Receptor 4
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
USG	Ultrassonografia
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
ZO-1	Zona Occludens

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1	DOENÇA HEPÁTICA GORDUOSA NÃO ALCOÓLICA .....	17
1.2	MICROBIOTA INTESTINAL E SÍNDROME METABÓLICA .....	22
1.3	MICROBIOTA INTESTINAL E DHGNA .....	24
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	28
2.1.	PRIMÁRIOS .....	28
<b>2.1.1</b>	<b>Avaliar presença de SBID em pacientes com EHNA de acordo com seu perfil metabólico</b> .....	28
<b>2.1.2</b>	<b>Identificar particularidades da microbiota intestinal em pacientes com EHNA de acordo com seu perfil metabólico</b> .....	28
2.2	SECUNDÁRIO .....	28
<b>2.2.1</b>	<b>Comparar o padrão da EHNA em pacientes com diferentes perfis metabólicos</b> .....	28
<b>3</b>	<b>INDIVÍDUOS E MÉTODOS</b> .....	29
3.1	DESENHO DO ESTUDO .....	29
3.2	INDIVÍDUOS .....	29
3.3	MÉTODOS .....	31
<b>3.3.1</b>	<b>Avaliação Clínica e Laboratorial</b> .....	31
<b>3.3.2</b>	<b>Biópsia Hepática</b> .....	32
<b>3.3.3</b>	<b>Teste Respiratório para Avaliação de SBID</b> .....	34
<b>3.3.4</b>	<b>Caracterização da Microbiota Fecal</b> .....	34
<b>3.3.5</b>	<b>Análise Estatística</b> .....	35
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	37
4.1	PACIENTES .....	37
4.2	SBID E EHNA .....	39
4.3	CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA FECAL NA EHNA .....	39
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	43
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	47
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	48
	<b>APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</b> .....	59
	<b>APÊNDICE B – Aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa</b> .....	61

<b>APÊNDICE C – Orientações para Realização do Teste Respiratório com Hidrogênio e Metano Exalados .....</b>	<b>63</b>
--	-----------

## 1 INTRODUÇÃO

A síndrome metabólica (SM) compreende um conjunto de condições que representa o principal fator de risco para doenças cardiovasculares (HU *et al.*, 2007; MCNEILL *et al.*, 2005; MEIGS *et al.*, 2006; ROSENGREN *et al.*, 2003; WILDMAN *et al.*, 2010). Como esta é a principal causa de mortalidade no Brasil e no mundo (NAGHAVI *et al.*, 2017), a SM ganhou progressiva importância no cenário médico nas últimas décadas. A relevância desta condição clínica vem crescendo ainda mais com o reconhecimento do acometimento de outros órgãos, independente da lesão cardiovascular.

Nesta perspectiva, o fígado ganha destaque devido à participação da SM na maioria dos pacientes com diagnóstico de doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). A infiltração gordurosa do fígado apresenta uma plêiade de possíveis lesões hepáticas, variando desde a esteatose sem agressão inflamatória até a esteato-hepatite com fibrose, podendo progredir à cirrose hepática. Nos últimos anos, a esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) em suas formas mais avançadas figura entre as principais causas de doença hepática terminal (VERNON; BARANOVA; YOUNOSSI, 2011) e, portanto, entre as indicações mais frequentes de transplante hepático no mundo (AGOPIAN *et al.*, 2012; BERTOT; ADAMS, 2016).

A etiopatogênese da DHGNA é multivariada. Apesar da íntima associação com as doenças metabólicas, especialmente a obesidade e a resistência insulínica (RI), outros fatores estão associados ao desenvolvimento da infiltração gordurosa do fígado. Alterações genéticas com maior tendência familiar à DHGNA já foram descritas, assim como alterações epigenéticas que aumentam a suscetibilidade à DHGNA (CAMPO *et al.*, 2018; SOOKOIAN; PIROLA, 2011). Fatores ambientais e alimentares com possível modulação da microbiota intestinal também são associados ao acúmulo de gordura visceral e à doença hepática (SCHNABL; BRENNER, 2014).

A microbiota intestinal é complexa e pode apresentar variações quantitativas e qualitativas envolvidas em diversas enfermidades, especialmente distúrbios do metabolismo (LEY *et al.*, 2005). Essa população microbiana é variável de acordo com a topografia do trato gastrointestinal (TGI), sendo o número de unidades formadoras de colônias (UFC) crescente do estômago para o cólon. Os filos microbianos mais prevalentes são os Firmicutes e Bacteroidetes, além de Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria, Spirochaetae e Verrucomicrobia (COSTELLO *et al.*, 2009). No TGI superior predominam Firmicutes (Lactobacillaceae) e Proteobacterias (Enterobacteriaceae). Enquanto no cólon, as maiores concentrações são de Bacteroidetes (Bacteroidaceae, Prevotellaceae e Rikenellaceae) e de

alguns Firmicutes (Lachnospiraceae e Ruminococcaceae) (SCHEITHAUER *et al.*, 2016). Não existe padrão determinado de população microbiana normal. A diversidade e o equilíbrio entre os grupos de microrganismos são condições que conferem um ambiente intestinal saudável. Essa população inicia sua composição no nascimento e é modulada por vários fatores ao longo da vida, destacando-se fatores ambientais e hábito alimentar além de características do próprio TGI (TURNBAUGH *et al.*, 2008). Como limitadores da proliferação temos a destruição de microrganismos pelos sucos gástrico e biliar e enzimas proteolíticas; fatores mecânicos como a peristalse que diminui a aderência bacteriana e a válvula ileocecal que limita o fluxo retrógrado colônico para o delgado; além do controle imunológico especialmente pela IgA secretora produzida no próprio TGI (HAO; LEE, 2004; RIORDAN *et al.*, 2001). Se o indivíduo é exposto a estímulos que desequilibram a microbiota ou se há falha nos fatores reguladores da proliferação de microrganismos, podemos ter desarranjo microbiológico com desenvolvimento de disbiose. Essa alteração da microbiota pode ser qualitativa e/ou quantitativa, podendo cursar com síndrome de supercrescimento bacteriano do intestino delgado (SBID).

A disbiose e a SBID têm sido implicadas em vários distúrbios metabólicos associados à SM e à DHGNA, descrito em tópico específico posteriormente.

## 1.1 DOENÇA HEPÁTICA GORDUOSA NÃO ALCOÓLICA

A DHGNA é atualmente a causa mais frequente de alteração de enzimas hepáticas na prática clínica (CLARK; BRANCATI; DIEHL, 2003; LUCAS *et al.*, 2018). A patologia é semelhante à da esteatose associada ao álcool, porém com progressão mais lenta. Entretanto, mantém possibilidade de evolução para cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC) (SAYINER *et al.*, 2016).

Sua prevalência é extremamente variável pelo mundo e oscila principalmente de acordo com hábitos alimentares e com perfil metabólico de cada população. Vernon, Baranova e Younossi (2011) realizaram revisão sistemática da literatura sobre DHGNA com artigos publicados entre 1980 e 2010. A prevalência de DHGNA variou de 6 a 35% com média de 20% (VERNON; BARANOVA; YOUNOSSI, 2011). Estes dados também variam de acordo com a metodologia utilizada para o diagnóstico: marcadores clínico-laboratoriais, métodos de imagem ou avaliação histológica, esta considerada como *gold standard*. Todavia, independente da região do globo, sua incidência é crescente e projeta-se para um futuro próximo como a principal causa de doença hepática em estágio final (BERTOT; ADAMS, 2016; VERNON; BARANOVA; YOUNOSSI, 2011).

A presença de doença mais avançada com atividade inflamatória e fibrose, EHNA, também varia de acordo com a população estudada. Na Grécia, autópsias de pacientes falecidos por doenças cardiovasculares evidenciaram DHGNA em 40% das amostras e EHNA em 31% destas, confirmando a forte relação da doença gordurosa do fígado com SM e doenças cardiovasculares (ZOIS, 2010). Nos Estados Unidos, a prevalência de EHNA na população varia de 3 a 5% (AMARAPURKAR *et al.*, 2007; BROWNING *et al.*, 2004; WILLIAMS *et al.*, 2011).

Em nosso meio, estudo conduzido pelo Grupo Brasileiro para Estudo da DHGNA da Sociedade Brasileira de Hepatologia, avaliou o perfil da doença nas cinco regiões do país. Foram incluídos pacientes com diagnóstico de DHGNA por ultrassonografia (USG) e elevação de enzimas hepáticas. Foram biopsiados pacientes com elevação de aminotransferases acima de 1,5 vezes o limite superior da normalidade. EHNA estava presente em 58% das amostras de biópsia hepática com fibrose em 21% destes. Cirrose hepática foi identificada em 15,4% da amostra e CHC em 0,7%. Nesse estudo brasileiro, ficou demonstrada associação de distúrbios metabólicos com as formas mais graves da DHGNA. Sessenta e um por cento dos pacientes com EHNA apresentavam SM e 75% tinham evidência de RI por *Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance* (HOMA-IR) > 2,5. (COTRIM *et al.*, 2011)

As causas de infiltração gordurosa podem ser divididas entre tóxico-medicamentosas ou metabólicas com aumento da gordura visceral. A DHGNA secundária a distúrbios metabólicos é a forma mais comum. Sua patogênese é alvo de muitos estudos na atualidade (STOLS-GONÇALVES *et al.*, 2019). Porém, ainda restam muitas interrogações em todo processo de lesão hepática, desde o mecanismo de acúmulo de gorduras até a geração de inflamação.

O aporte de gordura ao fígado como ácidos graxos livres (AGL) tem duas fontes principais: absorção intestinal e a lipólise do tecido adiposo. A absorção intestinal contribui de forma direta pelos carboidratos, além de gordura através de remanescente de quilomícrons. Entretanto, a fonte principal é a liberação de ácidos graxos não esterificados pela lipólise. Assim, os AGL fornecidos pelo depósito preexistente no adipócito tem maior participação na infiltração de gordura hepática do que a fonte alimentar direta (DONNELLY *et al.*, 2005). No fígado, os AGL são oxidados nas mitocôndrias e secretados como lipoproteínas de muito baixa densidade (*very low density lipoprotein* [VLDL]). Um desequilíbrio entre aporte e oxidação mitocondrial de AGL leva ao acúmulo de gordura no fígado, especialmente na forma de triacilglicerol (TAG) (MALHI; GORES, 2008). Nos pacientes com DHGNA, alguns fatores contribuem para esse desbalanço. Habitualmente esses indivíduos apresentam maior quantidade de AGL séricos. Há também maior lipogênese hepática a partir de carboidratos sem a

infrarregulação esperada após alimentação com fonte de gorduras. Ambas as situações ocorrem por influência do estado de RI comum a esses indivíduos (DONNELLY *et al.*, 2005).

Após acúmulo de lípidos nas células hepáticas, alguns pacientes progridem para forma inflamatória da DHGNA. Nessa fase, inflamação e apoptose hepatocelular são processos em evidência. Vários fatores estão envolvidos nessa lesão. Alguns são atualmente mais bem estudados como a lipotoxicidade direta e as adipocinas. A ação direta dos AGL na lesão hepática, a lipotoxicidade, ocorre em diversos níveis moleculares. Há aumento de expressão de proteínas pró-apoptóticas membros da família Bcl-2: a Bax por intermédio da *c-jun N-terminal cinase* (JNK) e a Bim por estímulo direto dos AGL. Essas proteínas aumentam permeabilidade lisossomal e mitocondrial que levam a apoptose (MALHI; GORES, 2008). O aumento de AGL também gera aumento de sua oxidação com ativação de enzimas microssomais como o citocromo P450 2E1 (CYP2E1) e maior formação de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* [ROS]) e estresse oxidativo crônico semelhante ao processo patogênico da esteato-hepatite alcoólica (WELTMAN *et al.*, 1998).

Há alguns anos, o tecido adiposo é reconhecido não mais como mero tecido de estoque energético, mas como órgão endócrino. As adipocinas são sintetizadas e secretadas pelos adipócitos. A maior parte dessas citocinas tem funções metabólicas adversas, pró-inflamatórias, angiogênicas e mitogênicas (DENG; SCHERER, 2010). Essas adipocinas têm sua secreção alterada em pacientes com RI, SM, diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e obesidade. Nessas situações de desequilíbrio na produção das adipocinas, ocorrem processos patogênicos em uma série de órgãos (DENG; SCHERER, 2010). O papel de algumas dessas citocinas na patogênese da esteato-hepatite tem sido melhor definido. O fator de necrose tumoral  $\alpha$  (*Tumor necrosis factor  $\alpha$*  [TNF- $\alpha$ ]), produzido também pelo tecido adiposo, é encontrado em níveis mais elevados em pacientes com EHNA do que naqueles com esteatose não complicada. O TNF- $\alpha$  interfere na sensibilidade à insulina por infrarregular o substrato do receptor de insulina (Insulin Receptor Substrate - 1 [IRS-1]) através de quinases como a JNK (ALIPOURFARD; DATUKISHVILI; MIKELADZE, 2019; SVEGLIATI-BARONI *et al.*, 2006). Ele ativa o fator nuclear  $\kappa\beta$  (nuclear factor  $\kappa\beta$  [NF- $\kappa\beta$ ]) como fator de transcrição de várias citocinas inflamatórias envolvidas na EHNA (FELDSTEIN *et al.*, 2004). A leptina, outra adipocina com efeito metabólico desfavorável, é encontrada em concentrações maiores nos pacientes com EHNA em estudos populacionais. Essa citocina tem efeito fibrogênico *in vitro*, não confirmado em humanos (ZELBER-SAGI *et al.*, 2012).

Por outro lado, a adiponectina é uma adipocina com efeito benéfico na sensibilidade à insulina e tem sua concentração sérica em proporção inversa à obesidade, SM e RI (CZAJA,

2004). É capaz de otimizar a  $\beta$ -oxidação de AGL diminuindo lipogênese e seu depósito hepatocitário. Também apresenta atividade anti-inflamatória e antifibrogênica com diminuição da síntese de TNF  $\alpha$  (POLYZOS et al., 2010). Estudos em humanos demonstram menor concentração de adiponectina em pacientes com EHNA. Entretanto, não há consenso em relação a sua participação na progressão da doença para formas mais graves (ZELBER-SAGI et al., 2012).

A ferritina é responsável pelo armazenamento do ferro, mas também é proteína de fase aguda, marcadora de atividade inflamatória sistêmica (KOWDLEY et al., 2011). A elevação da ferritina sérica também é associada à DHGNA, podendo ser encontrada em até 50% dos pacientes com esteatose (ANGULO et al., 1999; MORIS et al., 2019). Ela é preditora independente de EHNA e de fibrose hepática (ANGULO et al., 1999; KOWDLEY et al., 2011). O significado dessa proteína sérica na DHGNA pode ser variável, com participação na patogênese ou apenas como marcadora secundária de inflamação. Na maioria dos pacientes com DHGNA, o aumento da ferritina sérica é mero marcador de inflamação e a saturação da transferrina é normal. Entretanto, cerca de 30 a 50% dos indivíduos com DHGNA apresentam síndrome da sobrecarga de ferro dismetabólica (*Dysmetabolic Iron Overload Syndrome* [DIOS]) (MORIS et al., 2019). Nestes indivíduos, o dano hepático leva ao aumento da hepcidina que está associada ao distúrbio metabólico da DIOS. Ocorre aumento da absorção e leve sobrecarga de ferro em hepatócitos e/ou sistema reticuloendotelial com piora da resistência insulínica e maior estresse oxidativo. Assim, a hiperferritinemia tem envolvimento na patogênese. Na DIOS, há sobrecarga de ferro e discreta elevação da saturação da transferrina. Entretanto, indivíduos com suspeita de DHGNA com hiperferritinemia e elevação importante da saturação da transferrina devem ser avaliados para possibilidade de hemocromatose. Quando a hemocromatose é descartada, o controle da DHGNA é suficiente para reverter a hiperferritinemia (MORIS et al., 2019).

