SEBASTIÃO MAURO BEZERRA DUARTE

Avaliação da microbiota intestinal na doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientadora: Prof. Dra. Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira
Coorientador: Dr. José Tadeu Stefano

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Duarte, Sebastião Mauro Bezerra
Avaliação da microbiota intestinal na doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) / Sebastião Mauro Bezerra Duarte. -- São Paulo, 2019.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências em Gastroenterologia.
Orientadora: Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira.
Coorientador: José Tadeu Stefano.

Descritores: 1.Hepatopatia gordurosa não alcoólica 2.Esteato-hepatite não alcoólica 3.Microbioma gastrointestinal 4.Obesidade 5.Sobrepeso

USP/FM/DBD-344/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

SEBASTIÃO MAURO BEZERRA DUARTE

Avaliação da microbiota intestinal na doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientadora: Prof. Dra. Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira
Coorientador: Dr. José Tadeu Stefano

São Paulo

2019

A vida me ensinou e está me ensinando a aproveitar o presente, como um presente que da vida recebi, e usá-lo como um diamante que eu mesmo tenha que lapidar, lhe dando forma da maneira que eu escolher.

Charlie Chaplin

À minha família, em especial meus pais José Pedro Duarte e Maria Luzinete Duarte pelo amor incondicional e, a meus amigos, que participaram e me inspiraram para que eu concluísse mais esta etapa de minha vida acadêmica.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira, Professora Associada do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), minha orientadora, pelo seu profissionalismo e exemplo de ética, agradeço a orientação profissional e pessoal durante a execução deste trabalho.

Ao Dr. José Tadeu Stefano, Pesquisador do Laboratório de Gastroenterologia Clínica e Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), meu coorientador, amigo e incentivador, pela oportunidade, empenho, confiança e paciência pelas inúmeras correções do texto desta tese.

À Profa. Dra. Ester Cerdeira Sabino, Professora Associada do Departamento de Moléstias Infecciosas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e Diretora do Instituto de Medicina Tropical da FMUSP, e aos pesquisadores Marcela de Souza Basqueira e Lucas Franco pelo sequenciamento das amostras e análise dos resultados deste trabalho.

À toda equipe da Divisão de Medicina Interna, Gastroenterologia e Hepatologia, Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma, Itália, em especial ao Prof. Dr. Antônio Gasbarrini, Dr. Luca Mielle e Dra. Francesca R. Ponziani pela ajuda nas análises estatísticas e na elaboração do artigo científico.

Aos residentes e funcionários do Ambulatório de Doença hepática gordurosa não alcoólica (A2MG700) da Disciplina de Gastroenterologia Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), pelo cuidado e presteza no encaminhamento dos pacientes para participação neste estudo.

Ao Prof. Dr. Daniel Ferraz de Campos Mazo, Dr. Mario Guimarães Pessoa e Dra. Graziela Rosa Ravacci, pelas sugestões dadas no exame de qualificação, que com certeza contribuíram para qualidade científica desta tese.

À Vilma de Jesus Libério, secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), pela disponibilidade e solicitude.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro concedido.

À todos os pacientes do Ambulatório de Doença hepática gordurosa não alcoólica (A2MG700) da Disciplina de Gastroenterologia Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), pela colaboração e disposição em participar deste estudo.

Esta tese está de acordo com:

Referências: Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancuver).*

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP*. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS i
LISTA DE SÍMBOLOS iv
LISTA DE TABELAS v
LISTA DE FIGURAS vi
RESUMO viii
SUMMARY xi
1. INTRODUÇÃO 1
1.1 Microbiota intestinal (MI) 1
1.2 Microbiota intestinal (MI) e obesidade 4
1.3 Microbiota intestinal (MI) e Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) 10
1.4. Justificativa 18
2. OBJETIVOS 19
2.1 Objetivo geral 19
2.2 Objetivos específicos 19
3. MÉTODOS 20
3.1. Casuística 20
3.2. Considerações Éticas 20
3.3. Critérios de Inclusão 21
3.4. Critérios de Exclusão 21
3.5. Avaliação Nutricional 22
3.6. Avaliação Antropométrica e da Composição Corporal 22
3.6.1. Parâmetros Antropométricos 22
3.7. Avaliação Clínica 25
3.7.1. Métodos de dosagens laboratoriais 25
3.8. Avaliação Histológica 26
3.9 Análise da Microbiota Intestinal (MI) 28
3.9.1 Extração 28
3.9.2 Sequenciamento de Nova Geração 29

3.9.3 Metodologia de *Primer Fusion* 29
3.9.4 Preparo do *pool* equimolar das bibliotecas amplificadas 30
3.9.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR) em emulsão 30
3.9.6 Enriquecimento 30
3.9.7 Reação de Sequenciamento 31
3.9.8 Carregamento do CHIP 31
3.9.9 Análise dos resultados 31
3.10 Análises Estatísticas 32
4. RESULTADOS 36
5. DISCUSSÃO 59
6. CONCLUSÕES 69
7. ANEXOS 71
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADH	Álcool desidrogenase
AG	Ácidos graxos
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AGL	Ácidos graxos livres
ALT	Alanina aminotransferase
AMPK	Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina
AST	Aspartato amino transferase
CA	Circunferência abdominal
CAP	Parâmetro de atenuação controlada
CHC	Carcinoma hepatocelular
CT	Colesterol total
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
EHNA	Esteato-hepatite não alcoólica
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FIAF	*Fasting induced adipose factor*
FXR	*Farnesoid X receptor*
GGT	Gama glutamil transferase
GI	Gastrointestinal

GLP1	*Glucagon-like peptide 1*
GLUT-1	Transportador de glicose-1
GPCRs	Receptores acoplados a proteína G
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de massa corpórea
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
LPL	Lipase lipoprotéica
LPS	Lipopolissacarídeos
MI	Microbiota intestinal
NALFD	*Nonalcoholic fatty liver disease*
NAS	*NALFD Activity Score*
NF-kB	Fator de transcrição kappa B
OTUs	Unidades taxonômicas operacionais
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PYY	peptídeo YY
RI	Resistencia insulínica
SCBID	Supercrescimento bacteriano do intestino delgado
SI	Sensibilidade à insulina
SII	Síndrome do intestino irritável
SM	Síndrome metabólica
TG	Triglicérides

TGF-β	Fator de transformação de crescimento beta
TGR-5	Receptor de ácido biliar acoplado à proteína G-5
TLRs	*Toll-like receptors*
TLR4	*Toll-like receptor-4*
TMA	Trimetilamina
TMAO	N-óxido de trimetilamina
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
VLDL-C	Lipoproteína de muito baixa densidade

LISTA DE SÍMBOLOS

%	por cento
=	igual a
<	menor que
±	mais ou menos que
µL	microlitro
cm	centímetros
g	gramas
kcal	quilocalorias
kg	quilogramas
m	metros
m^2	metros quadrados
mg/ dL	miligrama por decilitro
ºC	graus Celsius
pb	pares de base
U/ L	unidade por litro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação do Índice de massa corpórea (IMC) 24

Tabela 2. Classificação do Índice de massa corpórea (IMC) para indivíduos idosos (acima de 65 anos) 24

Tabela 3. Classificação de Kleiner e colaboradores (2005) (80) para o estadiamento da fibrose hepática secundária à Esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) e cálculo do escore de atividade necroinflamatória [*NALFD Activity Score* (NAS)] 27

Tabela 4. Características demográficas, comorbidades e variáveis bioquímicas dos indivíduos do estudo 37

Tabela 5. Análise da quantidade diferencial de filos bacterianos entre os grupos de pacientes magros, com sobrepeso e obesos e com Esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) e de indivíduos (magros e obesos) sem Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) utilizados como controle 39

Tabela 6. Análise da quantidade diferencial de gêneros bacterianos entre os grupos de pacientes magros, com sobrepeso e obesos e com Esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) e indivíduos (magros e obesos) sem Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) utilizados como controle 43

Tabela 7. Ingestão calórica, de macronutrientes e de fibras dos indivíduos do estudo 57