Alterações genéticas também estão relacionadas com a etiopatogênese da DHGNA (CAMPO et al., 2018). Entre as variações estudadas, a que demonstra maior relação clínica é a variação do gene patatin-like phospholipase domain containing 3 (*PNPLA3*) localizado no braço longo do cromossoma 22 que codifica a proteína adiponutrina encontrada em adipócitos e hepatócitos. O polimorfismo rs738409 com a troca de isoleucina pela metionina leva a perda de função com aumento de conteúdo hepático de gordura. Essa variação, além de indução de esteatose, também aumenta a atividade inflamatória e a progressão para fibrose. Numa grande metanálise, envolvendo diversas etnias, foi demonstrada associação do polimorfismo do *PNPLA3* com aumento do conteúdo de lípide hepático em 73%, aumento de 3,24 vezes da

intensidade do escore histológico de necroinflamação e aumento de 3,2 vezes no risco de fibrose para aqueles indivíduos afetados em homozigose (SOOKOIAN; PIROLA, 2011). Há questionável participação desse polimorfismo na carcinogênese aumentada em pacientes com EHNA (HUANG *et al.*, 2019). Todavia, apesar da marcada associação com depósito de gordura e progressão da DHGNA, não foi demonstrada associação dessa variante genética com distúrbios metabólicos como obesidade e HOMA-IR (SOOKOIAN; PIROLA, 2011). Outra alteração genética descrita mais recentemente é a variação do gene Membrane Bound O-Acyltransferase Domain Containing 7 (*MBOAT7*). Ela é associada a todo espectro de lesão hepática pela infiltração gordurosa (CAMPO *et al.*, 2018). Mas sua maior relevância está na menor expressão hepática da proteína MBOAT7 em indivíduos com a variante rs641738, conferindo possível aumento de risco de CHC em pacientes com DHGNA independente da presença de fibrose avançada (DONATI *et al.*, 2017).

Além das alterações genéticas, fenômenos epigenéticos são associados a DHGNA. A epigenética é a mudança de expressão gênica reversível desencadeada por estímulos ambientais. Modificações na histona, metilação do DNA e microRNAs são fenômenos epigenéticos capazes de alterar a expressão de genes com influência na DHGNA (CAMPO *et al.*, 2018). Entretanto, essa é uma área que ainda carece de maiores estudos nesta condição.

O diagnóstico da DHGNA baseia-se no achado de infiltração gordurosa do fígado por métodos de imagem e alteração de testes bioquímicos hepáticos em ambiente orgânico de obesidade, SM ou DM2. A doença é habitualmente assintomática. Queixa de desconforto em hipocôndrio direito associado à hepatomegalia pode estar presente. Mas expressão clínica exuberante ocorre apenas em hepatopatia avançada. Imagem com sinais sugestivos de infiltração gordurosa do fígado ratificam a possibilidade de DHGNA, mas a ausência desses achados não exclui a doença. Deve-se ainda descartar outras causas de hepatopatias. O diagnóstico de certeza e adequado estadiamento da doença dependem de confirmação histológica por biópsia hepática (DOWMAN; TOMLINSON; NEWSOME, 2010). Entretanto, como a análise histológica envolve os riscos da biópsia, métodos não invasivos que avaliam a quantidade de gordura, atividade inflamatória e, especialmente, progressão de fibrose têm sido desenvolvidos.

As recomendações de diversos consensos atuais partem de suspeita clínica e sinais de aumento de gordura hepática para o estadiamento da DHGNA. Em primeira estratificação da doença são utilizados marcadores clínicos e laboratoriais. Nessa fase são usados os escores NFS (*NAFLD Fibrosis Score*) (ANGULO *et al.*, 2007) e FIB-4 (*fibrosis-4 score*) (SUN *et al.*, 2016). Se estes escores indicam baixo risco de fibrose, o paciente é orientado a manter controle

periódico. Se entretanto o risco é intermediário, deve-se aplicar outro método que defina com maior acurácia a probabilidade de fibrose. Para isso, a elastografia hepática é utilizada. Essa avaliação mede a rigidez hepática por métodos de imagem. Diversos algoritmos de conduta são propostos. Se a definição de fibrose ainda se mantém em níveis intermediários, não definitivos, a biópsia hepática deve ser considerada. Nos casos em que a fibrose hepática avançada é bem documentada pelos métodos não invasivos, a realização da biópsia é controversa. A partir da documentação de doença progressiva com fibrose de forma não invasiva ou por biópsia deve-se tomar condutas para controle da esteato-hepatite (ZHOU *et al.*, 2019).

## 1.2 MICROBIOTA INTESTINAL E SÍNDROME METABÓLICA

A obesidade é um problema de saúde pública mundial (HILL, 2003; MELDRUM; MORRIS; GAMBONE, 2017). E, embora o desequilíbrio energético entre consumo e gasto seja seu fator principal, características genéticas e ambientais parecem contribuir para a progressão do ganho ponderal e distúrbios metabólicos encontrados nessas pessoas (LEVIN; KEESEY, 1998; MELDRUM; MORRIS; GAMBONE, 2017; TAPPY, 2004). A microbiota intestinal com seus trilhões de microrganismos é sabidamente importante no processo de digestão de diversos nutrientes, tornando-os acessíveis a absorção intestinal. A hipótese de que a microbiota intestinal poderia interferir na capacidade individual de retirar energia a partir do alimento ingerido colaborando para seu ganho ponderal vem ganhando grandes adeptos. Bäckhed *et al.* (2007) confirmaram esta teoria em modelos experimentais com camundongos, definindo a microbiota como um “órgão metabólico”, um “biorreator anaeróbico”. Eles demonstraram que camundongos livres de germes têm menor conteúdo corporal de gordura quando comparados aos camundongos convencionais (BACKHED *et al.*, 2004). Estes apresentavam também maiores concentrações séricas de leptina, glicemia e resistência insulínica. Quando os animais sem microbiota própria recebiam transplante da microbiota de camundongos obesos eles ganhavam mais peso do que aqueles que recebiam a microbiota de camundongos magros, mesmo se estes fossem alimentados com maior quantidade da mesma dieta (BACKHED *et al.*, 2004; TURNBAUGH *et al.*, 2006). Em apenas 2 semanas, os camundongos livres de germes que recebiam microbiota de animais obesos passavam a apresentar maior resistência insulínica além de ganho de 57% do seu peso inicial e aumento de 66% da massa gordurosa (BACKHED *et al.*, 2004).

O estudo da microbiota intestinal desses animais demonstrou algumas diferenças significativas. Os animais mais obesos tinham maior quantidade de Firmicutes em detrimento

de Bacteroidetes (LEY *et al.*, 2006). Este mesmo estudo verificou que a microbiota de camundongos obesos tinha maior capacidade de degradação de polissacarídes primariamente não digeríveis e geravam fezes com maior quantidade de produtos de fermentação e menor caloria. O processamento destes polissacarídes por glicosil-hidrolases bacterianas produz monossacarídeos e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (BACKHED *et al.*, 2004). Os AGCC são nutrientes diretos para células intestinais e estimulam a produção de leptina que aumenta o apetite (XIONG *et al.*, 2004) e de peptídeo YY que lentifica o trânsito intestinal e aumenta o tempo para captação de nutrientes (DELZENNE; CANI, 2011). Os AGCC absorvidos são precursores no fígado para produção de colesterol e para gliconeogênese. Os monossacarídeos absorvidos ativam no fígado fatores como a proteína ligadora do elemento responsivo ao carboidrato (*Carbohydrate responsive element-binding protein* [ChREBP]) que regula a lipogênese (POUPEAU; POSTIC, 2011).

A captação de nutrientes também é favorecida por aumento da vascularização intestinal gerado por estímulo inflamatório secundário a alterações da microbiota (DING *et al.*, 2010). Além do aumento do apetite estimulado pela leptina já descrito, mudanças na população bacteriana intestinal diminuem a produção do peptídeo-1 semelhante ao glucagon (*Glucagon-like peptide-1* [GLP-1]) que tem efeito anorexígeno (CANI *et al.*, 2009).

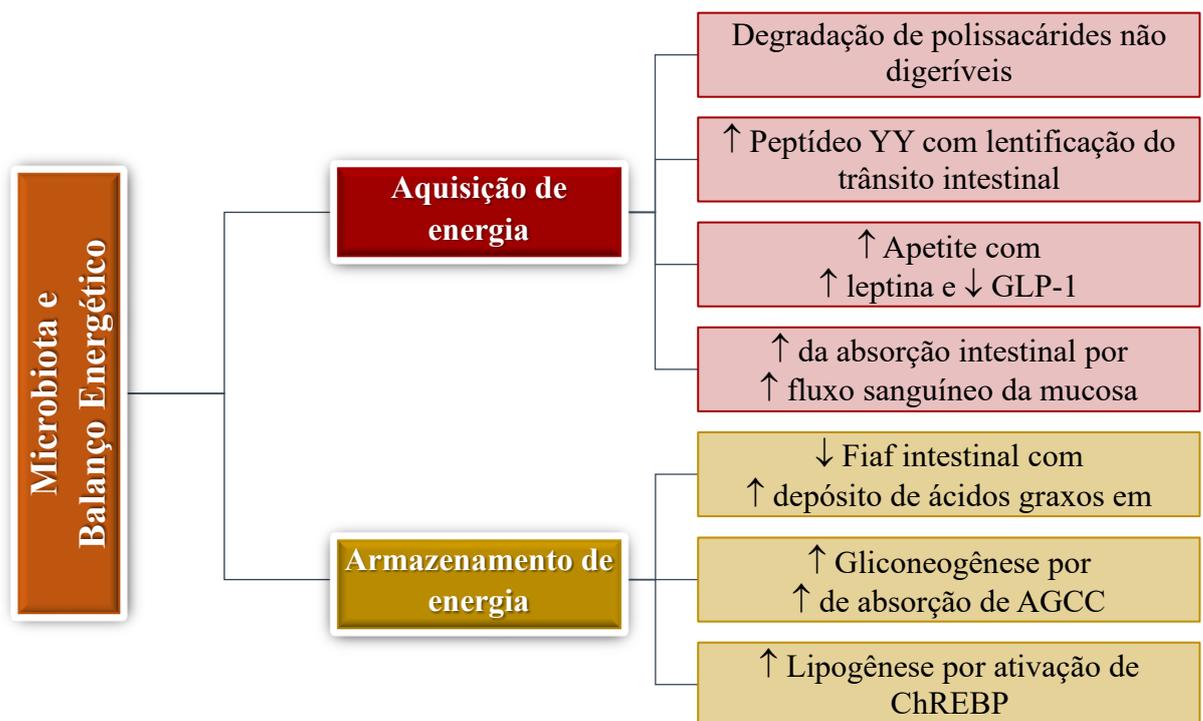
Além da maior extração calórica da dieta, foi comprovada modulação de genes que atuam na deposição de calorias nos adipócitos. Estudos em camundongos livres de germes demonstraram que, após transplante da microbiota de camundongos convencionais, há diminuição da produção intestinal do fator de adipócito induzido por jejum (*fasting-induced adipocyte factor* [Fiaf]) que inibe a lipase lipoproteica (LLP) circulante. A não inibição da LLP aumenta a captação de ácidos graxos a partir de triglicéris das lipoproteínas com consequente maior depósito em tecidos gordurosos (BACKHED *et al.*, 2004).

Portanto, a microbiota intestinal é importante fator ambiental tanto na aquisição de energia a partir da dieta como no processo de armazenamento de energia no hospedeiro (BACKHED *et al.*, 2004) conforme resumido na Figura 1.

Estudos em humanos também mostram o papel da microbiota sobre perfis metabólicos. Foi demonstrado que as concentrações de Bacteroidetes se apresentam reduzidas e de Firmicutes aumentadas em indivíduos com obesidade. Quando houve perda ponderal sustentada por um ano nesses indivíduos, a microbiota passou a apresentar proporções semelhantes às dos indivíduos magros (LEY *et al.*, 2005). Em pacientes com diabetes foram demonstradas particularidades na microbiota quando comparados aos adultos sem diabetes (LARSEN *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2010). Variações de concentrações de microrganismos específicos também

estão demonstradas em crianças obesas. Elas apresentaram menor concentração de *Akkermansia muciniphyla*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Prevotella*, *Candida spp.* e *Saccharomyces spp* quando comparada a microbiota de crianças magras (BORGIO *et al.*, 2017). Esses achados fazem da microbiota um alvo para desenvolvimento de terapias que tentem modulá-la para padrões metabolicamente benéficos (EJTAHED *et al.*, 2016). Contudo, os estudos em humanos são muito heterogêneos, habitualmente transversais e sem definição de alvo específico para intervenção (MARUVADA *et al.*, 2017).

Figura 1. Mecanismos da ação da microbiota intestinal sobre o balanço energético.



Mecanismos pelos quais a microbiota participa ativamente do balanço energético com aumento do aporte calórico a partir do intestino e com deposição dessa energia em reservatórios teciduais. GLP-1, Glucagon-like peptide-1; Fiaf, fasting-induced adipocyte factor; AGCC, ácidos graxos de cadeia curta; ChREBP, Carbohydrate responsive element-binding protein. Adaptado a partir de Backhed *et al.* (2004)

### 1.3 MICROBIOTA INTESTINAL E DHGNA

Os estudos experimentais de Bäckhed *et al.* (2007) demonstraram aumento de adiposidade em camundongos livres de flora bacteriana que eram colonizados posteriormente na vida adulta. Estes experimentos evidenciaram que o ganho de gordura corporal ocorria

especialmente no fígado e associado ao maior conteúdo de triglicérides a partir da absorção de monossacarídeos (BACKHED *et al.*, 2004).

Além desta via metabólica de indução de DHGNA explanadas no item anterior, relatam-se outros possíveis mecanismos de indução da doença hepática associados ao desequilíbrio da microbiota intestinal. Entre eles temos o aumento de bioprodutos gerados pelas bactérias intestinais, a produção de endotoxinas e aumento da permeabilidade intestinal secundários ao SBID.

Os lipopolissacárides (LPS) têm relevância nesse processo. Eles são componentes das vias de produção de endotoxinas. O aumento de sua concentração plasmática foi induzido por aumento da oferta de gorduras na dieta em estudo com camundongos (CANI *et al.*, 2007). Outrossim, LPS também é considerado o principal bioproduto de bactérias intestinais já que é parte da parede celular de bactérias gram negativas. No SBID há aumento de LPS e de endotoxinas (MACHADO; CORTEZ-PINTO, 2012). A absorção do LPS pelo intestino ocorre associada à absorção de lípidos (GHOSHAL *et al.*, 2008; LAUGERETTE *et al.*, 2011). A translocação do LPS ocorre através de receptores 4 do tipo Toll (*toll like receptor 4* [TLR-4]). Então, LPS se liga a proteína ligadora de lipopolissacáride (*LPS binding protein* [LBP]) e, a seguir, este complexo se une a receptores CD14 que são expressos em membranas de enterócitos e células inflamatórias ou mantém-se na forma solúvel. O conjunto LPS-LBP-CD14 ativa o TLR-4 presente em células inflamatórias como as células de Kupfer e as células estreladas no fígado. Este evento desencadeia cascata de sinalização que envolve quinases ativadas por mitógenos (*mitogen-activated protein kinase* [MAPK]), por estresse (*stress-activated protein kinase* [SAPK]), JNK e NF  $\kappa$ B. A NF  $\kappa$ B transloca para o núcleo celular e ativa genes reguladores das vias inflamatórias tais como o TNF- $\alpha$  e interleucinas 1 e 6 (ABU-SHANAB; QUIGLEY, 2010). Desta forma, LPS pode participar da patogênese da DHGNA por aumento da ingestão de gorduras ou por SBID.

Outro bioproduto de ação bacteriana no intestino que pode ter participação na DHGNA é o etanol. Como o padrão da lesão hepática na DHGNA é muito semelhante à lesão secundária ao uso de álcool, essa teoria é bastante atraente. O aumento de etanol endógeno foi observado em indivíduos com obesidade (NAIR *et al.*, 2001) e pacientes com EHNA (ZHU *et al.*, 2013) quando comparado a controles saudáveis. Zhu *et al.* (2013) identificaram maior concentração de *Escherichia coli* associada à EHNA. A *E. coli* degrada carboidratos por fermentação, sendo o etanol um dos produtos desse processo. Bactérias cultivadas a partir de fezes de obesos se mostraram capazes de produzir etanol *in vitro*, sendo a *Weissella confusa*, do filo Firmicutes, a maior produtora de álcool identificada (ELSHAGHABEE *et al.*, 2016). Estudos experimentais

destacam o aumento de etanol em camundongos obesos, com DHGNA e EHNA e a capacidade de diminuir essa produção com administração de antibióticos (COPE; RISBY; DIEHL, 2000; SAJJAD *et al.*, 2005).

Além desses mecanismos possivelmente envolvidos na gênese da DHGNA, o aumento da permeabilidade intestinal também parece colaborar para a lesão hepática. As primeiras descrições associaram o aparecimento de SBID em pós-operatório de *bypass* intestinal com EHNA reversível após tratamento com antibiótico (DRENICK, 1982). Em experimentos com ratos, EHNA foi induzida com SBID e era prevenida com uso de antibióticos (LICHTMAN *et al.*, 1991). Alguns trabalhos avaliaram pacientes com DHGNA e investigaram presença de SBID e alteração de permeabilidade intestinal. Wigg (2001) demonstrou maior prevalência de SBID em pacientes com DHGNA (50%) quando comparada a população saudável (22%), assim como níveis mais elevados de TNF- $\alpha$  entre os pacientes com hepatopatia. Entretanto, a permeabilidade intestinal, medida por teste duplo com ramnose e lactulose, foi semelhante nos dois grupos (WIGG, 2001), sendo este teste considerado de baixas sensibilidade e especificidade, especialmente na presença de SBID (BURES, 2010). Contudo, Miele *et al.* (2009), confirmaram a existência de aumento de permeabilidade intestinal com uso de teste de excreção urinária de  $^{51}\text{Cr}$  EDTA. Além disso, propuseram sua associação com a ruptura de junções intercelulares (*intercellular tight junctions*) por análise imuno-histoquímica da zona ocludens (ZO-1) em biópsia de duodeno de pacientes com DHGNA. Tanto a permeabilidade intestinal quanto o SBID foram associados à DHGNA e ao grau da esteatose, mas não com EHNA (MIELE *et al.*, 2009). Neste trabalho, um achado chama a atenção, apesar de não ter sido discutido no artigo publicado por não fazer parte do objetivo do estudo. Os pacientes com DHGNA foram analisados em dois grupos: com ou sem SBID. Interessantemente, estes dois grupos não apresentavam diferenças estatísticas nas avaliações de idade, sexo, dados antropométricos e grau histológico da doença hepática. Apenas um item apresentava diferença estatística entre os grupos. A SM estava presente em 11 de 21 (52,3%) pacientes com SBID, enquanto era evidenciada em apenas 1 de 14 (7,2%) pacientes sem SBID. Esta última prevalência foi menor do que a encontrada na população de voluntários saudáveis utilizados para controle, nos quais SBID foi documentado em cinco de 24 indivíduos (20,8%) (MIELE *et al.*, 2009).

Pesquisas também investigam associação qualitativa da microbiota com doenças metabólicas e DHGNA. A família Ruminococcaceae, do filo Firmicutes, foi associada com maior grau de fibrose em pacientes com DHGNA (BOURSIER *et al.*, 2016) e em pacientes magros com EHNA (DUARTE *et al.*, 2018). Por outro lado, há evidências de papel protetor de

algumas bactérias intestinais em relação à SM e à DHGNA. Nesse aspecto, tem destaque a *Akkermansia muciniphila*, bactéria gram negativa, anaeróbia, representante da ordem Verrucomicrobiales na microbiota intestinal humana (BELZER; VOS, 2012) isolada em 2004 (DERRIEN, 2004). Esse papel protetor parece estar associado à simbiose entre a *A. muciniphila* e o hospedeiro humano. Essa bactéria degrada a mucina como fonte de carbono e nitrogênio e estimula o turnover da barreira intestinal. Além disso, estudos experimentais demonstraram que esse processo gera oligossacáridos e AGCC que estimulam bactérias protetoras da barreira mucosa e a resposta imune, além de levar a estimulação gênica de vias metabólicas associadas ao Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma alfa (PPAR $\alpha$ ) (DERRIEN *et al.*, 2011). Há também evidências de relação negativa da *A. muciniphila* e o IFN  $\gamma$ , citocina relacionada com resistência insulínica (GREER *et al.*, 2016) e outras citocinas inflamatórias relacionadas com desordens metabólicas (SCHNEEBERGER *et al.*, 2015), influenciando a relação entre microbiota intestinal e hospedeiro, especialmente de pacientes com obesidade e DM2 (EVERARD *et al.*, 2013). Inspirados por esses dados, novos experimentos avaliam inclusive o potencial papel terapêutico dessa bactéria (NAITO; UCHIYAMA; TAKAGI, 2018; PLOVIER *et al.*, 2016; ZHAI *et al.*, 2018).

Diante disso, a afirmação de que a alteração da microbiota influencia a patogênese da DHGNA parece ter subsídios científicos bem encorpados. Contudo, não há ainda clareza da relação causal entre as alterações da microbiota intestinal e a DHGNA. Com os dados do estudo de Miele *et al.* (2009), a hipótese de que a SBID participa da DHGNA através da geração de distúrbios metabólicos deve ser mais bem avaliada. Além disso, o papel de microrganismos específicos na evolução de diferentes populações com DHGNA também carece de melhor definição (DUARTE *et al.*, 2018; GHETTI *et al.*, 2019).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 PRIMÁRIOS**

**2.1.1 Avaliar presença de SBID em pacientes com EHNA de acordo com seu perfil metabólico**

**2.1.2 Identificar particularidades da microbiota intestinal em pacientes com EHNA de acordo com seu perfil metabólico**

### **2.2 SECUNDÁRIO**

**2.2.1 Comparar o padrão da EHNA em pacientes com diferentes perfis metabólicos**

### 3 INDIVÍDUOS E MÉTODOS

#### 3.1 DESENHO DO ESTUDO

Estudo caso-controle com inclusão prospectiva dos pacientes com DHGNA recrutados por conveniência de acordo com a condição metabólica. Foi conduzido no ambulatório de DHGNA do Serviço de Gastroenterologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora (HU-UFJF), Minas Gerais, Brasil. Antes da inclusão no estudo, todos os indivíduos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) incluído no projeto de pesquisa (Apêndice A). A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética do HU-UFJF sob o número 10994513.0.0000.5133 (Apêndice B).

#### 3.2 INDIVÍDUOS

Foram selecionados pacientes na faixa etária de 18 a 70 anos com suspeita de DHGNA por achado sugestivo de esteatose ao exame de imagem sem outras hepatopatias identificáveis. Foram investigados e excluídos pacientes com doença hepática alcoólica (consumo de etanol acima de 20 g/dia para mulheres e 30 g/dia para homens), potencial de doença hepática induzida por droga, hepatites virais B ou C, doenças autoimunes do fígado, doença de Wilson e hemocromatose. Tais doenças foram descartadas por avaliação clínica e laboratorial descrita em seção específica. Os pacientes foram acompanhados ambulatorialmente por pelo menos seis meses com orientação de mudança de estilo de vida que incluiu estímulo a prática de atividade física e dieta orientados pelo médico de acordo com suas individualidades. Aqueles que mantiveram elevação de aminotransferases acima de 1,5 vezes o limite superior da normalidade foram convidados a participar do estudo. Os que concordaram foram submetidos à biópsia hepática e foram incluídos no estudo apenas os que tiveram confirmação histológica de EHNA, conforme descrito na seção de análise histológica.

Devido a potencial influência sobre a microbiota intestinal, não foram incluídos indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), com doença inflamatória intestinal, com síndrome do intestino irritável, pacientes com diabetes com complicações crônicas ou descompensados, além de doença hepática descompensada. Em relação aos pacientes com diabetes, foram considerados compensados aqueles em uso apenas de antidiabéticos orais e com glicemia de jejum estável abaixo de 180 mg/dl, parâmetro utilizado devido à indisponibilidade de dosagem da hemoglobina glicada. Para indivíduos com cirrose

hepática, foram incluídos os que apresentaram classificação A (cinco ou seis pontos) pelos critérios de Child-Pugh (Quadro 1) (PUGH *et al.*, 1973).

Quadro 1: Classificação de Child-Pugh

Dados Clínicos e Laboratoriais	1 ponto	2 pontos	3 pontos
Encefalopatia (grau)	Ausente	1 a 2	3 a 4
Ascite	Ausente	Discreta	Moderada a Volumosa
Tempo Protrombina (seg.)* ou RNI ou Atividade de Protrombina	<4 < 1,7 > 50%	4 a 6 1,7 a 2,3 40 a 50%	> 6 > 2,3 < 40%
Albumina (g/dl)	> 3,5	2,8 a 3,5	< 2,8
Bilirrubinas (mg/dl)	< 2	2 a 3	> 3
Resultados	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Child A: 5 a 6 pontos</li> <li>• Child B: 7 a 9 pontos</li> <li>• Child C: 10 a 15 pontos</li> </ul>		

\* Tempo de protrombina em segundos acima do controle

RNI, Razão Normalizada Internacional

Adaptado a partir de Pugh *et al.* (1973)

Após inclusão no estudo, os pacientes foram divididos em dois grupos: com e sem SM. A presença de SM foi definida pelos critérios do National Cholesterol Education Program (NCEP) (EXPERT PANEL ON DETECTION EVALUATION AND TREATMENT OF HIGH BLOOD CHOLESTEROL IN ADULTS, 2001) (Quadro 2)

Quadro 2: Critérios de Síndrome Metabólica pelo National Cholesterol Education Program

SM= presença de $\geq 3$ dos critérios abaixo	
Obesidade Abdominal	CA > 102 em homens CA > 88 em mulheres
Hipertrigliceridemia	$\geq 150$ mg/dl
HDL colesterol baixo	< 40 mg/dl em homens < 50 mg/dl em mulheres
Pressão Arterial elevada	PAS $\geq 130$ mmHg PAD $\geq 85$ mmHg
Glicemia de jejum elevada	$\geq 110$ mg/dl

SM, síndrome metabólica; CA, circunferência abdominal; HDL, high-density lipoprotein; PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica.

Adaptado a partir de Expert Panel On Detection Evaluation And Treatment Of High Blood Cholesterol In Adults (2001)

### 3.3 MÉTODOS

#### 3.3.1 Avaliação Clínica e Laboratorial

Todos os indivíduos selecionados para a pesquisa foram submetidos a avaliação clínica e laboratorial. O exame clínico avaliou sinais e sintomas de doença hepática e SM. O exame físico mínimo compreendeu checagem de dados antropométricos como peso, altura, índice de massa corpórea (IMC) e circunferência abdominal, investigação de sinais de hepatopatia crônica (encefalopatia hepática, icterícia, ascite, circulação colateral abdominal, edemas, eritema palmar, telangiectasias, ginecomastia, pilificação sexual secundária, entre outros), avaliação cardiovascular com aferição de pressão arterial (PA) e avaliação do abdome, em especial a palpação e percussão de fígado e baço. Conforme orientação da Organização Mundial da Saúde (OMS), padronizamos a medida da circunferência abdominal (CA) feita no ponto médio entre a face inferior da última costela e o topo da crista ilíaca (RILEY *et al.*, 2016).

A avaliação dos critérios de SM foi feita com pesquisa dos dados clínicos e laboratoriais que envolveu dosagem sérica de glicose, HDL colesterol e triglicérides (EXPERT PANEL ON DETECTION EVALUATION AND TREATMENT OF HIGH BLOOD CHOLESTEROL IN ADULTS, 2001) (Quadro 2). Foi realizada dosagem sérica de insulina para cálculo da RI pelo HOMA-IR (MATTHEWS *et al.*, 1985).

Em relação a avaliação hepática, foram testados a atividade enzimática de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gamaglutamiltranspeptidase (GGT) e fosfatase alcalina (FA). Os pacientes com doenças hepáticas que apresentaram fibrose avançada definida pela biópsia hepática, conforme descrito a seguir, foram avaliados funcionalmente pelos critérios de Child-Pugh (Quadro 1). Além desses, foram realizados exames para descartar outras possíveis hepatopatias: AgHBs, anti-VHC, fator antinúcleo (FAN), anticorpo antimúsculo liso (AAML), anticorpo antimitocôndria (AAM), ferritina, saturação da transferrina, ceruloplasmina e anti-HIV.

Os marcadores não invasivos de fibrose foram calculados a partir de seus parâmetros clínicos e laboratoriais. Para o NFS foram utilizados os dados de idade, IMC, glicose, ALT, AST, plaquetas e albumina e realizado o cálculo através do site oficial: <https://naflscore.com> (ANGULO *et al.*, 2007). O FIB-4 foi calculado a partir da idade, plaquetas, AST e ALT no aplicativo de livre acesso iLiver da EASL (European Association for the Study of the Liver) (SUN *et al.*, 2016). Os pontos de corte para definição de graus de fibrose foram divididos como baixo, intermediário e alto risco. Apresentavam baixo risco de fibrose aqueles com NFS < -

1,455 e FIB-4 < 1,3. Eram considerados de alto risco pontuações do NFS > 0,676 e FIB-4 > 2,67. Risco intermediário de fibrose foi considerado para aqueles com valores entre os de baixo e alto risco (ZHOU *et al.*, 2019).

Os testes laboratoriais foram realizados no laboratório de análises clínicas do HU-UFJF, obedecendo ao protocolo de conduta do Serviço de Gastroenterologia do HU-UFJF para avaliação da DHGNA. A Tabela 1 contém os testes laboratoriais realizados pelos pacientes incluídos no estudo.

Tabela 1: Testes laboratoriais

Objetivo	Exame
Avaliação de atividade inflamatória	AST ALT GGT
Avaliação de função hepática	Bilirrubina total e frações Proteína total e albumina Tempo Protrombina e RNI
Avaliação hematológica	Hemograma completo
Avaliação metabólica	Glicose, Insulina, HOMA-IR Colesterol total e frações, Triglicérides
Avaliação de etiologia de hepatopatia	Anti-VHC AgHBs AAML AAM FAN Ceruloplasmina Ferritina, Saturação de Transferrina
Avaliação de imunodeficiência pelo HIV	Anti-HIV 1 e 2

ALT, alanina aminotransferase; AST, aspartato aminotransferase; GGT, gamaglutamiltransferase; RNI, razão normalizada internacional; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; Anti-VHC, anticorpo antivírus da hepatite C; AgHBs, antígeno “s” da hepatite B; AAML, anticorpo antimúsculo liso; AAM, anticorpo antimitocôndria; FAN, fator antinúcleo; HIV, vírus da imunodeficiência humana; Anti-HIV, anticorpo antivírus da imunodeficiência humana.

### 3.3.2 Biópsia Hepática

A indicação de biópsia hepática seguiu a rotina do Serviço de Gastroenterologia do HU-UFJF adotada à época da realização desse estudo. Tal rotina foi baseada em protocolo de

conduta de acordo com o Grupo Brasileiro de Estudo da DHGNA da Sociedade Brasileira de Hepatologia (COTRIM *et al.*, 2011). Os pacientes com suspeita de DHGNA, após afastadas outras etiologias de hepatopatias, eram acompanhados por pelo menos seis meses sob orientação de mudanças de estilo de vida que incluíam atividade física e dieta de acordo com avaliação médica individual. Aqueles que mantinham elevação de enzimas hepáticas eram aconselhados a realizar biópsia hepática para confirmação diagnóstica e estadiamento da doença.