Tabela 8. Distribuição dos escores de atividade necroinflamatória (NAS) e estadiamento da fibrose hepática secundária à EHNA dos pacientes do estudo segundo a classificação de Kleiner e colaboradores (2005) (80) 58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos propostos para explicar a relação da microbiota intestinal (MI) com o aumento de gordura corporal. A MI pode levar à supressão intestinal de *Fasting induced adipose factor* (FIAF), que intensifica a atividade da lipase lipoproteica (LPL) desencadeando maior absorção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e triglicérides (TG). Este mecanismo contribui para o desenvolvimento da Síndrome metabólica (SM) e acúmulo de ácidos graxos (AG) hepáticos. A MI também pode regular a deposição de gordura no fígado e no músculo pela alteração dos níveis de Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK), que monitora os níveis de energia celular e estimula a oxidação de AG em tecidos periféricos 7

Figura 2. Esquema das possíveis vias, elucidando como a microbiota intestinal (MI) pode levar a progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). A MI, quando em disbiose, favorece o ganho de gordura corporal e desempenha um papel fundamental na progressão da DHGNA por meio de diferentes vias, incluindo: o aumento da extração de energia a partir de dieta, a mudança na expressão de genes envolvidos na lipogênese *de novo*, a regulação do metabolismo da colina, o aumento da produção de etanol endógeno e o desequilíbrio no sistema imunológico 17

Figura 3. Análise de coordenadas principais (PCoA), baseada na matriz de distância UniFrac ponderada para Unidades taxonômicas operacionais (OTUs) (Qiime). Estratificação dos indivíduos de acordo com o índice de massa corpórea (IMC) e presença ou ausência de Esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) 38

Figura 4. *Volcano plot* de *log fold change* (*logFC*) e *p-value –log*10 que comparam a quantidade bacteriana em pacientes magros com Esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) e em indivíduos (magros e obesos) sem Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) utilizados como controle 50

Figura 5. *Volcano plot* de *log fold change* (*logFC*) e *p-value –log*10 que comparam a quantidade bacteriana em pacientes obesos e com sobrepeso com Esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) e em indivíduos (magros e obesos) sem Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) utilizados como controle 51

Figura 6. *Volcano plot* de *log fold change* (*logFC*) e *p-value –log*10 que comparam a quantidade bacteriana em pacientes magros, obesos e sobrepeso com Esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) 52

Figura 7. Alfa diversidade bacteriana (índice de Shannon) de pacientes magros, com sobrepeso e obesos e com Esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) e indivíduos (magros e obesos) sem Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) utilizados como controle de acordo com o Índice de massa corpórea (IMC) 54

RESUMO

Duarte SMB. *Avaliação da microbiota intestinal na doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

A Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é uma das formas mais comuns de doença hepática, relacionada primordialmente ao aumento progressivo da obesidade no mundo. Cerca de 10-25% dos pacientes com DHGNA desenvolvem Esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) e os fatores responsáveis pela progressão de esteatose para EHNA ainda não estão totalmente elucidados. Antecedentes genéticos, microbiota intestinal (MI), fatores ambientais, tais como, sedentarismo e dieta inadequada, devem ser considerados fatores críticos para o desenvolvimento de distúrbios metabólicos, como obesidade, síndrome metabólica, diabetes e DHGNA. O objetivo do presente estudo foi comparar a MI de indivíduos com sobrepeso, obesos e magros com e sem EHNA a fim de delinear diferenças fenotípicas entre os grupos. Foi realizado um estudo transversal que incluiu 13 pacientes com EHNA comprovada por biópsia (4 magros com EHNA, 5 com sobrepeso e com EHNA e 4 obesos com EHNA) e 10 indivíduos (magros e obesos) sem DHGNA utilizados como controle (5 magros e 5 obesos) estratificados de acordo com o índice de massa corpórea (IMC). O DNA da MI foi extraído de amostras de fezes. A amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada utilizando *primers* para a região V4 do gene 16S rRNA. A

amplificação de sequências alvo foi realizada utilizando oligonucleotídeos modificados e o sequenciamento foi executado na plataforma Ion PGM Torrent. Os dados foram analisados pelo software QIIME. O consumo de macronutrientes foi analisado por um recordatório alimentar de 7 dias. Os pacientes com EHNA mostraram diferenças significativas na quantidade de *Faecalibacterium, Ruminococcus, Lactobacillus* e *Bifidobacterium* em comparação aos indivíduos (magros e obesos) sem DHGNA utilizados como controle. Em particular, os pacientes com EHNA magros apresentaram uma quantidade 3 vezes menor de *Faecalibacterium* e *Ruminococcus* (p=0,004), enquanto os pacientes com EHNA obesos apresentaram quantidades abundantes de *Lactobacillus* (p= 0,048) e pacientes com EHNA com sobrepeso apresentaram quantidades reduzidas de *Bifidobacterium* (p= 0,041). Além disso, os pacientes com EHNA magros mostraram redução na quantidade de *Ruminococcus* e *Lactobacillus* em comparação aos pacientes com EHNA com sobrepeso e obesidade. No entanto, a análise da alfa diversidade da MI não demonstrou diferença estatística entre os pacientes com EHNA magros quando comparados aos indivíduos sem DHGNA utilizados como controle (p= 0,265). Índices de fibrose maior ou igual a 2 foram associados ao aumento de *Lactobacillus* (p= 0,015). Não houve diferenças na ingestão calórica e lipídica entre os grupos. Nossos dados sugerem que os pacientes com EHNA magros têm composição diferente da MI em comparação aos pacientes com sobrepeso e, ou também, obesos e aos indivíduos sem DHGNA. Escores de fibrose maior ou igual a 2 também foram associados à composição da MI; mas a ingestão de macronutrientes e calorias

não foi associada às diferenças específicas na composição dos microrganismos intestinais fecais.

Descritores: Hepatopatia gordurosa não alcoólica; Esteato-hepatite não alcoólica; Microbioma gastrointestinal; Obesidade; Sobrepeso.

SUMMARY

Duarte SMB. *Evaluation of intestinal microbiota in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is one of the most common types of liver disease, primarily related to the progressive increase of obesity throughout the world. Despite the knowledge of NAFLD pathogenesis, the reason why some patients developed NASH with fibrosis and the progression of liver disease still remain unclear. It has been reported that intestinal dysbiosis plays an important role in metabolic disorders such as obesity, metabolic syndrome, diabetes and cardiovascular disease. About 10-25% of patients with NAFLD develop nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and the factors responsible for the progression from steatosis to NASH are not clear yet. Genetic background, gut microbiota, environmental factors, such as sedentary lifestyle and inadequate diet, should be considered critical factors for the development of metabolic disorders such as obesity, metabolic, diabetes and also NAFLD. The goal of the present study was to compare the gut microbiome of lean, overweight and obese patients with or without NASH, in order to outline phenotypic differences. We performed a cross sectional study comprising 13 NASH patients with liver biopsy (4 lean, 5 overweight and 4 obese) and 10 individuals (5 lean and 5 obese) without NAFLD which were used as stratified controls according to their BMI. The Microbiome DNA was

extracted from stool samples and PCR amplification was performed using primers for the V4 region of the 16S rRNA gene. The enlargement of sequenced targets was accomplished using modified oligonucleotides, the sequencing was executed on the Ion PGM Torrent platform and data analyzed using QIIME software. The macronutrients consumption was analyzed by a 7-day food intake record. Patients with NASH showed significant differences in the quantity of *Faecalibacterium, Ruminococcus, Lactobacillus* and *Bifidobacterium* compared to the individuals (lean and obese) without NAFLD used as controls. In particular, when compared to controls, lean NASH patients possessed a quantity 3 times fewer of *Faecalibacterium* and *Ruminococcus* (p=0.004), obese NASH patients showed an abundant microbiome in *Lactobacillus* (p=0.048). Overweight NASH patients had fewer quantities of *Bifidobacterium* (p=0.041). Moreover, lean patients with NASH showed a reduction in the quantity of *Ruminococcus* and *Lactobacillus* compared to overweight and obese NASH patients. However, the analysis of microbiome alpha diversitydid not show statistic difference between lean NASH patients and controls without NAFLD (p=0.265). A fibrosis score greater than or equal to 2 was associated with the increase of *Lactobacillus* (p=0.015). There were no differences in caloric and lipid intake among groups. Our data suggests that lean NASH patients have different microbiome composition compared to their overweight/obese counter part's. Hepatic fibrosis score greater or equal to 2 in NASH patients had association with their microbiome composition. On the other hand, macronutrients intake and calories were not linked to specific differences in composition of the gut stool microorganisms.