Foi considerado diagnóstico definitivo de EHNA a presença de esteatose acima de 5%, balonização hepatocitária e infiltrado inflamatório. As amostras também foram analisadas de acordo com o escore de atividade da DHGNA (*NAFLD activity score* - NAS) desenvolvido pelo *Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network* tanto para definição de EHNA (Tabela 2), quanto para estadiamento de fibrose (Tabela 3) (KLEINER *et al.*, 2005).

A técnica utilizada para biópsia hepática foi a punção percutânea do fígado, guiada por ultrassonografia, com agulha manual tipo *tru-cut* 14 G x 15 cm, conforme rotina do Serviço de Gastroenterologia do HU-UFJF em consonância com as recomendações habituais para coleta de tecido hepático para análise histológica (A GRANT; NEUBERGER, 1999).

Tabela 2: Escore histológico de atividade NAS (*NAFLD Activity Score*)

Item	Definição	Escore
Esteatose	< 5%	0
	5 a 33%	1
	33 a 66%	2
	> 66%	3
Inflamação Lobular	Nenhum foco	0
	< 2 focos/campo 200x	1
	2 a 4 focos/campo 200x	2
	> 4 focos/campo 200x	3
Balonização	Ausente	0
	Poucas células	1
	Muitas células	2
Interpretação		
Total do Escore	Diagnóstico	
0 a 2	Ausência de EHNA	
3 a 4	Limítrofe	
5 a 8	Definitivo para EHNA	

NAFLD, Non-Alcoholic Fatty Liver Disease; EHNA, esteato-hepatite não alcoólica  
Adaptado a partir de Kleiner *et al.* (2005).

Tabela 3: Estadiamento histológico da fibrose pelo NAS (*NAFLD activity score*)

Estágio da Fibrose	
0	Ausente
1	Perissinusoidal ou periportal
1A	Leve, restrito a zona 3, perissinusoidal
1B	Moderado, restrito a zona 3, perissinusoidal
1C	Portal / periportal
2	Perissinusoidal e portal / periportal
3	Fibrose em ponte
4	Cirrose

Adaptado a partir de Kleiner *et al.* (2005).

### 3.3.3 Teste Respiratório para Avaliação de SBID

Todos os pacientes com confirmação histológica de EHNA, 36 indivíduos, foram submetidos ao teste respiratório para detecção de SBID. Os testes foram realizados no aparelho QuinTron BreathTracker™ Digital MicroLyzer com avaliação de eliminação de hidrogênio (H<sub>2</sub>) e metano (CH<sub>4</sub>) expirados após ingestão de 15 ml de lactulose 667 mg/ml. A opção pela padronização com substrato lactulose foi para evitar o uso de glicose, levando em consideração que alguns pacientes tinham diabetes. O aparelho é um analisador que mede H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub> da amostra de gás em partes por milhão (ppm).

Cada paciente recebeu por escrito orientações padronizadas para realização do teste respiratório que envolveram cuidados nas quatro semanas que antecederam o exame com intuito de não modificar sua microbiota intestinal (Apêndice C). O exame foi feito após jejum de 10 horas. Cada indivíduo fez coleta de ar alveolar expirado em sacos coletores específicos antes do uso da lactulose (tempo 0') e após nos tempos 15', 30', 45', 60', 90' e 120'. As amostras coletadas foram imediatamente analisadas.

Os dados obtidos com a análise das amostras foram avaliados em curvas e considerados positivos para SBID as elevações de H<sub>2</sub> acima de 20 ppm ou de CH<sub>4</sub> acima de 10 ppm a partir da dosagem basal até 90' (REZAIE *et al.*, 2017).

### 3.3.4 Caracterização da Microbiota Fecal

No mesmo dia da realização do teste respiratório para avaliação de SBID, seguindo as orientações já mencionadas (Apêndice C), os pacientes levavam uma amostra de fezes coletada em frasco estéril e mantida refrigeradas por até 24 horas. As amostras dos pacientes foram

encaminhadas ao Laboratório de Ecologia e Biologia Molecular de Microrganismos da UFJF. As fezes foram processadas para análise microbiológica por hibridização *In Situ* fluorescente (FISH). Foram fixadas com paraformaldeído (concentração final 2%), e em cada amostra foi adicionada uma solução de Tween a 0,01%. Em seguida, as amostras foram sonicadas (Vibra Cell VCX 130PB, Sonics & Materials®) três vezes (gama 110,7  $\mu\text{m}$  por 60 segundos). Após a sonicação, foram centrifugadas a 500 g durante cinco minutos. O sobrenadante foi removido e o conteúdo remanescente foi lavado duas vezes com água ultrapura. As três frações sobrenadantes foram colocadas em um mesmo frasco e agitadas vigorosamente. Alíquotas de cada amostra foram diluídas (100x), filtradas em filtros de policarbonato (Nuclepore® - 0,2  $\mu\text{m}$ ) e armazenadas em um refrigerador até o processo de hibridização. Posteriormente, as amostras foram submetidas ao protocolo FISH (MEDEIROS *et al.*, 2014) para identificação e quantificação dos grupos microbianos de interesse. As sondas de oligonucleotídeos utilizadas para quantificação dos grupos microbianos são apresentadas na Tabela 4. Sonda de controle negativo (5'CCTAGTAGACGCCGTCGAC-3'), que não possui especificidade para nenhum grupo bacteriano, também foi utilizada para avaliação da eficiência da hibridização. As sondas foram marcadas com o fluorocromo Cy3 e as amostras foram analisadas com microscópio de epifluorescência (Olympus® BX-60), equipado com o conjunto de filtros ópticos U-N41007, U-MWU2, U-MWB2 e U-MWG2. A densidade dos microrganismos ( $\times 10^8$  células  $\text{g}^{-1}$ ) foi determinada por meio da contagem direta com ampliação de 100x.

### 3.3.5 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada por meio do software SPSS® (versão 16.0 para Windows. *SPSS Inc.*, Estados Unidos da América). Testes paramétricos e não paramétricos foram utilizados de acordo com os testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e de homogeneidade de variâncias (Levene). As variáveis contínuas foram representadas em média e desvio padrão. As variáveis categóricas foram expressas como frequência relativa e absoluta (n). Foi utilizado Correlação de Spearman para avaliar relações bivariadas entre as variáveis. Foi utilizado Teste T para amostras independentes ou U de Mann-Whitney para comparação, entre os grupos, das variáveis contínuas. Variáveis categóricas foram comparadas pelo Teste Qui-Quadrado ou Teste Exato de Fisher (entre os grupos). Foi adotado o nível de significância de 0,05 ( $\alpha = 5\%$ ). Níveis descritivos iguais ou inferiores a esse valor foram considerados significantes.

Tabela 4: Sondas de oligonucleotídeos usadas para quantificação microbiana por hibridização fluorescente *in situ*

Sonda	Grupo microbiano alvo	Sequência (5'-3')	FA	NaCl	Referência
ARCH 915	Domínio Archaea	GTGCTCCCCGCAATTCCT	20	225	Stahl <i>et al.</i> (1991)
LGC 354 A		TGGAAGATTCCTACTGC			
LGC 354 B	Filo Firmicutes	CGGAAGATTCCTACTGC	35	80	Meier <i>et al.</i> (1999)
LGC 354 C		CCGAAGATTCCTACTGC			
HCG 236	Actinobacteria phylum	AACAAGCTGATAGGCCGC	30	112	Erhart <i>et al.</i> (1997)
ACIDO 228	Acidobacteria phylum	TAATCDGCCGCGAMCYCCT	35	80	Neef <i>et al.</i> (1995)
ALF 968	Classe Alpha-proteobacteria	GGTAAGGTTCTGCGTTT	30	112	Manz <i>et al.</i> (1992)
BET 42 a	Classe Beta-proteobacteria	GCCTTCCCCTTCGTTT	30	112	Daims <i>et al.</i> (2001)
GAM 42 a	Classe Gamma-proteobacteria	GCCTTCCACATCGTTT	30	112	Daims <i>et al.</i> (2001)
EPSY 549	Classe Epsilon-proteobacteria	CAGTGATTCCGAGTAACG	30	112	Manz <i>et al.</i> (1996)
EUB 338 III	Ordem Verrucomicrobiales	GCTGCCACCCGTAGGTGT	30	112	Lin <i>et al.</i> (2006)
	Bacteroidetes:				
BAC 303	Maioria Bacteroidaceae, algumas Prevotellaceae, algumas Porphyromonadaceae	CCAATGTGGGGGACC	40	56	Kleinstauber <i>et al.</i> (2008)
CF 319 a	Maioria Flavobacteria, algumas Bacteroidetes, algumas Phingobacteria	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	35	80	Kleinstauber <i>et al.</i> (2008)
MUT 590	Streptococcus mutans	ACTCCAGACTTTCCTGAC	30	112	Trebesius <i>et al.</i> (2000)
SOB 174	Streptococcus sobrinus	TTAACTCCTCTTATGCGG			
Aero 2	Algumas Aeromonas	GTAACGTCACAGCCAGCAGA	35	80	Kyselková <i>et al.</i> (2009)
RUMs 278	Ruminococcaceae	GTCCGGCTACCGATCGCG	20	225	Xia <i>et al.</i> (2011)
Chis 150	Maioria Clostridium histolyticum (Clostridium grupo I e II)	TTATGCGGTATTAATCTYCCTTT	30	112	Franks <i>et al.</i> (1998)
Pint 649	Prevotella intermedia	GCCGCCRCTGAASTCAAGCC	40	56	Gmür <i>et al.</i> (2002)
Pnig 657	Prevotella nigrescens	TCCGCTGCGCTGCGTGTA			
Bif 164	Bifidobacterium spp.	CATCCGGCATTACCACCC	20	225	Langendijk <i>et al.</i> (1995)
Lacto 39					
Lacto 15	Lactobacillus	TCTGTTAGTTCGCTCGCTC	30	112	Demaneche <i>et al.</i> (2008)
Enc 1259	Enterococcus spp.	GAAGTCGCGAGGCTAAGC	35	80	Behr <i>et al.</i> (2000)
Enter 2	Enterococcus	TCCATCAGCGACACCCGAAA	35	80	Demaneche <i>et al.</i> (2008)
Efs 129	Enterococcus faecalis	CCCTCTGATGGGTAGGTT	35	80	Behr <i>et al.</i> (2000)
Eco 1167	Escherichia coli	GCATAAGCGTTCGCTGCCG	40	56	Neef <i>et al.</i> (1995)
	Bacteroides:				
B/TAFO	Tannerella forsythensis (Bacteroides forsythus)	CGTATCTCATTTTATTCCCCTGTA	30	112	Sunde <i>et al.</i> (2003)
Bfrag 602	Grupo Bacteroides fragilis	GAGCCGAAACTTTCACAA	30	112	Franks <i>et al.</i> (1998)
Bfrag 998	Bacteroides fragilis	GTTTCCACATCATTCCTACTG	30	112	Rigottier <i>et al.</i> (2003)

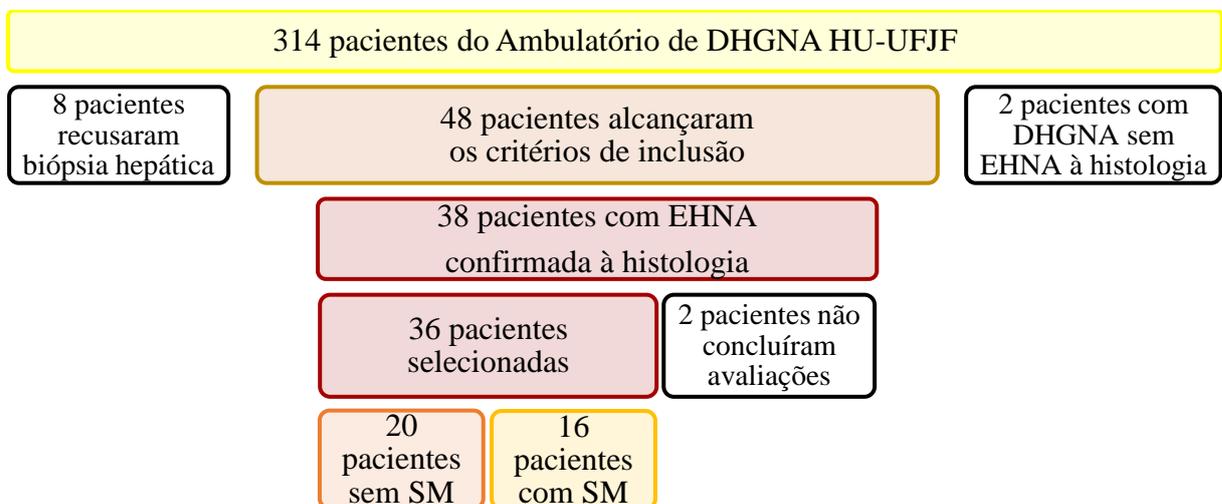
FA, concentração de formaldeído no tampão de hibridização; NaCl: concentração de cloreto de sódio em tampão de lavagem.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 PACIENTES

No período de junho de 2015 a julho de 2017, foram atendidos 314 pacientes no ambulatório de DHGNA do Serviço de Gastroenterologia do HU-UFJF. Quarenta e oito pacientes apresentavam indicação de biópsia hepática de acordo com os critérios adotados. Entretanto, oito pacientes recusaram-se a participar do estudo por rejeitarem a biópsia. Quarenta pacientes foram submetidos à biópsia. Dois pacientes não apresentavam critérios histológicos para EHNA e dois pacientes não concluíram as análises necessárias para o estudo. Após avaliação clínica, laboratorial e histológica, foram incluídos 36 pacientes que apresentaram confirmação de EHNA (Fluxograma 1).

Fluxograma 1: Recrutamento de pacientes



Amb de DHGNA HU-UFJF, ambulatório de doença hepática gordurosa não alcoólica do Serviço e Gastroenterologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora; DHGNA, doença hepática gordurosa não alcoólica; EHNA, esteato-hepatite não alcoólica; SM, síndrome metabólica.

As principais características clínicas, laboratoriais e histológicas dos grupos são apresentadas nas Tabelas 5 e 6. Do total de pacientes selecionados, 16 preenchem critérios para SM e 20 não apresentavam SM. Os dois grupos apresentaram indivíduos de idades semelhantes, com média na quinta década de vida. Houve predomínio significativo do gênero feminino entre os pacientes com SM e do masculino naqueles sem SM. Conforme esperado, houve diferença significativa entre os grupos com relação aos critérios de SM, além do IMC e do HOMA IR. Em contrapartida, não houve diferença na apresentação da doença hepática em nenhum dos

parâmetros estudados, como nível de aminotransferases, ferritina sérica, marcadores não invasivos de fibrose (NFS e FIB-4) e características histológicas.

Tabela 5: Avaliação clínica e laboratorial do perfil metabólico

	Sem SM (n = 20)	Com SM (n = 16)	p
Idade, anos	47,5 ( $\pm$ 10,5)	49,5 ( $\pm$ 9,8)	ns
Gênero	F 27,8% (5) / M 83,3% (15)	F 72,2% (13) / M 16,7% (3)	0,001
SM - nº critérios	1,15 ( $\pm$ 0,9)	3,9 ( $\pm$ 0,7)	<0,0001
Obesidade	45% (9)	75% (12)	0,020
CA aumentada	25% (5)	81,2% (13)	0,001
G alterada	10% (2)	43,8% (7)	0,050
HDL alterado	20% (4)	93,8% (15)	<0,0001
TG alterado	50% (10)	93,8% (15)	0,009
HAS	10% (2)	81,3% (13)	<0,0001
IMC, Kg/m <sup>2</sup>	29,95 ( $\pm$ 3,46)	33,8 ( $\pm$ 5,8)	0,020
HOMA IR	2,96 ( $\pm$ 1,04)	5,16 ( $\pm$ 2,54)	0,004

Dados apresentados como média e desvio-padrão ( $\pm$ ) ou em percentual da prevalência no grupo e número de indivíduos (n). Teste *t* de student para variáveis numéricas e Qui-quadrado para categóricas. Abreviações: Sem SM, grupo de esteato-hepatite sem síndrome metabólica; Com SM, grupo de esteato-hepatite com síndrome metabólica; F, feminino; M, masculino; SM - nº critérios: número de critérios da síndrome metabólica; CA, circunferência abdominal; G, glicemia; HDL, high-density lipoprotein; TG, triglicérides; HAS, hipertensão arterial sistêmica; IMC, índice de massa corpórea; HOMAR-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; ns, não significante.