Descriptors: Non-alcoholic fatty liver disease; Non-alcoholic steatohepatitis; Gastrointestinal microbiome; Obesity; Overweight.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Microbiota intestinal (MI)

O epitélio intestinal humano apresenta uma superfície de absorção comparável a 300-400 m^2, com aproximadamente 1.014 bactérias residentes. A colonização bacteriana ocorre antes do nascimento e permanece por toda vida. A maioria das bactérias que colonizam o intestino é do tipo anaeróbia e compreende cerca de 36.000 espécies diferentes (1, 2), constituindo uma variedade de espécies de microrganismos que, quantitativa e qualitativamente, difere entre indivíduos (3).

A Microbiota intestina (MI) é predominantemente composta por bactérias e sua maior quantidade é encontrada no intestino grosso (cólon) (4). Pesquisas demonstram que os microrganismos comensais do intestino estão longe de serem apenas habitantes passivos do trato gastrointestinal (GI), mas também, interagem com seu hospedeiro de forma bastante ativa. Eles são capazes de modular os efeitos de bactérias potencialmente nocivas, causar impacto no trato GI, na digestão, no metabolismo e exercem um papel importante na resposta imunológica do hospedeiro, sendo essencial para o desenvolvimento e expansão dos tecidos linfoides e para a manutenção da imunidade intestinal (5, 6).

Os microrganismos intestinais contribuem de forma direta na metabolização de nutrientes e vitaminas essenciais para a viabilidade do hospedeiro, colaborando na obtenção de energia a partir dos alimentos. Esta

energia é adquirida especialmente por meio de fermentação de carboidratos não absorvíveis em uma reação que induz a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), ácido acético, propiônico, butírico e láctico (que é convertido em ácido acético e ácido propiônico pelos microrganismos intestinais). Os AGCC são absorvidos e melhoram a captação de água e sais e são utilizados como fonte de energia pelo hospedeiro. O ácido butírico é também a principal fonte de energia das células epiteliais que revestem o cólon e pode influenciar no crescimento e na diferenciação celular (7). O metabolismo anaeróbio das bactérias inclui também a fermentação proteolítica no cólon distal, originando derivados nitrogenados como aminas e amônia, alguns dos quais com efeitos carcinogênicos. Além disso, a MI participa da digestão dos polissacarídeos, aumentando a quantidade de glicose no fígado e, portanto, estimulando a lipogênese (8). A MI também possui participação direta no metabolismo dos ácidos biliares provenientes do colesterol da dieta. No intestino, estes ácidos biliares primários ligam-se aos receptores celulares, como o Receptor de ácido biliar acoplado à proteína G-5 (TGR-5) (9), que quando ativados estimulam as células-β do pâncreas e induzem secreção de insulina e, nas células-α, estimulam a secreção de *Glucagon-like peptide 1* (GLP1) que, fisiologicamente, resulta em melhora da Sensibilidade à insulina (SI) e tolerância à glicose juntamente com a perda de peso (10).

A análise de sequenciamento bacteriano intestinal mostrou que aproximadamente 98% de todas as espécies bacterianas que compõem a MI pertencem aos seguintes filos: o *Firmicutes* (64%) e o *Bacteroidetes* (23%),

que representam a maior parte desta MI, e também o *Proteobactéria* (8%) e o *Actinobactéria* (3%) (11).

O filo *Firmicutes* contém mais de 250 gêneros, incluindo os *Lactobacillus,* que são anaeróbios facultativos ou microaerofílicas e têm forma de bastonetes, os *Bacillus* que são na sua maioria bactérias aeróbias e têm a forma de esporos, os *Clostridiuns*, que são obrigatoriamente anaeróbios, e os *Mycoplasmas* ou *Molicutes* que são bactérias gram-positivas, aeróbias facultativas (12). O filo *Bacteroidetes,* assim como o *Firmicutes* é encontrado no intestino delgado e grosso, especialmente no cólon e engloba alguns gêneros como *Bacteroides, Flavobactérias e Sphingobacterias,* sendo o *Bacteroidete Thetaiotamicron* um dos mais abundantes. Estas bactérias são gram-negativas e obrigatoriamente anaeróbias (13).

Embora as funções das bactérias pertencentes ao filo *Firmicutes* ainda não estejam totalmente elucidadas, há evidências que indicam que alguns membros desse filo, como as bactérias da espécie *Clostridium butyricum* estão entre as bactérias produtoras de ácido butírico produzido a partir do ácido lático ou lactose, numa reação química denominada fermentação butírica e esse tipo de fermentação aumenta a extração de energia da dieta (14-16). Por outro lado, membros do filo *Bacteroidetes* participam do metabolismo de carboidratos e realizam este metabolismo expressando enzimas semelhantes às glicosiltransferases, que promovem a glicosilação, ou seja, unem carboidratos à proteína formada nos ribossomos. Também expressam glicosídeos hidrolases que degradam a biomassa, como celulose e

hemicelulose, em estratégias de defesa antibacteriana. E por último, expressam a enzima polissacarídeo-lipase que catalisa a quebra de uma ligação carbono-oxigênio nos polissacarídeos, levando a um produto insaturado e à eliminação de álcool (17).

1.2 Microbiota intestinal (MI) e obesidade

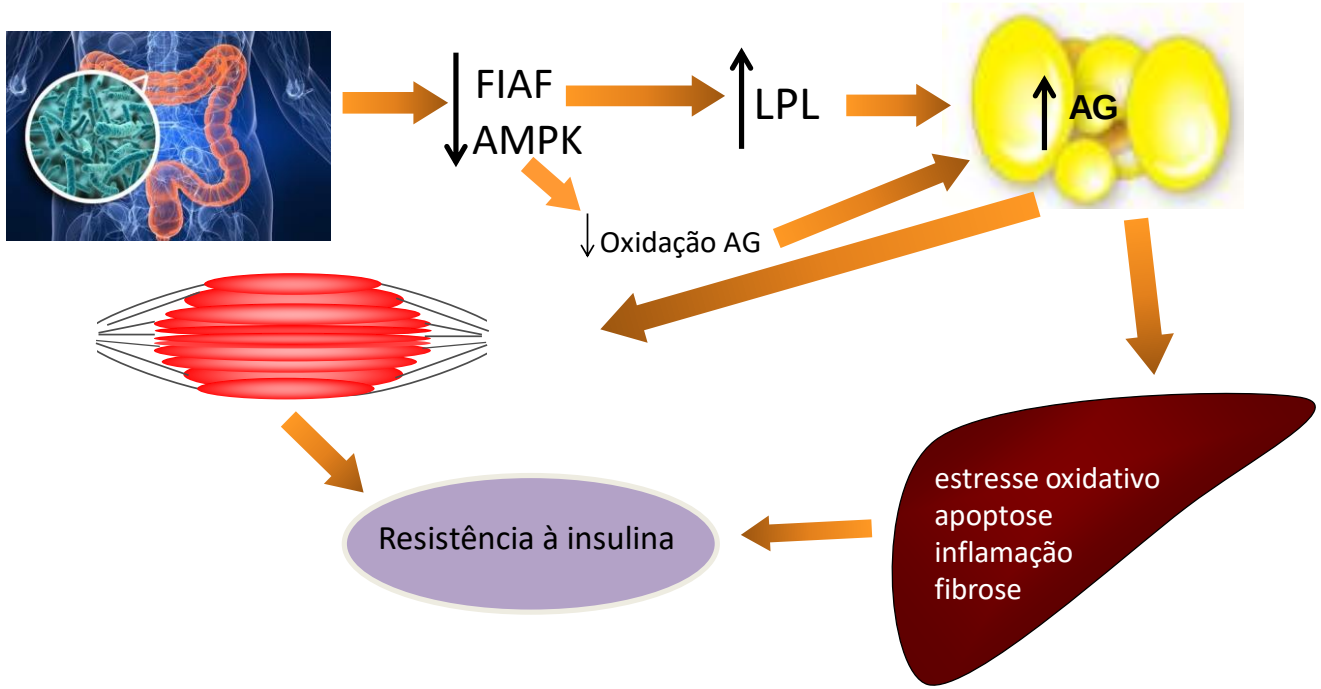
Os microrganismos intestinais influenciam na obtenção de energia, na homeostase energética e, potencialmente, no desenvolvimento da obesidade e dos distúrbios metabólicos (12). Cada vez mais evidências comprovam a importância da composição da MI para o desenvolvimento da obesidade e, demonstram que o tipo e a quantidade da população bacteriana podem determinar algumas características importantes de vias metabólicas que desempenham um papel importante na obesidade (18, 19). Estudo recente mostrou que a MI promove absorção intestinal e transferência de monossacarídeos para a circulação portal pelo aumento da expressão do transportador de glicose-1 (GLUT-1) no intestino delgado. Este aumento do fluxo de carboidratos estimula a lipogênese no fígado e no tecido adiposo (18).

A obesidade e a composição da dieta podem causar danos na barreira intestinal e favorecer o mau funcionamento do eixo intestino-fígado, permitindo a passagem indiscriminada de componentes bacterianos na circulação. A barreira intestinal é uma unidade funcional complexa composta

de elementos luminal e mucoso como a camada de células epiteliais, barreira mucosa, componentes imunes inatos e adquiridos. Essa barreira desempenha um papel fundamental na proteção contra organismos entéricos, toxinas potencialmente nocivas e bioprodutos bacterianos intimamente associados à saúde e susceptibilidade às doenças (20). O eixo intestino-fígado refere-se à relação anatômica e funcional entre o trato GI e o fígado. A interação entre os dois órgãos, seja saudável ou doente, inclui a transferência da MI e seus potenciais produtos hepatotóxicos até o fígado (21). Alterações neste eixo (constituído por barreira intestinal, MI e fígado) podem levar a mudanças na permeabilidade intestinal favorecendo o crescimento excessivo de bactérias (disbiose), em particular, bactérias Gram-negativas que aumentam a produção de produtos hepatotóxicos, tais como lipopolissacarídeos (LPS) que, por sua vez, estimulam *Toll-like receptor-4* (TLR4) e sinalizam em última instância o fator de transcrição kappa B (NF-kB) e citocinas pró-inflamatórias como a Interleucina 6 (IL-6), Fator de transformação do crescimento beta (TGF-β) e Fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) (22, 23).

Outro mecanismo proposto para explicar a relação da MI com o aumento de gordura corporal é a supressão intestinal de *Fasting induced adipose factor* (FIAF). Esta proteína é produzida pelos enterócitos e sua função é inibir a lipase lipoprotéica (LPL) (24), que quando ativada aumenta a absorção de ácidos graxos (AG) livres e triglicérides (TG), ou seja, o FIAF exerce o equilíbrio entre estas ações. Desta maneira, ao suprimir o FIAF, a LPL se torna mais ativa desencadeando maior absorção de AGCC e TG podendo

contribuir para o desenvolvimento da Síndrome metabólica (SM) e para o acúmulo de AG nos hepatócitos (12, 18, 25), levando a várias condições clinicamente relevantes tais como, estresse oxidativo, inflamação, e apoptose, incluindo também, esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) fibrose e cirrose (26) (Figura 1). Os AGCC, além de representarem uma fonte de energia, atuam como moléculas sinalizadoras de diferentes funções orgânicas como, inibir o processo inflamatório, reduzir atividade de NF-kB e aumentar a migração de leucócitos. Atuam também, como ligantes de pelo menos dois receptores acoplados a proteína G (GPCRs): Gpr41 e Gpr43 expressos no intestino delgado, cólon e adipócitos (18). Tais receptores são expressos pelas células do epitélio intestinal, em células enteroendócrinas L, produtoras do peptídeo YY (PYY), hormônio que age inibindo a secreção gástrica, esvaziamento gástrico, contração da vesícula biliar e redução do tempo de trânsito gastrointestinal. Dessa forma, ao serem ativados, estes receptores aumentam a produção de PYY, favorecendo a redução da motilidade intestinal e promovendo maior absorção de nutrientes no lúmen intestinal, em especial dos AG de cadeia curta, que são substratos para a lipogênese hepática. Da mesma forma, o PYY realiza suas funções hormonais no sistema nervoso central, inibindo neurônios orexígenos, induzindo saciedade (27, 28).



Adaptado de: Bäckhed e col., 2004 (29), Tazoe e col., 2008 (27), Ulven, 2012 (28).

Figura 1. Mecanismos propostos para explicar a relação da microbiota intestinal (MI) com o aumento de gordura corporal. A MI pode levar à supressão intestinal de *Fasting induced adipose factor* (FIAF), que intensifica a atividade da lipase lipoproteica (LPL) desencadeando maior absorção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e triglicérides (TG). Este mecanismo contribui para o desenvolvimento da Síndrome metabólica (SM) e acúmulo de ácidos graxos (AG) hepáticos. A MI também pode regular a deposição de gordura no fígado e no músculo pela alteração dos níveis de Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK), que monitora os níveis de energia celular e estimula a oxidação de AG em tecidos periféricos.

A composição da MI também pode estar relacionada aos hábitos alimentares. Estudo realizado com roedores alimentados com dieta rica em gorduras demonstrou redução significativa nas quantidades de *Eubacterium rectale, Clostridium coccoides*, pertencentes ao filo *Firmicutes, e de Bifidobacterium spp*, pertencentes ao filo *Actinobactéria* (30). Estes microorganismos reduzem os níveis de endotoxinas intestinais em roedores e, em humanos, demonstrou-se que a *Bifidobacterium spp* melhora a função de barreira da mucosa, aumenta expressão de proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina regulando as concentrações de glicose sérica (31).

Alguns estudos têm demonstrado que modificações na dieta, tanto na qualidade quanto na quantidade, refletem em mudanças na composição da MI (32-34). Liu e colaboradores (2014) demonstraram que indivíduos obesos submetidos a intervenções dietéticas baseadas na redução da ingestão de carboidratos e no aumento de proteínas, apresentaram aumento na população do gênero de *Bifidobactérias*, pertencente ao filo *Actinobactéria*, o qual atua como probiótico, aumentando as funções imunes, dentre elas, ativação de linfócitos e macrófagos e produção de anticorpos (32). Dados de outro estudo corroboram estes achados e confirmam que modificações na composição da MI de indivíduos obesos submetidos à dieta hiperproteica. Os autores demonstraram que esta intervenção dietética levou a um aumento percentual de *Bacteroidetes* e redução de *Firmicutes*, proporcional à perda de peso, ou seja, quanto maior a perda de peso, maior o percentual de *Bacteroidetes* (33). Por outro lado, estudo recente realizado por Moreno-Pérez e colaboradores

(2018) demonstrou que suplementação com proteína animal (proteína da carne e proteína do soro de leite), diminuiu a presença de bactérias benéficas, como a espécie *Bifidobacterium longum*, o gênero *Roseburia* e a ordem *Lactobacillales* (35).

A ingestão de carboidratos complexos (principalmente fibras) é a que mais influencia positivamente na MI. As fibras, tanto as solúveis quanto as insolúveis, promovem o aumento da quantidade de bactérias benéficas no intestino, como os gêneros *Bifidobacterium* e *Roseburia*, e as espécies *Faecalibacterium prautznii*, e diminuem a quantidade de bactérias patogênicas, como *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* e *Listeria spp* (36). Além disto, o consumo de fibras aumenta a produção de AGCC, que têm inúmeros efeitos benéficos à saúde (37).

O consumo de gorduras também afeta a composição da MI. Os efeitos dependem da quantidade e do tipo de gordura ingerida (saturada, monoinsaturada ou poliinsaturada). Dietas ricas em gordura diminuem a diversidade microbiana, diminuindo assim a presença de bactérias benéficas (*Bifidobacterium, Lactobacillus* e *Akkermansia muciniphila*), levando ao aumento da permeabilidade intestinal e dos níveis de LPS, o que favorece o desencadeamento da inflamação sistêmica (38-40).

Com estas evidências, compreender as funções associadas aos diferentes filos bacterianos é importante porque as alterações na MI tem sido

associadas às doenças do hospedeiro, incluindo obesidade, diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e esteatose hepática (41, 42).

1.3 Microbiota intestinal (MI) e Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)

A Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é uma das formas mais comuns de doença hepática, relacionada primordialmente ao aumento progressivo da obesidade no mundo. Inicialmente, foi considerada como uma hepatopatia de curso benigno, contudo, atualmente, sabe-se que é uma doença complexa que envolve fatores ambientais e predisposição genética (43).

A DHGNA abrange um espectro de alterações hepáticas que variam desde um simples depósito de gordura no interior do hepatócito, sem inflamação ou fibrose (esteatose simples), até casos de EHNA, cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC), em pacientes sem história de etilismo (44).