Tabela 6: Avaliação laboratorial e histológica da hepatopatia

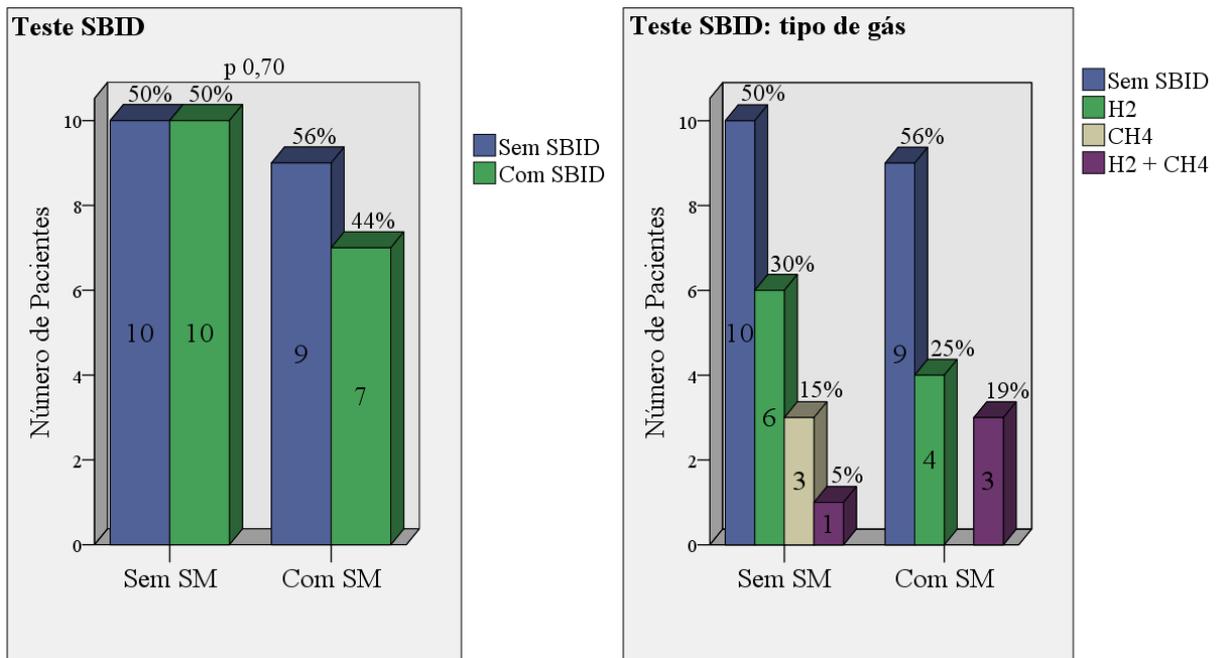
	Sem SM (n = 20)	Com SM (n = 16)	p
AST, U/l	47,5 ( $\pm$ 25,9)	47,1 ( $\pm$ 25,8)	ns
ALT, U/l	57,5 (26,5)	60,7 ( $\pm$ 38,3)	ns
GGT, U/l	77,6 (59,9)	92,4 ( $\pm$ 81,8)	ns
FTI, ng/ml	313,6 (185,7)	240,9 ( $\pm$ 173,8)	ns
PLT (x10 <sup>9</sup> /l)	212 ( $\pm$ 49)	235 ( $\pm$ 71)	ns
NFS	1,077 ( $\pm$ 1,433)	1,338 ( $\pm$ 1,524)	ns
FIB-4	1,6 ( $\pm$ 1,08)	1,53 ( $\pm$ 1,11)	ns
Biópsia			
Estadiamento da Fibrose $\geq$ 2	15% (3)	12,5% (2)	ns
Escore Histológico (NAS)			
Esteatose	2,15 ( $\pm$ 0,67)	2,5 ( $\pm$ 0,63)	ns
Inflamação Lobular	1,1 ( $\pm$ 0,64)	1,13 ( $\pm$ 0,5)	ns
Balonização	1,55 ( $\pm$ 0,68)	1,63 ( $\pm$ 0,5)	ns
NAS	4,8 ( $\pm$ 1,05)	5,19 ( $\pm$ 0,91)	ns

Dados apresentados como média e desvio-padrão ( $\pm$ ) ou em percentual da prevalência no grupo e número de indivíduos (n). Teste *t* de student para variáveis numéricas e Qui-quadrado para categóricas. Abreviações: Sem SM, grupo de esteato-hepatite sem síndrome metabólica; Com SM, grupo de esteato-hepatite com síndrome metabólica; ALT, alanina aminotransferase; AST, aspartato aminotransferase; GGT, gamaglutamiltransferase; FTI: ferritina; PLT, plaqueta; NFS, nafld fibrosis score; FIB-4, fibrosis-4 score; NAS, NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease ) Activity Score; ns, não significante.

## 4.2 SBID E EHNA

A avaliação de SBID determinada tanto por H<sub>2</sub> quanto por CH<sub>4</sub> foi frequente em toda amostra independente do perfil metabólico (Figura 2). Não houve diferença significativa também na prevalência de bactérias produtoras de H<sub>2</sub> ou CH<sub>4</sub> entre os dois grupos. SBID foi positivo em 44% (25% H<sub>2</sub> e 19% para ambos H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>) dos pacientes com SM e em 50% (30% H<sub>2</sub>, 15% CH<sub>4</sub> e 5% para ambos H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>) daqueles sem SM.

Figura 2: Teste respiratório para Supercrescimento Bacteriano do Intestino Delgado de acordo com o perfil metabólico

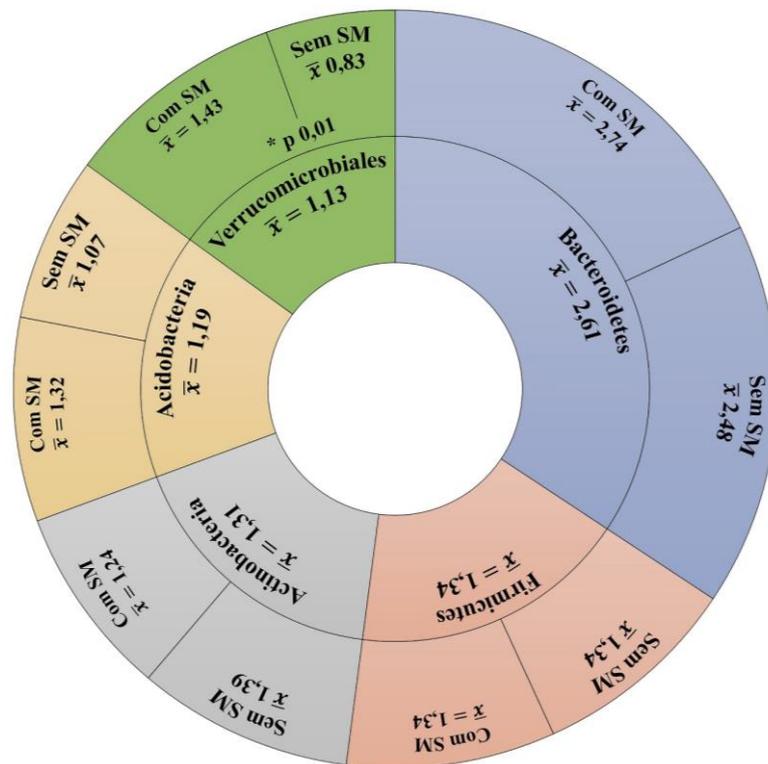


Teste SBID, teste respiratório para supercrescimento bacteriano do intestino delgado; Sem SM, grupo de esteato-hepatite sem síndrome metabólica; Com SM, grupo de esteato-hepatite com síndrome metabólica; Sem SBID, teste negativo para supercrescimento bacteriano de intestino delgado; Com SBID, teste positivo para supercrescimento bacteriano de intestino delgado; H<sub>2</sub>, gás hidrogênio; CH<sub>4</sub>, gás metano.

## 4.3 CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA FECAL NA EHNA

Em relação à análise qualitativa da microbiota, a diversidade e concentração foram semelhantes independente do perfil metabólico. Os filos predominantes em ordem de prevalência foram Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Acidobacteria e a ordem Verrucomicrobiales, pertencente ao filo Verrucomicrobia (Figura 3). A análise completa de todos os grupos estudados está apresentada na Tabela 7.

Figura 3: Proporção dos grupos predominantes na microbiota intestinal com sua distribuição de acordo com o perfil metabólico



Sem SM, grupo de esteato-hepatite sem síndrome metabólica; Com SM, grupo de esteato-hepatite com síndrome metabólica;  $\bar{x}$ , concentração média; p, diferença estatística expressa pelo valor de p.

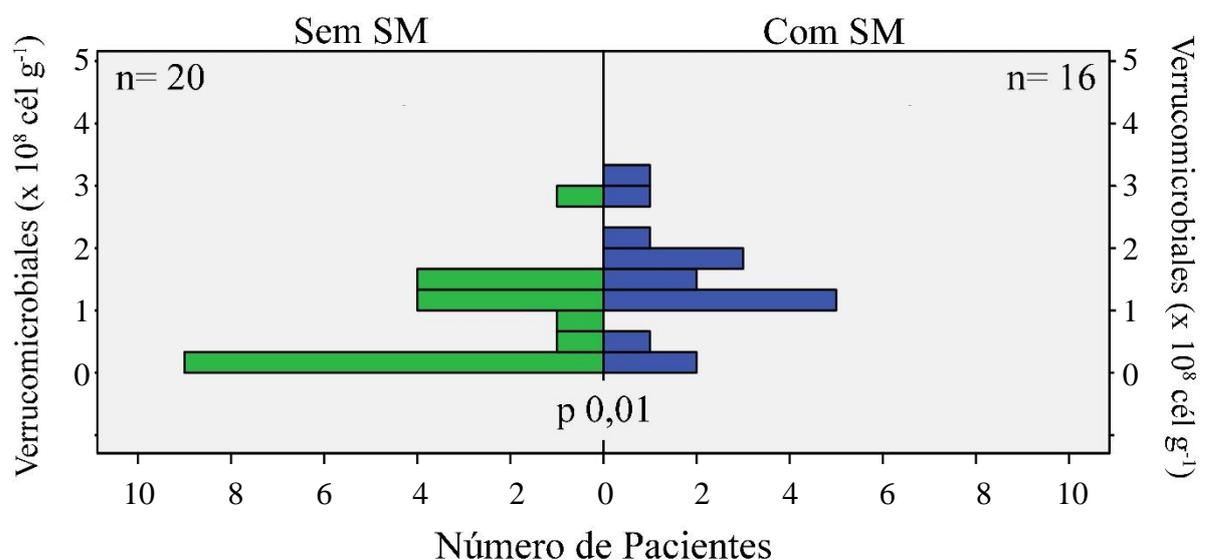
Tabela 7: Análise das concentrações dos grupos microbianos e sua distribuição de acordo com o perfil metabólico

Grupo Microbiano	Sem SM, média ( $\pm$ DP)	Com SM, média ( $\pm$ DP)	p
Bifidobacterium spp.	0,22 (0,098)	0,21 (0,095)	0,937
Lactobacillus	0,24 (0,108)	0,20 (0,076)	0,305
Enterococcus	0,28 (0,084)	0,28 (0,074)	1,000
Escherichia coli	0,30 (0,098)	0,29 (0,135)	0,386
Bacteroides	0,30 (0,100)	0,35 (0,105)	0,262
Prevotella	0,43 (0,089)	0,45 (0,133)	0,937
Streptococcus	0,28 (0,072)	0,29 (0,057)	0,694
Ruminococcaceae	0,24 (0,087)	0,29 (0,042)	0,058
Aeromonas	0,27 (0,080)	0,27 (0,051)	0,671
Clostridium	0,27 (0,116)	0,31 (0,088)	0,211
Bacteroidetes	2,49 (1,466)	2,77 (1,660)	0,560
Firmicutes	1,35 (0,633)	1,35 (0,806)	0,937
Actinobacteria	1,39 (0,775)	1,24 (0,788)	0,560
Acidobacteria	1,07 (0,708)	1,33 (0,625)	0,276
Archaea	0,93 (0,605)	0,88 (0,529)	0,888
Verrucomicrobiales	0,84 (0,724)	1,44 (0,823)	<b>0,016</b>

Sem SM, grupo de esteato-hepatite sem síndrome metabólica; Com SM, grupo de esteato-hepatite com síndrome metabólica; DP, desvio padrão; p, diferença estatística expressa pelo valor de p.

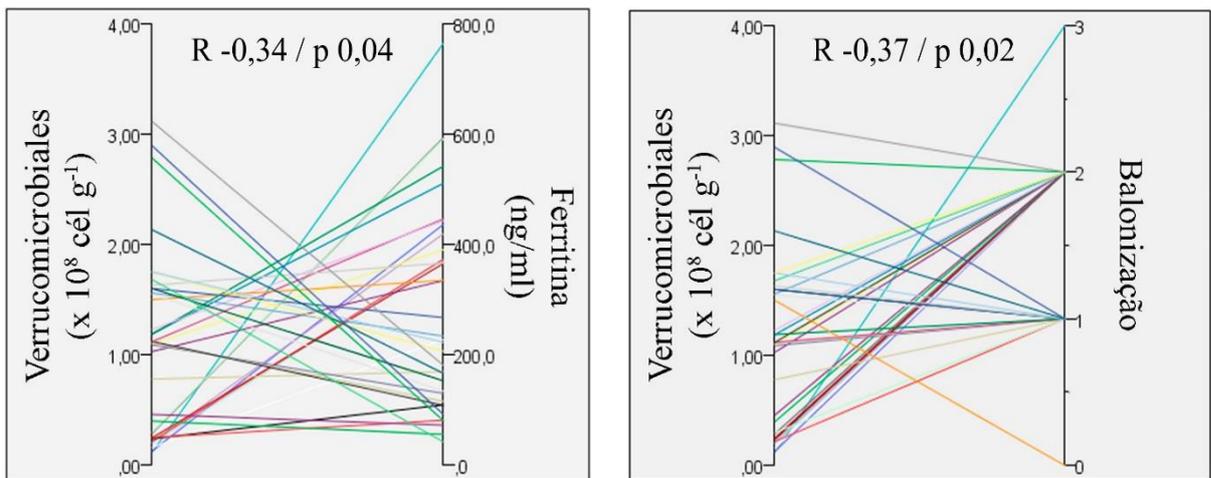
O único grupo de microrganismo a mostrar diferença significativa na população de acordo com a condição metabólica foi a ordem Verrucomicrobiales (Figura 4). Sua concentração média foi de  $0,83 \times 10^8$  células  $g^{-1}$  nos indivíduos sem SM comparada a  $1,44 \times 10^8$  células  $g^{-1}$  naqueles com SM ( $p$  0,01). Metade dos 20 pacientes sem SM tinham Verrucomicrobiales abaixo de  $1,0 \times 10^8$  células  $g^{-1}$ , enquanto naqueles com SM apenas em três dos 16 (18,7%) essas baixas concentrações foram observadas (Figura 4). Na análise de toda a amostra, essa ordem de bactérias apresentou correlação com número de critérios da SM ( $R$  0,485 /  $p$  0,003) e com IMC ( $R$  0,34 /  $p$  0,04). Por outro lado, teve correlação inversa com parâmetros relacionados à inflamação hepática. Indivíduos com maior concentração de Verrucomicrobiales apresentaram menor grau de balonização hepática ( $R$  -0,37 /  $p$  0,02) e menor nível sérico de ferritina ( $R$  -0,34 /  $p$  0,04) (Figura 5). Todos os outros grupos microbianos estudados tiveram a distribuição de suas concentrações semelhantes independente da condição metabólica. Entretanto, o estudo da família Ruminococcaceae (do filo Firmicutes) mostrou tendência ( $p$  0,058) de diferença de concentração, estando menos abundante no grupo sem SM. A Figura 6 apresenta o gráfico comparativo das concentrações de Verrucomicrobiales e Ruminococcaceae nos grupos com e sem SM.