A DHGNA está associada a componentes da SM: DM2, resistência à insulina (RI), hipertensão arterial sistêmica e principalmente a obesidade abdominal (visceral), dislipidemia [hipertrigliceridemia, níveis baixos de lipoproteína de alta densidade (HDL) e níveis elevados de lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Pode também estar associada a procedimentos cirúrgicos como *bypass* jejuno-ileal, desnutrição calórico-proteica, nutrição

parenteral prolongada, uso de drogas, endocrinopatias, uso de medicamentos e exposição a toxinas (45, 46). O estilo de vida sedentário, a ingestão inadequada de alimentos com alto consumo de gordura e frutose, bem como, obesidade, distúrbios metabólicos, estado hormonal e antecedentes genéticos também foram descritos como responsáveis pelo desenvolvimento da DHGNA (47).

Devido às crescentes taxas de obesidade, a DHGNA tem se tornado cada vez mais frequente em todas as populações, principalmente no mundo ocidental e tem sido definida pelos especialistas como uma doença do mundo moderno (45). Estudo recente de Younossi e colaboradores (2019) demonstrou que a prevalência da DHGNA nos Estados Unidos, nos últimos 30 anos, tem aumentado paralelamente à epidemia da obesidade e do DM2 (48). Este aumento tem sido observado não só nos Estados Unidos, mas também em todo o mundo. No entanto, esta prevalência difere significativamente de acordo com o método diagnóstico utilizado e a população estudada. A medida que as taxas de obesidade, diabetes e SM continuam a aumentar, a DHGNA e EHNA podem afetar significativamente os cuidados de saúde e o desenvolvimento de complicações a longo prazo, como cirrose e CHC nos próximos anos (49).

Existem poucos estudos epidemiológicos sobre prevalência da DHGNA na América do Sul. No Brasil, Karnikowski e colaboradores (2007) relataram que a prevalência da DHGNA é de 35,2% entre a população de meia-idade

(50). Outro estudo realizado pela Sociedade Brasileira de Hepatologia avaliou as características clínico-epidemiológicas da DHGNA em 16 centros médicos distribuídos pelas cinco regiões do Brasil. Os dados deste estudo mostraram que 53,3% dos indivíduos era do sexo masculino, 85% eram assintomáticos e a maioria (58%) já apresentava EHNA e, desses, 27% apresentavam algum grau de fibrose, incluindo 15,4% de casos de cirrose (51).

A fisiopatologia da DHGNA ainda não está totalmente elucidada. Cerca de 10-25% dos pacientes com DHGNA desenvolvem EHNA (52) e os fatores responsáveis pela progressão de esteatose para EHNA ainda permanecem desconhecidos e são temas de extensa investigação. Atualmente, a maioria dos autores acredita na teoria dos múltiplos *hits*. O primeiro *hit* está intimamente associado às múltiplas anormalidades metabólicas, destacando a RI como condição inicial para o acúmulo de AG nos hepatócitos, uma vez que favorecem a lipogênese e inibem a lipólise, o que provoca o aumento excessivo do aporte de AG no fígado, seguido de uma sequência de eventos (múltiplos *hits*) como, o aumento do estresse oxidativo, estresse do retículo endoplasmático, disfunção mitocondrial e endotoxemia crônica (53). Estes eventos promovem o aumento da peroxidação lipídica que eventualmente leva ao aumento do acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) e fatores derivados do intestino. A ação coordenada e concomitante desses eventos hepáticos promovem o desenvolvimento da EHNA (54).

Fatores endógenos como a MI também podem contribuir para o desenvolvimento da DHGNA. O aumento da permeabilidade intestinal, o supercrescimento bacteriano do intestinal delgado (SCBID), que é uma condição na qual níveis elevados do número de bactérias do intestino delgado levam à distensão abdominal e outros sintomas comuns relacionados com síndrome do intestino irritável (SII), são frequentes em pacientes obesos e induzem a lesão hepática por aumentar a produção de LPS derivados das bactérias Gram-negativas do intestino que ativam o NF-kB e a produção de TNF-α e sugerem que a MI aumenta a exposição do fígado a endotoxinas desempenhando um papel importante na progressão da esteatose para EHNA (55-57). Além disso, o aumento da permeabilidade intestinal leva à translocação bacteriana e as endotoxinas produzidas por estas bactérias penetram na veia porta e ativam células inflamatórias do tipo *Toll-like receptors* (TLRs) nos hepatócitos (22) e diminui a secreção do FIAF aumentando a atividade da LPL e o acúmulo hepático de TG (29, 58).

Várias células hepáticas expressam níveis significativos de TLRs sendo assim um determinante crítico na patogênese de doenças hepáticas crônicas. Especificamente, TLR2, TLR3 e TLR4 são altamente expressos nas células de Kupffer e respondem a estímulo das endotoxinas intestinais levando à produção rápida de TNF-α e IL-6. Além disso, a expressão de TLRs pode ser encontrada em células epiteliais biliares, células estreladas, hepatócitos e células endoteliais sinusoidais hepáticas (59) sendo fundamental para os

processos fisiopatológicos que geram doenças hepáticas múltiplas, como hepatite viral, CHC, DHGNA, cirrose e fibrose (60).

Estudos recentes em modelos humanos e animais demonstraram que a MI é um fator importante para o armazenamento de energia e contribui para o aumento da adiposidade e desenvolvimento da DHGNA (41, 61, 62). Proporções menores de *Bacteroidetes* e altas proporções de *Prevotella* e *Porphyromas* foram encontradas em pacientes com DHGNA favorecendo uma maior extração de energia dietética e acúmulo de gordura, em comparação com indivíduos sem DHGNA (63, 64). Estudo recente de Machado e colaboradores (2016) também demonstrou um aumento na quantidade de *Lactobacillus, Escherichia* e *Streptococcus*, bem como, diminuição de *Ruminococcaceae* e de *Faecalibacterium prausnitzii* em pacientes com DHGNA (65). Outro estudo recente realizado por Boursier e colaboradores (2016) demonstrou que a quantidade reduzida de *Bacteroides* foi associada de forma independente à EHNA e a prevalência de *Ruminococcus* foi associada com o estadiamento de fibrose ≥F2 (66). Já está bem documentado que em indivíduos obesos há um aumento significativo dos níveis de SCBDI, intensificando a permeabilidade intestinal em comparação com indivíduos magros sem DHGNA (67), mas o papel destes microrganismos na progressão da DHGNA para EHNA em pacientes magros com EHNA tem que ser ainda mais explorado. No entanto, a maioria dos estudos em humanos, incluindo pacientes com DHGNA, apresenta várias limitações, tais como: a biópsia hepática não é realizada em todos os pacientes, populações heterogêneas

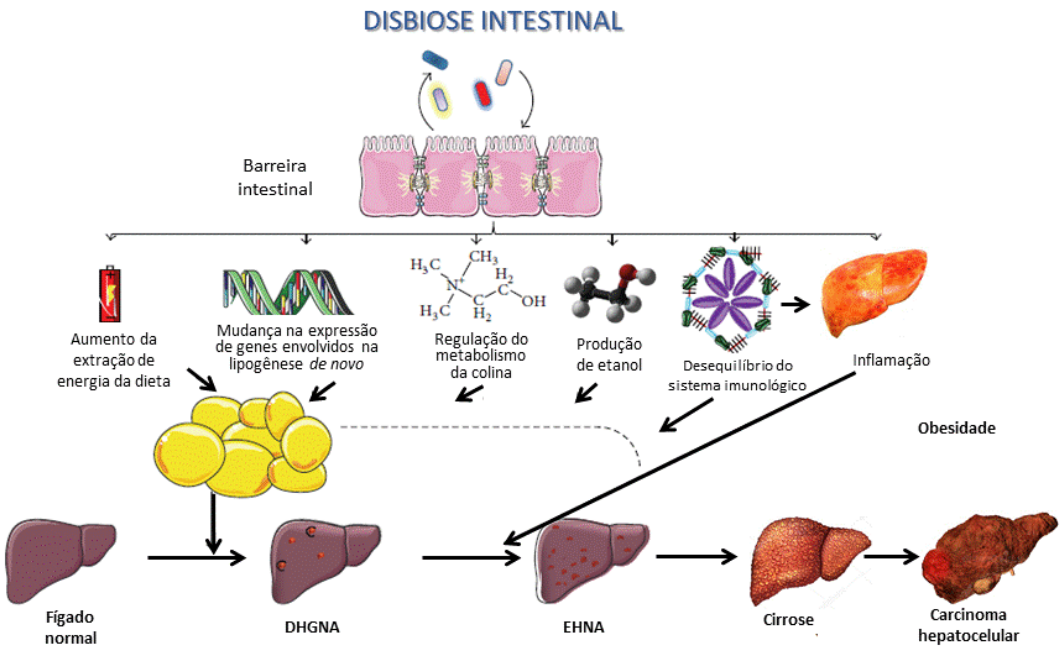
(adultos *vs* crianças) e caracterização de MI realizada por diferentes métodos [reação em cadeia da polimerase quantitativa (PCR) e pirosequenciamento] (68, 69).

Por outro lado, um dos mecanismos pelo qual a MI contribui para o desenvolvimento de DHGNA pode ser pelo aumento do número de bactérias produtoras de etanol (por exemplo, *Escherichia coli*) (63). O etanol produzido por estas bactérias contribui para alterações fisiológicas e morfológicas na barreira intestinal associada com a SCBID, diminuindo a permeabilidade intestinal e, portanto, aumentando a passagem de endotoxinas a partir do lúmen do intestino para o sangue portal o que leva a um aumento na produção de EROs que, consequentemente, estimula a inflamação hepática (70). O etanol é constantemente produzido pela MI mesmo na ausência de ingestão de álcool. Verificou-se que uma dieta rica em açúcar refinado pode levar a níveis aumentados de álcool no sangue e que o etanol endogenamente sintetizado é eliminado pela via da enzima álcool desidrogenase (ADH) no fígado. Esta enzima converte o álcool em acetaldeído que, mesmo em pequenas concentrações, é tóxico para o organismo (71).

Zhu e colaboradores (2016) examinaram a composição da MI e os níveis de etanol no sangue de pacientes obesos e eutróficos com EHNA (72). Apenas algumas diferenças foram evidentes na composição MI de pacientes com EHNA em comparação com obesos sem doença hepática, e incluíram diferenças entre filos, famílias e gêneros em *Proteobacteria,*

Enterobacteriaceae e Escherichia coli, respectivamente. Algumas dessas mudanças na MI incluíram mais bactérias produtoras de álcool, associadas a um aumento significativo nos níveis de etanol nos pacientes com DHGNA em comparação com pacientes obesos sem DHGNA. Além disso, os níveis aumentados de etanol foram especificamente detectados em correlação com a EHNA. Em suma, esses resultados sugerem que a produção de etanol pela MI pode contribuir para o desenvolvimento da DHGNA e sua progressão para EHNA (72).

Outro produto da metabolização de nutrientes pelas bactérias que pode ser tóxico para o fígado é o composto N-óxido de trimetilamina (TMAO). A MI pode promover a conversão de colina em trimetilamina (TMA) que, em seguida, vai chegar ao fígado pela circulação porta e será convertida em TMAO (65). O aumento na produção deste composto leva a uma diminuição da exportação de VLDL hepático, modulação da síntese do ácido biliar, com efeitos prejudiciais ao fígado, como aumento de deposição de gordura hepática, lesões inflamatórias e oxidativas e diminuição do metabolismo da glicose (73). Embora estudos que avaliam os metabólitos relacionados à MI sejam desafiadores e demonstrarem a importância destes na progressão da DHGNA, os resultados ainda são inconsistentes ou mesmo conflitantes no que diz respeito a caracterização dos perfis metabólicos destes pacientes (74). Na figura 2 apresentamos de forma esquemática as possíveis vias, elucidando como a MI pode levar a progressão da DHGNA.



Adaptado de Lau e col. 2015 (75).

Figura 2. Esquema das possíveis vias elucidando como a microbiota intestinal (MI) pode levar a progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). A MI, quando em disbiose, favorece o ganho de gordura corporal e desempenha um papel fundamental na progressão da DHGNA por meio de diferentes vias incluindo: o aumento da extração de energia a partir de dieta, a mudança na expressão de genes envolvidos na lipogênese *de novo*, a regulação do metabolismo da colina, o aumento da produção de etanol endógeno e o desequilíbrio no sistema imunológico.

A relação entre a disbiose intestinal e a gravidade da DHGNA, bem como, o papel da MI na progressão da EHNA ainda não estão bem documentados. Com base na escassez de dados da literatura e visto a necessidade de melhor caracterizar a MI de pacientes magros, com sobrepeso e obesos com EHNA, propusemos o presente estudo.

1.4. Justificativa

Considerando que a DHGNA é uma doença multifatorial e, por este motivo, escolher uma terapia adequada torna-se algo complexo e, o fato de que o papel da MI no desenvolvimento e progressão da DHGNA e da EHNA ainda não está totalmente elucidado, fazem-se necessárias novas investigações para avaliar e caracterizar melhor a MI destes pacientes, na tentativa de se propor estratégicas terapêuticas auxiliares para o tratamento da DHGNA.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a composição da MI de pacientes magros, com sobrepeso e obesos com EHNA e de indivíduos sem DHGNA.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1. Comparar a composição da MI de pacientes com EHNA (magros, com sobrepeso e obesos) com a MI de indivíduos (magros e obesos) sem DHGNA utilizados como controle;

2.2.2. Comparar a composição da MI de pacientes com EHNA (magros, com sobrepeso e obesos) e de indivíduos (magros e obesos) sem DHGNA à ingestão calórica e de macronutrientes;

2.2.3. Comparar a composição da MI de pacientes com EHNA (magros, com sobrepeso e obesos) com a gravidade da lesão histológica hepática.

MÉTODOS

3. MÉTODOS

3.1. Casuística

Foi realizado um estudo transversal que incluiu 23 indivíduos, sendo 13 pacientes com EHNA comprovada por biópsia hepática matriculados no Ambulatório de Doença hepática gordurosa não alcoólica (A2MG700) da Disciplina de Gastroenterologia Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) e 10 indivíduos (magros e obesos) sem DHGNA ao método de imagem, utilizados como controle. Esses indivíduos foram divididos em 5 grupos: pacientes magros com EHNA (n=4), pacientes com sobrepeso e com EHNA (n=5), pacientes obesos com EHNA (n=4), indivíduos magros sem DHGNA utilizados como controles magros (n=5) e indivíduos obesos sem DHGNA utilizados como controles obesos (n=5).

3.2. Considerações Éticas

Todos os indivíduos que concordaram em participar do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em 3 de julho de 2013, sob o protocolo de pesquisa 335.530.

3.3. Critérios de Inclusão

- Adultos de ambos os sexos e de qualquer raça,
- Idade entre 18-75 anos,
- Presença de EHNA confirmada por histologia hepática,
- Ausência de: consumo diário de álcool> 20 g para mulheres e > 30 g para homens (76), toxicodependência, esquistossomose, infecção por hepatite B ou C, Hepatite autoimnune, Doença de Wilson, Hemocromatose ou Deficiência de α 1 Antitripsina;
- Voluntários magros sem DHGNA recrutados por meio de divulgação interna no HCFMUSP com IMC entre 18,5 e 24,9 e sem a presença de DM2 ou sintomas gastrointestinais crônicos e com exame de ultrassonografia abdominal realizado para confirmar a ausência de esteatose e com enzimas hepáticas normais;
- Voluntários obesos (IMC ≥30) sem DHGNA recrutados por meio de divulgação interna no HCFMUSP sem esteatose e EHNA, avaliados por exame de ultrassonografia e com enzimas hepáticas normais e sem a presença de DM2.

3.4. Critérios de Exclusão

- Gravidez e lactação,
- Recusa em participar do estudo,

- Uso de antibióticos, probióticos, prebióticos e laxantes no último mês anterior à coleta de material fecal.

3.5. Avaliação Nutricional

Os pacientes foram avaliados por um Nutricionista e receberam instruções para registrar sua ingestão dietética diária durante 7 dias. Os macronutrientes (proteínas, carboidratos e lipídios), além de calorias e quantidade de fibras alimentares, foram calculados com o software Avanutri 4.0 (Avanutri, Rio de Janeiro, Brasil).

3.6. Avaliação Antropométrica e da Composição Corporal

3.6.1. Parâmetros Antropométricos

Peso: O peso corporal (kg) foi aferido por balança digital acoplada ao estadiômetro (Biospace, modelo BSM370®, Gangnam-gu, Seoul, Coreia), estando os participantes da pesquisa descalços e com roupas leves.

Altura: A altura (m) foi determinada por estadiômetro (Biospace, modelo BSM370®, Gangnam-gu, Seoul, Coreia), graduado em centímetro com esquadro móvel, para posicionamento sobre a cabeça, estando os

participantes descalços, com os pés unidos, em posição ereta, olhando para frente.