Figura 4: Concentração de Verrucomicrobiales por frequência de indivíduos de acordo com o perfil metabólico



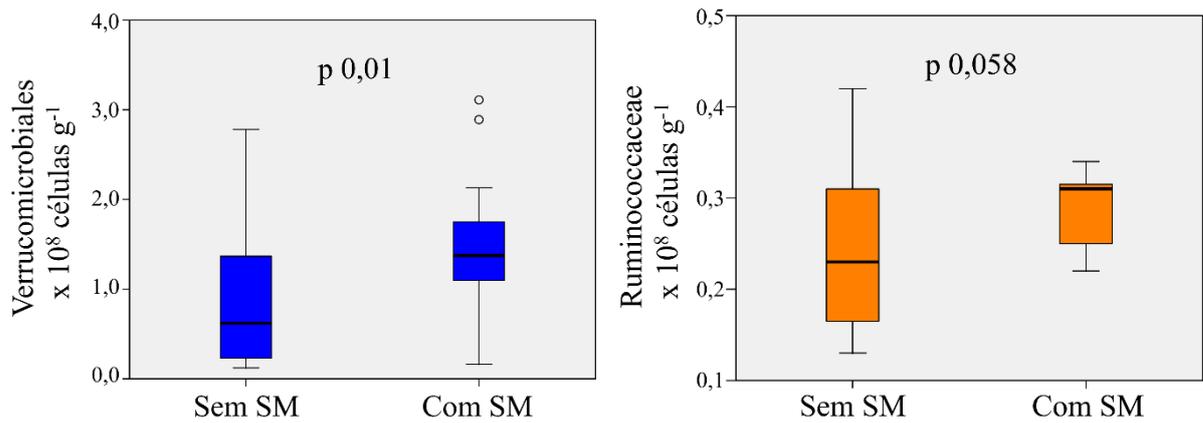
Sem SM, grupo de esteato-hepatite sem síndrome metabólica; Com SM, grupo de esteato-hepatite com síndrome metabólica; n, número de pacientes; p, diferença estatística expressa pelo valor de p.

Figura 5: Correlação inversa entre concentração de Verrucomicrobiales com ferritina sérica e balonização hepatocitária



R, Rô de Spearman; p, diferença estatística expressa pelo valor de p.

Figura 6: Comparação na distribuição de Verrucomicrobiales e Ruminococcaceae de acordo com o perfil metabólico



Sem SM, grupo de esteato-hepatite sem síndrome metabólica; Com SM, grupo de esteato-hepatite com síndrome metabólica; p, diferença estatística expressa pelo valor de p.

## 5 DISCUSSÃO

Nosso estudo teve como peculiaridade a pesquisa de diferenças na EHNA com ou sem SM. Entre todos os parâmetros avaliados na diferenciação dos grupos, o único significativo foi relacionado à microbiota intestinal.

A avaliação hepática foi semelhante entre os grupos, não havendo influência metabólica na gravidade da doença hepática nesse estudo. A maioria dos pacientes apresentava fibrose leve com estágio histológico  $F < 2$  em 85% do grupo sem SM e 87,5% do grupo com SM. Não houve diferença também em relação aos demais parâmetros histológicos, como grau de esteatose, balonização, inflamação e o escore de atividade (NAS). Os dois grupos também foram semelhantes em relação a todos os parâmetros laboratoriais tanto de avaliação de atividade inflamatória quanto de função hepática. Da mesma forma, os marcadores não invasivos de fibrose (NFS e FIB-4) não mostraram diferença entre pacientes com ou sem SM. Porém, vale ressaltar que, conforme os critérios adotados, não incluímos pacientes com cirrose hepática avançada e com diabetes com sinais de complicação pela potencial influência secundária dessas condições sobre a microbiota intestinal. A não inclusão desses pacientes pode ter influenciado no perfil de gravidade da hepatopatia em nossa amostra, especialmente no grupo com SM. Na população global de DHGNA, espera-se que quanto maior a gravidade da doença metabólica, maior o risco de progressão para fases avançadas ao longo do tempo (EKSTEDT *et al.*, 2006; RYAN *et al.*, 2005; STEPANOVA; RAFIQ; YOUNOSSI, 2010). Mas a não inclusão desses indivíduos não deve ter impactado no resultado do estudo que tem como objetivo identificar a associação da microbiota intestinal com DHGNA e não com o estado de doença hepática avançada.

Para avaliação da microbiota intestinal, foi pesquisado SBID pela detecção dos gases  $H_2$  e  $CH_4$  no ar expirado. Os estudos habitualmente avaliam apenas  $H_2$  expirado (MIELE *et al.*, 2009). A pesquisa de  $CH_4$  no presente estudo confere potencial de maior sensibilidade para identificação de SBID por identificar também grupos de microrganismos metanogênicos (MARTINS *et al.*, 2017). Foi identificada alta frequência de SBID entre os pacientes, conforme já demonstrado em outros estudos. (MIELE *et al.*, 2009; WIGG, 2001). Mas não houve diferença entre os grupos com ou sem SM. No grupo sem SM, houve aumento da sensibilidade com detecção de 15% de pacientes que apresentaram teste respiratório para SBID positivo apenas pelo  $CH_4$ . Apesar do aumento da sensibilidade com a detecção dos dois gases, o acréscimo de positividade por detecção de  $CH_4$  no estudo atual não foi estatisticamente significativo. O número de indivíduos estudados pode justificar a ausência de significância. Não

observamos associação de SBID com maior gravidade da ENHA, diferente do descrito no estudo de MIELE *et al.* (2009).

Contudo, na análise qualitativa da microbiota fecal, observamos diferença em dois grupos microbianos. Houve tendência estatística de menor concentração da família Ruminococcaceae no grupo sem SM. Esse dado está em consonância com o estudo de Duarte *et al.* (2018), que avaliou EHNA em indivíduos magros. Esta família de bactérias tem sido relacionada a maior presença de fibrose avançada em pacientes com EHNA (BOURSIER *et al.*, 2016). Essa relação não foi observada no grupo de pacientes do presente estudo, que apresentou baixa prevalência de fibrose avançada pelos critérios de exclusão adotados. O gênero *Ruminococcus* possui diferentes representantes na microbiota intestinal, algumas com ação metabólica benéfica, outras que exercem ação pró-inflamatória, hiperinsulinemia, aumento na produção de álcool endógeno e alteração na permeabilidade intestinal. Novos estudos são necessários para definir o real papel das Ruminococcaceae na DHGNA avaliando o papel de cada espécie dessa família sobre parâmetros metabólicos, inflamatórios e de associação a fibrogênese hepática (BOURSIER *et al.*, 2016).

A ordem Verrucomicrobiales também esteve menos populosa no grupo sem SM, porém com diferença significativa. A bactéria dessa família identificada na microbiota humana é a *Akkermansia muciniphila* (BELZER; VOS, 2012). Essa bactéria tem reconhecido papel protetor na barreira intestinal, além de estar associada ao estímulo do crescimento de grupos bacterianos favoráveis ao equilíbrio saudável do ecossistema intestinal e de auxiliar a resposta imune (BELZER; VOS, 2012; DERRIEN *et al.*, 2011). Ela já foi descrita em todo tubo digestivo, mas com predomínio em intestino delgado e cólon (GEERLINGS *et al.*, 2018). Desde sua identificação, vários estudos evidenciaram seu papel protetor para a barreira mucosa, constatando sua abundância em intestinos saudáveis e diminuição em condições em que há lesão e inflamação intestinal como na apendicite e nas doenças inflamatórias intestinais (PNG *et al.*, 2010; SWIDSINSKI *et al.*, 2009). A *A. muciniphila* também tem sido associada com destaque na influência sobre o perfil metabólico. Há evidências de relação negativa da *A. muciniphila* e o IFN  $\gamma$ , citocina relacionada com resistência insulínica (GREER *et al.*, 2016) e outras citocinas inflamatórias relacionadas com desordens metabólicas (SCHNEEBERGER *et al.*, 2015). Ela influencia a relação entre microbiota intestinal e hospedeiro e levam a estimulação gênica de vias metabólicas associadas ao PPAR $\alpha$ , especialmente em pessoas com obesidade e DM2 (EVERARD *et al.*, 2013).

No estudo de nossa equipe que avaliou o papel da dieta na EHNA, o grupo que recebeu intervenção dietética aumentou a concentração global de bactérias na análise da microbiota

fecal, enquanto no grupo controle foi observada a redução na concentração de Verrucomicrobiales (GHETTI *et al.*, 2019). A diminuição de Verrucomicrobiales, pelo seu papel benéfico sobre a barreira mucosa (DERRIEN *et al.*, 2011), pode gerar aumento da permeabilidade intestinal e conseqüente participação na agressão hepática (MIELE *et al.*, 2009). Cabe salientar ainda, a influência epigenética do padrão alimentar na DHGNA (LEE; FRISO; CHOI, 2014). Entretanto, a potencial atuação da microbiota nessa expressão gênica carece de investigação.

No presente estudo, menor concentração da Verrucomicrobiales foi associada ao aumento de balonização hepatocitária e a maiores níveis séricos de ferritina. A balonização é um marcador histológico de inflamação característico da EHNA. Nos pacientes que apresentaram hiperferritinemia, a saturação da transferrina foi normal e não houve diferença significativa entre os níveis de ferritina e o perfil metabólico. Nestes casos, a ferritina está provavelmente associada a atividade inflamatória da EHNA.

De forma interessante, as Verrucomicrobiales foram menos abundante em pacientes com EHNA do grupo sem SM. Metade dos pacientes com EHNA sem SM apresentavam concentração de Verrucomicrobiales abaixo de  $1,0 \times 10^8$  células  $g^{-1}$  com média de  $0,82 \times 10^8$  células  $g^{-1}$ . Já no grupo com SM, apenas 18,7% apresentavam concentração abaixo de  $1,0 \times 10^8$  células  $g^{-1}$  com média de  $1,44 \times 10^8$  células  $g^{-1}$  (p 0,01). O grupo com menor abundância de Verrucomicrobiales tem DHGNA sem o substrato habitual das alterações metabólicas. Nesses casos, a etiopatogênese da lesão hepática é ainda motivo de controvérsia e o possível papel da microbiota intestinal é foco de grande interesse.

Apesar da limitação do presente estudo de não poder atribuir relação de causa e efeito, nossos resultados sugerem que a menor abundância da Verrucomicrobiales aumente o risco de atividade inflamatória em pacientes com DHGNA, especialmente em pacientes com EHNA sem SM.

Os pacientes sem SM são de difícil adequação terapêutica, tendo em vista que as medidas para controle metabólico que são a base da conduta na DHGNA não se justificam para o seu perfil. O papel da microbiota intestinal, em particular, a menor concentração das Verrucomicrobiales, abre espaço para novos estudos. Alguns experimentos vêm sendo conduzidos, analisando o papel terapêutico da *A. muciniphila* como probiótico (NAITO; UCHIYAMA; TAKAGI, 2018; PLOVIER *et al.*, 2016; ZHAI *et al.*, 2018). Embora em período curto de intervenção dietética, Ghetti *et al.* (2019) demonstraram que a dieta foi capaz de manter níveis de Verrucomicrobiales. Novos estudos com intervenção dietética de longo prazo são

necessários para demonstrar seu papel na modulação da microbiota em geral, com melhor controle do processo inflamatório da EHNA, em especial para os pacientes sem SM.

Muitas pesquisas têm contribuído para o entendimento da imbricada relação entre a microbiota intestinal e a progressão da DHGNA. Entretanto, o entendimento de como todo ecossistema intestinal interage influenciando ou sendo influenciado por desequilíbrios orgânicos ainda carece de maiores pesquisas.

## 6 CONCLUSÃO

No presente estudo, a frequência de SBID em pacientes com EHNA foi elevada. Porém, não houve diferença dessa condição entre os diferentes perfis metabólicos. Contudo, na avaliação da microbiota fecal, identificou-se importante associação inversa entre a concentração da ordem Verrucomicrobiales com marcadores de inflamação associados à EHNA. Esse grupo de bactérias foi menos abundante em pacientes com EHNA sem SM. Na população estudada, os marcadores de inflamação e fibrose hepática foram semelhantes para os dois perfis metabólicos.

## REFERÊNCIAS

- ABU-SHANAB, Ahmed; QUIGLEY, Eamonn M. M.. The role of the gut microbiota in nonalcoholic fatty liver disease. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, [s.l.], v. 7, n. 12, p.691-701, 2 nov. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2010.172>.
- AGOPIAN, Vatche G. et al. Liver Transplantation for Nonalcoholic Steatohepatitis. **Annals Of Surgery**, [s.l.], v. 256, n. 4, p.624-633, out. 2012. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/sla.0b013e31826b4b7e>.
- ALIPOURFARD, Iraj; DATUKISHVILI, Nelly; MIKELADZE, Davit. TNF- $\alpha$  Downregulation Modifies Insulin Receptor Substrate 1 (IRS-1) in Metabolic Signaling of Diabetic Insulin-Resistant Hepatocytes. **Mediators Of Inflammation**, [s.l.], v. 2019, p.1-6, 4 fev. 2019. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2019/3560819>.
- AMARAPURKAR, Deepak et al. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease: population based study. **Annals Of Hepatology**, [s.l.], v. 6, n. 3, p.161-163, jul. 2007. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1665-2681\(19\)31922-2](http://dx.doi.org/10.1016/s1665-2681(19)31922-2)
- ANGULO, Paul et al. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, [s.l.], v. 30, n. 6, p.1356-1362, dez. 1999. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.510300604>.
- ANGULO, Paul et al. The NAFLD fibrosis score: A noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. **Hepatology**, [s.l.], v. 45, n. 4, p.846-854, 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.21496>.
- BACKHED, F. et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 101, n. 44, p.15718-15723, 25 out. 2004. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0407076101>.
- BÄCKHED, Fredrik et al. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 104, n. 3, p.979-984, 8 jan. 2007. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0605374104>.
- BELZER, Clara; VOS, Willem M de. Microbes inside—from diversity to function: the case of Akkermansia. **The Isme Journal**, [s.l.], v. 6, n. 8, p.1449-1458, 22 mar. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2012.6>.
- BERTOT, Luis Calzadilla; ADAMS, Leon. The Natural Course of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 17, n. 5, p.1-12, 20 maio 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms17050774>.
- BORGO, Francesca et al. Relative Abundance in Bacterial and Fungal Gut Microbes in Obese Children: A Case Control Study. **Childhood Obesity**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.78-84, fev. 2017. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/chi.2015.0194>.

BOURSIER, Jérôme et al. The severity of nonalcoholic fatty liver disease is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota. **Hepatology**, [s.l.], v. 63, n. 3, p.764-775, 13 jan. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.28356>.

BROWNING, Jeffrey D. et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: Impact of ethnicity. **Hepatology**, [s.l.], v. 40, n. 6, p.1387-1395, 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.20466>

BROWNING, Jeffrey D. et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: Impact of ethnicity. **Hepatology**, [s.l.], v. 40, n. 6, p.1387-1395, 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.20466>.