Índice de Massa Corpórea (IMC): A obesidade foi avaliada pelo IMC, que é definido como o peso do indivíduo (kg) dividido pela sua altura (m) elevada ao quadrado segundo a OMS, 1997 (77) (Tabela 1). Os pacientes idosos (acima de 65 anos) foram classificados de acordo com os padrões de IMC estabelecidos por Lipschitz (1994) (78) (Tabela 2).

Tabela 1. Classificação do Índice de massa corpórea (IMC)

IMC (Kg/ m^2)	Classificação
< 18,5	Baixo peso
18,5-24,9	Eutrofia
25,0-29,9	Pré- obesidade
30,0-34,9	Obesidade grau I
35,0-39,9	Obesidade grau II
≥ 40,0	Obesidade grau III

FONTE: Organização Mundial da Saúde (OMS), 1997 (77)

Tabela 2. Classificação do Índice de massa corpórea (IMC) para indivíduos idosos (acima de 65 anos)

IMC (Kg/ m^2)	Classificação
< 22	Baixo- peso
22- 27	Eutrofia
>27	Obesidade

Lipschitz (1994) (78)

3.7. Avaliação Clínica

3.7.1. Métodos de dosagens laboratoriais

A coleta de sangue venoso periférico foi realizada após 12 horas de jejum para a determinação de todas as dosagens laboratoriais descritas a seguir.

- Glicemia: A concentração plasmática de glicose foi determinada em analisador automático, modelo Cobas Integra da Roche, pelo método enzimático colorimétrico utilizando a hexoquinase. O intervalo de referência considerado para os valores normais de glicemia é de 70 a 100 mg/ dL.

- Lípides plasmáticos: as dosagens de colesterol total (CT), HDL-C e TG foram realizadas em sistema automatizado COBAS MIRA, utilizando kits enzimáticos comerciais (Roche, Mannhein, Alemanha). A concentração de colesterol nas frações LDL-C e VLDL-C foram determinadas pela equação de Friedewald (1972) (79), onde VLDL-C= TG/5 e LDL-C= CT - (HDL-C+VLDL-C).

- Enzimas hepáticas: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e gama glutamiltransferase (GGT): as concentrações séricas de AST, ALT e GGT foram determinadas por método cinético automatizado.

3.8. Avaliação Histológica

A decisão de se propor a biópsia hepática foi discutida de forma individualizada com cada paciente, considerando os achados clínicos e laboratoriais possivelmente associados à EHNA e/ou à fibrose avançada que poderiam auxiliar na sua indicação, especialmente: idade acima de 45 anos, presença de obesidade, de DM2 ou SM, relação AST/ALT > 1 e aumento persistente de aminotransferases por mais de 6 meses.

Todos os pacientes que participaram do estudo, exceto os indivíduos dos grupos controle, realizaram uma biópsia hepática dentro do período de 6 meses anteriores ao estudo. A biópsia hepática foi indicada de acordo com a rotina de cuidados do protocolo ambulatorial de DHGNA (A2MG700) do Departamento de Gastroenterologia Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).

Fragmentos de tecido hepático previamente fixados em solução de formol a 4% foram processados e submetidos às colorações de hematoxilina-eosina. As amostras de fígado foram avaliadas de maneira cega por um patologista hepático experiente utilizando um sistema modificado da classificação padronizada por Kleiner e colaboradores em 2005 (80), conforme apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Classificação de Kleiner e colaboradores (2005) (80) para o estadiamento da fibrose hepática secundária à Esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) e cálculo do escore de atividade necroinflamatória [*NALFD Activity Score* (NAS)].

Classicação de Kleiner para EHNA	
ESTEATOSE	
0	<5%
1	5% - 33%
2	>33% - 66%
3	>66%
FIBROSE	
0	Ausente
1	Perissinusoidal ou periportal
1A	Leve, zona 3, perissinusoidal
1B	Moderada, zona 3, perissinusoidal
1C	Portal / periportal
2	Perissinusoidal e portal / periportal
3	Pontes de fibrose
4	Cirrose
INFILTRADO LOBULAR	
0	Sem foco
1	<2 focos por campo de 200X
2	2-4 focos por campo de 200X
3	>4 focos por campo de 200X
BALONIZAÇÃO	
0	Ausente
1	Poucas células de balonização
2	Muitas células / balonização proeminente

As variáveis histológicas estudadas foram: esteatose macrovesicular e microvesicular (0-3), inflamação lobular (0-3), balonização hepatocelular (0-2) e fibrose (0-4). Após a graduação de cada variável, foi realizada a soma dos resultados para se obter o escore de atividade da DHGNA (NAS, do inglês *NALFD Activity Score*) (80).

3.9 Análise da Microbiota Intestinal (MI)

A análise da MI dos participantes do estudo foi realizada no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (LIM-46).

3.9.1 Extração

A extração do DNA fecal foi realizada utilizando-se o kit PowerSoil® DNA Isolation Kit (MoBio, Carlsbad, CA, EUA) seguindo instruções do fabricante com modificações, que incluem o aquecimento da amostra a 65 ºC, 10 min e 95 ºC, 10 min para aumentar o poder de lise dos microrganismos (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3574278/).

3.9.2 Sequenciamento de Nova Geração

A caracterização da microbiota foi realizada pela amplificação do domínio V4 do segmento 16S ribossômico bacteriano, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores F515 (CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG CTAAGGTAACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA) e R806 (CCTCTCTATGGGCAGT CGGTGATGGACTACHVGGGTWTCTAAT). Esses oligonucleotídeos são modificados para conter uma região de adaptadores, permitindo o sequenciamento no *Ion PGM Torrent* (Carlsbad, CA, EUA), pela técnica denominada *Primer Fusion*. Além disso, um dos iniciadores (*primer forward*) possui uma sequência (*barcode*) que permite a multiplexação de até 16 amostras em um mesmo CHIP, de acordo com a cobertura desejada.

3.9.3 Metodologia de *Primer Fusion*

A amplificação de sequências alvo foi realizada utilizando oligonucleotídeos modificados, permitindo o sequenciamento na plataforma *Ion PGM Torrent* (Carlsbad, CA, EUA) de várias amostras, identificadas por uma sequência de nucleotídeos (*barcodes*). Após esta amplificação foi realizada a purificação da biblioteca.

O processo de purificação da biblioteca foi realizado por meio da técnica de *beads* magnéticas, utilizando o reagente Agencourt® AMPure® XP Reagent (Beckman Coulter, Beverly, Massachussets, EUA).

3.9.4 Preparo do *pool* equimolar das bibliotecas amplificadas

O agrupamento das amostras em quantidades equimolares permitiu a total cobertura das regiões alvo. Para tanto, cada amostra foi quantificada por fluorometria, utilizando o *kit* Qubit DNA BR (Euqene, Oregon, EUA), no equipamento Qubit 2.0 (Life Technologies, Euqene, Oregon, EUA), e diluídas para que se tornem equimolares, utilizando a maior concentração, num volume total de 25 µL.

3.9.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR) em emulsão

A PCR em emulsão permitiu que cada sequência de nucleotídeos fosse amplificada individualmente em microesferas suspensas em uma emulsão oleosa, utilizando o reagente *IonPGM™ Template* OT2 400 *Ion Sphere*™ (Carlsbad, CA, EUA), no equipamento *Ion One Touch*2 (Life Technologies, South San Francisco, CA, EUA).

3.9.6 Enriquecimento

Após a amplificação por PCR em emulsão, as amostras que não tiveram as sequências amplificadas ao redor das microesferas foram eliminadas por meio de um procedimento de enriquecimento, utilizando o equipamento *Enrichment System* (Life Technologies, South San Francisco, CA, EUA).

3.9.7 Reação de Sequenciamento

Inicialmente foi feito o anelamento dos *primers*, utilizando o reagente *Sequencing Primer* (Carlsbad, CA, EUA). Após o anelamento foi adicionado *Ion PGM™ Sequencing 400v2 Polymerase* (Carlsbad, CA, EUA) para ligação da enzima polimerase.

3.9.8 Carregamento do CHIP

A amostra ligada à polimerase foi então depositada ao *Ion CHIP* 318 v2 (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), que após carregamento, foi inserido na plataforma de sequenciamento *Ion PGM Torrent* (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) para realização do sequenciamento.