BURES, Jan. Small intestinal bacterial overgrowth syndrome. **World Journal Of Gastroenterology**, [s.l.], v. 16, n. 24, p.2978-2990, 2010. Baishideng Publishing Group Inc.. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v16.i24.2978>.

CAMPO, José del et al. Genetic and Epigenetic Regulation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 19, n. 3, p.1-11, 19 mar. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19030911>.

CANI, P. D. et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. **Gut**, [s.l.], v. 58, n. 8, p.1091-1103, 24 fev. 2009. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/gut.2008.165886>.

CANI, P. D. et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. **Diabetologia**, [s.l.], v. 50, n. 11, p.2374-2383, 6 set. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-007-0791-0>.

CLARK, Jeanne M.; BRANCATI, Frederick L.; DIEHL, Anna Mae. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. **The American Journal Of Gastroenterology**, [s.l.], v. 98, n. 5, p.960-967, maio 2003. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1572-0241.2003.07486.x>.

COPE, Keary; RISBY, Terence; DIEHL, Anna Mae. Increased gastrointestinal ethanol production in obese mice: Implications for fatty liver disease pathogenesis. **Gastroenterology**, [s.l.], v. 119, n. 5, p.1340-1347, nov. 2000. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1053/gast.2000.19267>.

COSTELLO, E. K. et al. Bacterial Community Variation in Human Body Habitats Across Space and Time. **Science**, [s.l.], v. 326, n. 5960, p.1694-1697, 5 nov. 2009. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1177486>.

COTRIM, Helma P. et al. Nonalcoholic fatty liver disease in Brazil. Clinical and histological profile. **Annals Of Hepatology**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.33-37, jan. 2011. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1665-2681\(19\)31584-4](http://dx.doi.org/10.1016/s1665-2681(19)31584-4).

CZAJA, Mark J. Liver injury in the setting of steatosis: Crosstalk between adipokine and cytokine. **Hepatology**, [s.l.], v. 40, n. 1, p.19-22, 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.20328>

DELZENNE, Nathalie M.; CANI, Patrice D.. Interaction Between Obesity and the Gut Microbiota: Relevance in Nutrition. **Annual Review Of Nutrition**, [s.l.], v. 31, n. 1, p.15-31, 21 ago. 2011. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-nutr-072610-145146>

DENG, Yingfeng; SCHERER, Philipp E.. Adipokines as novel biomarkers and regulators of the metabolic syndrome. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 1212, n. 1, p.1-19, nov. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05875.x>

DERRIEN, M.. Akkermansia muciniphila gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [s.l.], v. 54, n. 5, p.1469-1476, 1 set. 2004. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.02873-0>.

DERRIEN, Muriel et al. Modulation of Mucosal Immune Response, Tolerance, and Proliferation in Mice Colonized by the Mucin-Degrader Akkermansia muciniphila. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 2, p.1-14, 2011. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2011.00166>.

DING, Shengli et al. High-Fat Diet: Bacteria Interactions Promote Intestinal Inflammation Which Precedes and Correlates with Obesity and Insulin Resistance in Mouse. **Plos One**, [s.l.], v. 5, n. 8, p.12191-12191, 16 ago. 2010. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0012191>.

DONATI, Benedetta et al. MBOAT7 rs641738 variant and hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic individuals. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.1-10, 3 jul. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-04991-0>.

DONNELLY, Kerry L. et al. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **Journal Of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 115, n. 5, p.1343-1351, 2 maio 2005. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci23621>.

DOWMAN, J. K.; TOMLINSON, J. W.; NEWSOME, P. N.. Systematic review: the diagnosis and staging of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, [s.l.], v. 33, n. 5, p.525-540, 29 dez. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2036.2010.04556.x>.

DRENICK, EJ; FISLER J; JOHSON D. Hepatic Steatosis After Intestinal Bypass-Prevention and Reversal by Metronidazole, Irrespective of Protein-Calorie Malnutrition. **Gastroenterology**, Los Angeles, v. 3, n. 82, p.535-548, out. 1982.

DUARTE, S.m.b. et al. Gut microbiome composition in lean patients with NASH is associated with liver damage independent of caloric intake: A prospective pilot study. **Nutrition, Metabolism And Cardiovascular Diseases**, [s.l.], v. 28, n. 4, p.369-384, abr. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.numecd.2017.10.014>.

EJTAHED, H.-s. et al. Gut Microbiota as a Target in the Pathogenesis of Metabolic Disorders: A New Approach to Novel Therapeutic Agents. **Hormone And Metabolic Research**, [s.l.], v. 48, n. 06, p.349-358, 20 maio 2016. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0042-107792>.

EKSTEDT, Mattias et al. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. **Hepatology**, [s.l.], v. 44, n. 4, p.865-873, 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.21327>.

ELSHAGHABEE, Fouad M. F. et al. Ethanol Production by Selected Intestinal Microorganisms and Lactic Acid Bacteria Growing under Different Nutritional Conditions. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 7, p.1-13, 29 jan. 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00047>.

EVERARD, A. et al. Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 110, n. 22, p.9066-9071, 13 maio 2013. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1219451110>.

EXPERT PANEL ON DETECTION EVALUATION AND TREATMENT OF HIGH BLOOD CHOLESTEROL IN ADULTS. 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**, [s.l.], v. 285, n. 19, p.2486-2497, 16 maio 2001. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jama.285.19.2486>.

FELDSTEIN, Ariel E. et al. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- $\alpha$  expression via a lysosomal pathway. **Hepatology**, [s.l.], v. 40, n. 1, p.185-194, jul. 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.20283>.

GEERLINGS, Sharon et al. Akkermansia muciniphila in the Human Gastrointestinal Tract: When, Where, and How?. **Microorganisms**, [s.l.], v. 6, n. 3, p.1-26, 23 jul. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms6030075>.

GHETTI, Fabiana de Faria et al. Effects of Dietary Intervention on Gut Microbiota and Metabolic-Nutritional Profile of Outpatients with Non-Alcoholic Steatohepatitis: a Randomized Clinical Trial. **Journal Of Gastrointestinal And Liver Diseases**, [s.l.], v. 28, n. 3, p.279-287, 1 set. 2019. Romanian Society of Gastroenterology and Hepatology. <http://dx.doi.org/10.15403/jgld-197>.

GHETTI, Fabiana de Faria et al. Influence of gut microbiota on the development and progression of nonalcoholic steatohepatitis. **European Journal Of Nutrition**, [s.l.], v. 57, n. 3, p.861-876, 5 set. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00394-017-1524-x>.

GHOSHAL, Sarbani et al. Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides. **Journal Of Lipid Research**, [s.l.], v. 50, n. 1, p.90-97, 24 set. 2008. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.m800156-jlr200>.

GRANT, A; NEUBERGER, J. Guidelines on the use of liver biopsy in clinical practice. **Gut**, [s.l.], v. 45, n. 4, p.1-11, 1 out. 1999. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/gut.45.2008.iv1>.

GREER, Renee L. et al. Akkermansia muciniphila mediates negative effects of IFN $\gamma$  on glucose metabolism. **Nature Communications**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.1-13, 14 nov. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms13329>.

HAO, Wei-long; LEE, Yuan-kun. Microflora of the Gastrointestinal Tract: A Review. **Public Health Microbiology**, [s.l.], p.491-502, 2004. Humana Press. <http://dx.doi.org/10.1385/1-59259-766-1:491>.

HILL, J. O. Obesity and the Environment: Where Do We Go from Here? **Science**, [s.l.], v. 299, n. 5608, p.853-855, 7 fev. 2003. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1079857>.

HU, Gang et al. Body Mass Index, Waist Circumference, and Waist-Hip Ratio on the Risk of Total and Type-Specific Stroke. **Archives Of Internal Medicine**, [s.l.], v. 167, n. 13, p.1420-1427, 9 jul. 2007. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/archinte.167.13.1420>.

HUANG, Zongsheng et al. Correlation between PNPLA3 rs738409 polymorphism and hepatocellular carcinoma: a meta-analysis of 10,330 subjects. **The International Journal Of Biological Markers**, [s.l.], v. 34, n. 2, p.117-122, 11 mar. 2019. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/1724600818812471>.

KLEINER, David E. et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, [s.l.], v. 41, n. 6, p.1313-1321, 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.20701>.

KOWDLEY, Kris V. et al. Serum ferritin is an independent predictor of histologic severity and advanced fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, [s.l.], v. 55, n. 1, p.77-85, 6 dez. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.24706>.

LARSEN, Nadja et al. Gut Microbiota in Human Adults with Type 2 Diabetes Differs from Non-Diabetic Adults. **Plos One**, [s.l.], v. 5, n. 2, p.9085-9085, 5 fev. 2010. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0009085>.

LAUGERETTE, Fabienne et al. Complex links between dietary lipids, endogenous endotoxins and metabolic inflammation. **Biochimie**, [s.l.], v. 93, n. 1, p.39-45, jan. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2010.04.016>.

LEE, Joo; FRISO, Simonetta; CHOI, Sang-woon. Epigenetic Mechanisms Underlying the Link between Non-Alcoholic Fatty Liver Diseases and Nutrition. **Nutrients**, [s.l.], v. 6, n. 8, p.3303-3325, 21 ago. 2014. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu6083303>.

LEVIN, Barry E.; KEESEY, Richard E.. Defense of differfing body weight set points in diet-induced obese and resistant rats. **American Journal Of Physiology-regulatory, Integrative And Comparative Physiology**, [s.l.], v. 274, n. 2, p.412-419, fev. 1998. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.1998.274.2.r412>

LEY, R. E. et al. Obesity alters gut microbial ecology. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 102, n. 31, p.11070-11075, 20 jul. 2005. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0504978102>.

LEY, Ruth E. et al. Human gut microbes associated with obesity. **Nature**, [s.l.], v. 444, n. 7122, p.1022-1023, dez. 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/4441022a>

LICHTMAN, Steven N. et al. Hepatic injury associated with small bowel bacterial overgrowth in rats is prevented by metronidazole and tetracycline. **Gastroenterology**, [s.l.], v. 100, n. 2, p.513-519, fev. 1991. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0016-5085\(91\)90224-9](http://dx.doi.org/10.1016/0016-5085(91)90224-9).

LUCAS, Christiana et al. A systematic review of the present and future of non-alcoholic fatty liver disease. **Clinical And Experimental Hepatology**, [s.l.], v. 4, n. 3, p.165-174, 2018. Termedia Sp. z.o.o.. <http://dx.doi.org/10.5114/ceh.2018.78120>.

MACHADO, Mariana V.; CORTEZ-PINTO, Helena. Gut microbiota and nonalcoholic fatty liver disease. **Annals Of Hepatology**, [s.l.], v. 11, n. 4, p.440-449, jul. 2012. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1665-2681\(19\)31457-7](http://dx.doi.org/10.1016/s1665-2681(19)31457-7).

MALHI, Harmeet; GORES, Gregory. Molecular Mechanisms of Lipotoxicity in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Seminars In Liver Disease**, [s.l.], v. 28, n. 04, p.360-369, 27 out. 2008. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0028-1091980>.

MARTINS, Carolina Piedade et al. PREVALENCE OF SMALL INTESTINE BACTERIAL OVERGROWTH IN PATIENTS WITH GASTROINTESTINAL SYMPTOMS. **Arquivos de Gastroenterologia**, [s.l.], v. 54, n. 2, p.91-95, 23 fev. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0004-2803.201700000-06>.

MARUVADA, Padma et al. The Human Microbiome and Obesity: Moving beyond Associations. **Cell Host & Microbe**, [s.l.], v. 22, n. 5, p.589-599, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2017.10.005>.

MATTHEWS, D. R. et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and  $\beta$ -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, [s.l.], v. 28, n. 7, p.412-419, jul. 1985. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00280883>.

MCNEILL, A. M. et al. The Metabolic Syndrome and 11-Year Risk of Incident Cardiovascular Disease in the Atherosclerosis Risk in Communities Study. **Diabetes Care**, [s.l.], v. 28, n. 2, p.385-390, 27 jan. 2005. American Diabetes Association. <http://dx.doi.org/10.2337/diacare.28.2.385>

MEDEIROS, Jd et al. Characterization of the microbial community in a lotic environment to assess the effect of pollution on nitrifying and potentially pathogenic bacteria. **Brazilian Journal Of Biology**, [s.l.], v. 74, n. 3, p.612-622, ago. 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.26712>.

MEIER, Harald et al. Specific Oligonucleotide Probes for in situ Detection of a Major Group of Gram-positive Bacteria with low DNA G+C Content. **Systematic And Applied Microbiology**, [s.l.], v. 22, n. 2, p.186-196, maio 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0723-2020\(99\)80065-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0723-2020(99)80065-4).

MEIGS, James B. et al. Body Mass Index, Metabolic Syndrome, and Risk of Type 2 Diabetes or Cardiovascular Disease. **The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [s.l.], v. 91, n. 8, p.2906-2912, ago. 2006. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2006-0594>.

MELDRUM, David R.; MORRIS, Marge A.; GAMBONE, Joseph C.. Obesity pandemic: causes, consequences, and solutions—but do we have the will?. **Fertility And Sterility**, [s.l.], v. 107, n. 4, p.833-839, abr. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.02.104>.

MIELE, Luca et al. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, [s.l.], v. 49, n. 6, p.1877-1887, 23 jan. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.22848>.

MORIS, Wenke et al. Hyperferritinemia in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Iron Accumulation or Inflammation?. **Seminars In Liver Disease**, [s.l.], v. 39, n. 04, p.476-482, 22 jul. 2019. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0039-1693114>.

NAGHAVI, Mohsen et al. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet**, [s.l.], v. 390, n. 10100, p.1151-1210, set. 2017. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)32152-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(17)32152-9).

NAIR, Satheesh et al. Obesity and female gender increase breath ethanol concentration: potential implications for the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. **The American Journal Of Gastroenterology**, [s.l.], v. 96, n. 4, p.1200-1204, abr. 2001. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1572-0241.2001.03702.x>.

NAITO, Yuji; UCHIYAMA, Kazuhiko; TAKAGI, Tomohisa. A next-generation beneficial microbe: Akkermansia muciniphila. **Journal Of Clinical Biochemistry And Nutrition**, [s.l.], v. 63, n. 1, p.33-35, 2018. The Society for Free Radical Research Japan. <http://dx.doi.org/10.3164/jcbrn.18-57>.

OZKUL, Ceren et al. Determination of certain bacterial groups in gut microbiota and endotoxin levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis. **The Turkish Journal Of Gastroenterology**, [s.l.], v. 28, n. 5, p.361-369, 20 set. 2017. AVES Publishing Co.. <http://dx.doi.org/10.5152/tjg.2017.17033>.

POLYZOS, Stergios A. et al. The role of adiponectin in the pathogenesis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. **Diabetes, Obesity And Metabolism**, [s.l.], v. 12, n. 5, p.365-383, 30 mar. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1463-1326.2009.01176.x>.

PLOVIER, Hubert et al. A purified membrane protein from Akkermansia muciniphila or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. **Nature Medicine**, [s.l.], v. 23, n. 1, p.107-113, 28 nov. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.4236>.

PNG, Chin Wen et al. Mucolytic Bacteria With Increased Prevalence in IBD Mucosa Augment In Vitro Utilization of Mucin by Other Bacteria. **American Journal Of Gastroenterology**,

[s.l.], v. 105, n. 11, p.2420-2428, nov. 2010. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1038/ajg.2010.281>.

POUPEAU, Audrey; POSTIC, Catherine. Cross-regulation of hepatic glucose metabolism via ChREBP and nuclear receptors. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular Basis Of Disease**, [s.l.], v. 1812, n. 8, p.995-1006, ago. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.03.015>.

PUGH, R. N. H. et al. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. **British Journal Of Surgery**, [s.l.], v. 60, n. 8, p.646-649, ago. 1973. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bjs.1800600817>.

REZAIIE, Ali et al. Hydrogen and Methane-Based Breath Testing in Gastrointestinal Disorders: The North American Consensus. **American Journal Of Gastroenterology**, [s.l.], v. 112, n. 5, p.775-784, maio 2017. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1038/ajg.2017.46>.

RILEY, Leanne et al. The World Health Organization STEPwise Approach to Noncommunicable Disease Risk-Factor Surveillance: Methods, Challenges, and Opportunities. **American Journal Of Public Health**, [s.l.], v. 106, n. 1, p.74-78, jan. 2016. American Public Health Association. <http://dx.doi.org/10.2105/ajph.2015.302962>.

RIORDAN, Stephen M. et al. Small intestinal mucosal immunity and morphometry in luminal overgrowth of indigenous gut flora. **The American Journal Of Gastroenterology**, [s.l.], v. 96, n. 2, p.494-500, fev. 2001. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1572-0241.2001.03533.x>.

ROSENGREN, Annika et al. Body mass index, coronary heart disease and stroke in Swedish women. A prospective 19-year follow-up in the BEDA study. **European Journal Of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation**, [s.l.], v. 10, n. 6, p.443-450, dez. 2003. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1097/01.hjr.0000085253.65733.ef>.

ROY, Tiphaine Le et al. Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. **Gut**, [s.l.], v. 62, n. 12, p.1787-1794, 29 nov. 2012. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303816>.

RYAN, M. C. et al. Associations Between Liver Histology and Severity of the Metabolic Syndrome in Subjects With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Diabetes Care**, [s.l.], v. 28, n. 5, p.1222-1224, 26 abr. 2005. American Diabetes Association. <http://dx.doi.org/10.2337/diacare.28.5.1222>.

SAJJAD, A. et al. Ciprofloxacin suppresses bacterial overgrowth, increases fasting insulin but does not correct low acylated ghrelin concentration in non-alcoholic steatohepatitis. **Alimentary Pharmacology And Therapeutics**, [s.l.], v. 22, n. 4, p.291-299, ago. 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2036.2005.02562.x>.

SAYINER, Mehmet et al. Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis in the United States and the Rest of the World. **Clinics In Liver Disease**, [s.l.], v. 20, n. 2, p.205-214, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cld.2015.10.001>.

SCHEITHAUER, Torsten P.m. et al. Causality of small and large intestinal microbiota in weight regulation and insulin resistance. **Molecular Metabolism**, [s.l.], v. 5, n. 9, p.759-770, set. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmet.2016.06.002>.

SCHNABL, Bernd; BRENNER, David A.. Interactions Between the Intestinal Microbiome and Liver Diseases. **Gastroenterology**, [s.l.], v. 146, n. 6, p.1513-1524, maio 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2014.01.020>.

SCHNEEBERGER, Marc et al. Akkermansia muciniphila inversely correlates with the onset of inflammation, altered adipose tissue metabolism and metabolic disorders during obesity in mice. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.1-14, 13 nov. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep16643>.

SELBER-HNATIW, Susannah et al. Human Gut Microbiota: Toward an Ecology of Disease. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 8, p.1-19, 17 jul. 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.01265>.

SOOKOIAN, Silvia; PIROLA, Carlos J.. Meta-analysis of the influence of I148M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, [s.l.], v. 53, n. 6, p.1883-1894, 14 maio 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.24283>.

STEPANOVA, M.; RAFIQ, N.; YOUNOSSI, Z. M.. Components of metabolic syndrome are independent predictors of mortality in patients with chronic liver disease: a population-based study. **Gut**, [s.l.], v. 59, n. 10, p.1410-1415, 26 jul. 2010. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/gut.2010.213553>.

STOLS-GONÇALVES, Daniela et al. NAFLD and Atherosclerosis: Two Sides of the Same Dysmetabolic Coin?. **Trends In Endocrinology & Metabolism**, [s.l.], p.1-12, out. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2019.08.008>.

SUN, Wenjing et al. Comparison of FIB-4 index, NAFLD fibrosis score and BARD score for prediction of advanced fibrosis in adult patients with non-alcoholic fatty liver disease: A meta-analysis study. **Hepatology Research**, [s.l.], v. 46, n. 9, p.862-870, 16 fev. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/hepr.12647>.

SVEGLIATI-BARONI, Gianluca et al. A Model of Insulin Resistance and Nonalcoholic Steatohepatitis in Rats. **The American Journal Of Pathology**, [s.l.], v. 169, n. 3, p.846-860, set. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2006.050953>.

SWIDSINSKI, A. et al. Acute appendicitis is characterised by local invasion with Fusobacterium nucleatum/necrophorum. **Gut**, [s.l.], v. 60, n. 1, p.34-40, 18 nov. 2009. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/gut.2009.191320>.

TAPPY, Luc. Metabolic consequences of overfeeding in humans. **Current Opinion In Clinical Nutrition And Metabolic Care**, [s.l.], v. 7, n. 6, p.623-628, nov. 2004. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/00075197-200411000-00006>.

TURNBAUGH, Peter J. et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. **Nature**, [s.l.], v. 457, n. 7228, p.480-484, 30 nov. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature07540>.

TURNBAUGH, Peter J. et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, [s.l.], v. 444, n. 7122, p.1027-1031, dez. 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature05414>

VERNON, G.; BARANOVA, A.; YOUNOSSI, Z. M.. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, [s.l.], v. 34, n. 3, p.274-285, 30 maio 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2036.2011.04724.x>.

WELTMAN, Martin D. et al. Hepatic cytochrome P450 2E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, [s.l.], v. 27, n. 1, p.128-133, jan. 1998. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.510270121>

WIGG, A J. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. **Gut**, [s.l.], v. 48, n. 2, p.206-211, 1 fev. 2001. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/gut.48.2.206>.

WILDMAN, Rachel P. et al. Cardiovascular Disease Risk of Abdominal Obesity vs. Metabolic Abnormalities. **Obesity**, [s.l.], v. 19, n. 4, p.853-860, 19 ago. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1038/oby.2010.168>.

WILLIAMS, Christopher D. et al. Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis Among a Largely Middle-Aged Population Utilizing Ultrasound and Liver Biopsy: A Prospective Study. **Gastroenterology**, [s.l.], v. 140, n. 1, p.124-131, jan. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2010.09.038>.

WU, Xiaokang et al. Molecular Characterisation of the Faecal Microbiota in Patients with Type II Diabetes. **Current Microbiology**, [s.l.], v. 61, n. 1, p.69-78, 20 jan. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-010-9582-9>.

XIONG, Y. et al. Short-chain fatty acids stimulate leptin production in adipocytes through the G protein-coupled receptor GPR41. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 101, n. 4, p.1045-1050, 13 jan. 2004. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.2637002100>

ZELBER-SAGI, Shira et al. The association between adipocytokines and biomarkers for nonalcoholic fatty liver disease-induced liver injury. **European Journal Of Gastroenterology & Hepatology**, [s.l.], v. 24, n. 3, p.262-269, mar. 2012. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/meg.0b013e32834f15dd>.

ZHAI, Qixiao et al. A next generation probiotic, Akkermansia muciniphila. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, [s.l.], p.1-10, 29 out. 2018. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2018.1517725>.

ZHOU, Jiang-hua et al. Noninvasive evaluation of nonalcoholic fatty liver disease: Current evidence and practice. **World Journal Of Gastroenterology**, [s.l.], v. 25, n. 11, p.1307-1326, 21 mar. 2019. Baishideng Publishing Group Inc.. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v25.i11.1307>.

ZHU, Lixin et al. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: A connection between endogenous alcohol and NASH. **Hepatology**, [s.l.], v. 57, n. 2, p.601-609, 8 jan. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.26093>.

ZOIS, Christos D. Steatosis and steatohepatitis in postmortem material from Northwestern Greece. **World Journal Of Gastroenterology**, [s.l.], v. 16, n. 31, p.3944-3949, 2010. Baishideng Publishing Group Inc.. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v16.i31.3944>.

## APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP HU/UFJF  
JUIZ DE FORA – MG – BRASIL

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Biorrepositório)

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa “Síndrome de Supercrecimento Bacteriano do Intestino Delgado associada à Síndrome Metabólica e à Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica”. Neste estudo pretendemos avaliar a relação entre a população bacteriana no intestino e a presença de alterações no metabolismo e talvez na inflamação do fígado.

Para tanto, pedimos a sua autorização para a coleta, o depósito, o armazenamento, a utilização e descarte do material biológico humano (sangue, urina e fezes), cuja utilização está expressamente vinculada somente a esse projeto de pesquisa. Nesta pesquisa pretendemos fazer uma avaliação sobre como está a sua alimentação, suas medidas corporais, seus exames de sangue e saúde do seu intestino. Para esta pesquisa adotaremos os seguintes procedimentos: aplicação de questionários, avaliação das medidas corporais, exames de sangue, gás expirado, coleta de urina, coleta de fezes e biópsia hepática. Todas as avaliações serão realizadas no Hospital Universitário da UFJF – HU, Unidade Dom Bosco. A partir dessas avaliações será elaborado um plano alimentar individualizado com devidas orientações nutricionais. Para os indivíduos portadores de doenças hepáticas haverá um acompanhamento nutricional mensal durante três meses, sendo que todas as avaliações iniciais, exceto a biópsia hepática, serão repetidas para sabermos os efeitos da dieta sobre todos os procedimentos realizados. Sangue, urina e fezes serão armazenados em freezers apropriados e após análise serão descartados.

Este estudo apresenta **riscos** relacionados à: **punção venosa** para coleta de sangue que será realizada por um profissional habilitado, utilizando apenas materiais descartáveis, podendo causar dor e hematomas locais; à **biópsia hepática** que pode levar à dor local, hemorragia, perfuração de órgãos internos e infecção; e ao **teste respiratório para pesquisa de supercrescimento bacteriano e avaliação de permeabilidade intestinal** que podem causar náusea, vômitos e diarreia temporária. Os riscos envolvidos na pesquisa são minimizados, pois todos os procedimentos serão realizados por pessoas treinadas.

A pesquisa contribuirá para compreensão do impacto da dieta no estado nutricional e nas alterações encontradas na doença hepática gordurosa não alcoólica (esteatose).

Para participar deste estudo o Sr. (a) não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, o Sr.(a) tem assegurado o direito à indenização. O Sr. (a) terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar e a qualquer tempo e sem quaisquer prejuízos, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado no Biorrepositório, valendo a desistência a partir da data de formalização desta. A sua participação é voluntária, e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que o Sr. (a) é atendido (a) pelo pesquisador, que tratará a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão.

O (A) Sr. (a) não será identificado (a) em nenhuma publicação que este estudo possa resultar.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no Hospital Universitário, e a outra será fornecida ao Sr. (a). Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos, e após esse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos.

Eu, \_\_\_\_\_, portador do documento de Identidade \_\_\_\_\_ fui informado (a) dos objetivos da pesquisa “Síndrome de Supercrescimento Bacteriano do Intestino Delgado associada à Síndrome Metabólica e à Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica” de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

Declaro que concordo em participar. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Juiz de Fora, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

Nome	Assinatura participante	Data
------	-------------------------	------

Nome	Assinatura pesquisador	Data
------	------------------------	------

Nome	Assinatura testemunha	Data
------	-----------------------	------

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o CEP-HU – Comitê de Ética em Pesquisa HU/UFJF  
Hospital universitário Unidade Santa Catarina  
Prédio da Administração Sala 27  
CEP 36036-110  
E-mail: cep.hu@ufjf.edu.br

Pesquisador Responsável: Fábio Heleno de Lima Pace  
Serviço de Gastroenterologia do HU-CAS  
Endereço: Av. Eugênio do Nascimento s/nº Bairro: Dom Bosco  
CEP: 36038-330 – Juiz de Fora – MG  
Fone: (32) 4009-5300  
E-mail: lima.pace@ufjf.edu.br

**APÊNDICE B – Aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa**

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
JUIZ DE FORA-MG

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Síndrome de Supercrescimento Bacteriano do Intestino Delgado associada à Síndrome Metabólica e à Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica

**Pesquisador:** fabio heleno de lima pace

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 10994513.0.0000.5133

**Instituição Proponente:** Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora-MG

**Patrocinador Principal:** FUNDACAO DE DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 371.659

**Data da Relatoria:** 26/08/2013

**Apresentação do Projeto:**

Dentro das normas deste CEP.

**Objetivo da Pesquisa:**

Avaliar presença de SBID em portadores de DHGNA

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos relacionados a coleta de sangue: dor local, hematoma. Riscos relacionados a biópsia hepática: dor local transitória, hemorragia (1 em 500/1000), perfuração de órgãos internos, infecção, pneumotórax

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Aprovado.

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

De acordo com as normas do CEP.

**Recomendações:**

Sem recomendações .

**Endereço:** Rua Catulo Breviglieri, s/n- Comitê de Ética

**Bairro:** Bairro Santa Catarina

**CEP:** 36.036-110

**UF:** MG

**Município:** JUIZ DE FORA

**Telefone:** (32)4009-5205

**Fax:** (32)4009-5160

**E-mail:** cep.hu@ufjf.edu.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
JUIZ DE FORA-MG



Continuação do Parecer: 371.659

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

Sem recomendações ou pendências .

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

JUIZ DE FORA, 26 de Agosto de 2013

---

**Assinador por:**  
**Gisele Aparecida Fófano**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Catulo Breviglieri, s/n- Comitê de Ética  
**Bairro:** Bairro Santa Catarina **CEP:** 36.036-110  
**UF:** MG **Município:** JUIZ DE FORA  
**Telefone:** (32)4009-5205 **Fax:** (32)4009-5160 **E-mail:** cep.hu@ufjf.edu.br

## APÊNDICE C – ORIENTAÇÕES PARA REALIZAÇÃO DO TESTE RESPIRATÓRIO COM HIDROGÊNIO E METANO EXALADOS

### ORIENTAÇÕES PARA REALIZAÇÃO DO TESTE RESPIRATÓRIO COM HIDROGÊNIO E METANO EXALADOS

Paciente: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

Horário: \_\_\_ : \_\_\_ h

#### 4 SEMANAS ANTES DO TESTE:

- Não ter realizado colonoscopia, enema opaco ou outros exames que requeiram lavagem intestinal.
- Não ter feito uso de qualquer antibiótico.

#### 1 SEMANA ANTES DO TESTE:

- Não usar laxativos (dulcolax®, lactopurga®, lactulona®, etc.).
- Suspender omeprazol ou semelhantes.

#### 1 DIA ANTES DO TESTE:

- Não fumar e não ingerir bebidas alcoólicas.
- Não mascar chicletes ou chupar balas de menta.
- Não usar produtos para limpeza da boca ou fazer gargarejos (enxaguatórios bucais).
- Evitar alimentos ricos em fibras (frutas, hortaliças, aveia, linhaça etc.).

#### 10 HORAS ANTES DO TESTE:

- Não comer ou beber nada, inclusive água.

#### NO DIA DO TESTE:

- Tomar os medicamentos habituais empregando mínima quantidade de água.
- Evitar fumar, dormir e exercitar-se vigorosamente por pelo menos 30 minutos antes do início do teste e durante o mesmo.

#### APÓS O TESTE:

- Voltar às atividades habituais e ao trabalho.
- Alimentar-se normalmente após o teste (de acordo com a rotina diária).

#### PARA PACIENTES DIABÉTICOS:

- Se fizer uso de insulina ou comprimidos para diabetes o ideal é que o seu médico assistente lhe oriente como deverá proceder.

**HOSPITAL UNIVERSITÁRIO – UFJF**  
**UNIDADE DOM BOSCO – CENTRO DE ATENÇÃO À SAÚDE (HU-CAS)**  
**Setor de Endoscopia Digestiva – 1º andar**  
 Unidade Dom Bosco, Av. Eugênio do Nascimento s/nº, Bairro Dom Bosco