3.9.9 Análise dos resultados

Após o sequenciamento, as sequências geradas pelo *Ion PGM Torrent* (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) foram filtradas utilizando o software *Torrent Browser* (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), para a remoção de sequências policlonais e de baixa qualidade.

Os arquivos.sff gerados pelo *Torrent Browser* foram analisados utilizando a ferramenta QIIME. Leituras menores de 50pb foram descartadas. As sequências remanescentes foram agrupadas em Unidades taxonômicas

operacionais (OTUs), baseando-se em similaridade de 97%, utilizando o algoritmo UCLUST. OTUs foram classificadas taxonomicamente com o software QIIME (http://qiime.sourceforge.net), utilizando como referência o banco de dados *Ribosomal Database Project* (https://rdp.cme.msu.edu/).

Esse processo resultou na formação de árvores filogenéticas com formato padrão *Newick*, obtidas utilizando o pacote contido no software QIIME.

Foi realizada análise de coordenadas principais (PCoA), baseada na matriz de distância UniFrac, para demonstrar similaridades ou dissimilaridades entre as amostras analisadas.

3.10 Análises Estatísticas

Para a análise de dados não metagenômicos, foram adotadas estatísticas não-paramétricas.

A variável idade foi expressa como mediana (valor mínimo e máximo), enquanto as outras variáveis contínuas foram expressas como média e desvio padrão. As variáveis categóricas foram expressas como frequência e porcentagem.

O teste de *Mann-Withney*, o teste de *Kruskal-Wallis* e o teste do qui-quadrado foram utilizados para destacar a diferença de sexo, idade, score NAS, fibrose, prevalência de hipertensão, diabetes, dislipidemia e ingestão de

macronutrientes entre pacientes com EHNA e controles. Para qualquer significância estatística no teste de *Kruskal-Wallis*, o teste de *Dunn* com ajuste de *Bonferroni* foi aplicado para verificar diferenças relevantes entre níveis variáveis.

Na análise bioestatística de dados metagenômicos, os resultados brutos obtidos pelo sequenciamento de DNA bacteriano foram pré-processados e apenas as taxas que atingiram uma contagem "não-zero" em pelo menos 20% das amostras foram mantidas para análises adicionais. A palavra "não-zero" se refere ao método incorporado que testa a veracidade de uma amostra. Por exemplo, qualquer número é considerado verdadeiro se não for zero. Os dados apurados foram então normalizados de acordo com o método *cumulative sum scaling normalization* (CSS) (81). Este método é uma extensão adaptativa da abordagem de *quantis* que é mais adequada para levantamento de dados de genes marcadores pelas contagens brutas e são divididas pela soma cumulativa de contagens até um percentil determinado usando uma abordagem orientada por dados (81).

A análise de ordenação [Análise de coordenadas principais (PCoA)] baseou-se na distância UniFrac ponderada (82). As amostras foram classificadas de acordo com o IMC e os pacientes com EHNA foram comparados com os indivíduos (magros e obesos) sem DHGNA utilizados como controle. As diferenças de composição foram testadas por uma análise de variância permutativa multivariada (PERMANOVA) na matriz de distância (83).

Finalmente, a análise de abundância diferencial foi realizada utilizando um modelo de mistura Gaussiana, que calculou o IMC dos grupos de pacientes com EHNA e dos indivíduos (magros e obesos) sem DHGNA (controle), como variáveis de interesse. A mesma análise também foi repetida considerando como variáveis alvo a ingestão de macronutrientes (carboidratos, proteínas, lipídios e fibras) e a ingestão calórica total, sendo utilizado como corte de referência o valor médio de ingestão de cada grupo. O método *Benjamini-Hochberg* foi aplicado como ajuste para comparações múltiplas (84). Os resultados foram considerados significativos com *p-value* ajustado <0,05 e um *log*2 *fold change* ≥ ± 1. Uma mudança positiva de *log*2 *fold change* foi indicativa para aumento da quantidade bacteriana e uma mudança negativa de *log*2 *fold change* sugere uma redução da quantidade bacteriana. Em ambos os casos, as modificações foram proporcionais ao valor absoluto de *log*2 *fold change*. A significância estatística (eixo y) e a mudança de *log*2 *fold change* (eixo x) foram apresentadas em *volcano plots*.

Para calcular a alfa diversidade da MI de pacientes com EHNA e dos indivíduos (magros e obesos) sem DHGNA de acordo com o IMC, foi utilizado o índice de Shannon. Este é um dos diversos índices usados para medir a diversidade em dados categóricos. O teste de *Kruskal-Wallis* foi utilizado para avaliar a diversidade microbiana intraindividual entre pacientes com EHNA e indivíduos (magros e obesos) sem DHGNA utilizados como controle.

A análise da metagenômica foi realizada utilizando o programa de estatísticas *The R Project for Statistical Computing* versão 3.1.2. [(*R Foundation for Statistical Computing*, Viena, Áustria) http://www.r-project.org]. Foram considerados como valores de significância um *p-value* <0,05.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

O presente estudo foi composto por 13 pacientes com EHNA e 10 indivíduos sem DHGNA. O gênero feminino foi o mais prevalente entre os indivíduos obesos com EHNA e obeso controle, enquanto o gênero masculino foi mais frequente entre os indivíduos com sobrepeso e EHNA.

As complicações metabólicas representam 61,5% dos pacientes com EHNA, sendo o DM2 a complicação mais comum. Observou-se uma prevalência discretamente maior de hipertensão entre indivíduos obesos com EHNA, mas não houve diferença estatisticamente significativa destas comorbidades metabólicas entre os grupos de pacientes com EHNA. Enzimas hepáticas ALT, AST e GGT foram significantemente maiores nos pacientes obesos com EHNA ($p= 0,035$, $p= 0,037$, $p= 0,022$ respectivamente). Níveis séricos de glicose, colesterol total e LDL também foram maiores em obesos com EHNA, enquanto os níveis de triglicérides e HDL foram maiores nos pacientes com sobrepeso e EHNA, mas sem diferença estatística (Tabela 4).

Tabela 4. Características demográficas, comorbidades e variáveis bioquímicas dos indivíduos do estudo.

Variáveis	Magro EHNA (4)	Sobrepeso EHNA (5)	Obeso EHNA (4)	Magro Contole (5)	Obeso Controle (5)	*p-value* (Pacientes EHNA)	*p-value* (Todos)
Idade	44 (24-53)	53 (27-65)	43 (43-55)	28,5 (26-50)	48 (34-53)	0,715	0,595
Sexo (Mulheres)	2 (50%)	2 (40%)	5 (100%)	3 (60%)	5 (100%)	0,006	0,018*
Diabetes mellitus	3 (75%)	2 (50%)	3 (75%)	-	-	-	0,336
Hipertensão	1 (25%)	1 (20%)	3 (75%)	-	-	-	0,084
Dislipidemia	3 (75%)	1 (20%)	2 (50%)	-	-	-	0,322
ALT (U/L)	66,5±37,5	65,8±56,6	154,8±177	13,5±0,7	18,3±4,3	0,75	0,035*
AST (U/L)	-	42,4±30,3	76±54,4	14±2,6	15±1,7	0,2	0,037*
GGT (U/L)	181±223	120±73,2	402±320	15±4	22±14,4	0,32	0,022*
Glicose (mg/dL)	118,5±20,5	140,4±89	145±60,5	77,3±6,5	89,3±13	0,07	0,06
Colesterol (mg/dL)	146,5±43	162±105	175±30,3	154±5,7	207,2±21	0,56	0,3
Triglicérides (mg/dL)	119±45,3	130±80,3	93,5±39	80±17	123,3±58	0,73	0,85
LDL (mg/dL)	83,5±60,1	87,4±76	130±10,5	90±15,5	129,7±10,5	0,83	0,32
HDL (mg/dL)	-	76±21,2	65,8±11,4	48±12,7	52,7±5,3	0,2	0,33

ALT= Alanina Aminotransferase; AST= Aspartato Aminotransferase; GGT= Gama Glutamil Transferase; HDL-C= Lipoproteína de alta densidade; LDL-L= Lipoproteína de baixa densidade. *Significância estatística ($p < 0,05$).

A composição da MI de pacientes e controles foi heterogênea, sem agrupamento relevante no gráfico de ordenação de acordo com IMC, mesmo estratificando grupos com a presença de EHNA [PERMANOVA p= 0,691, PCoA, (Figura 3)].

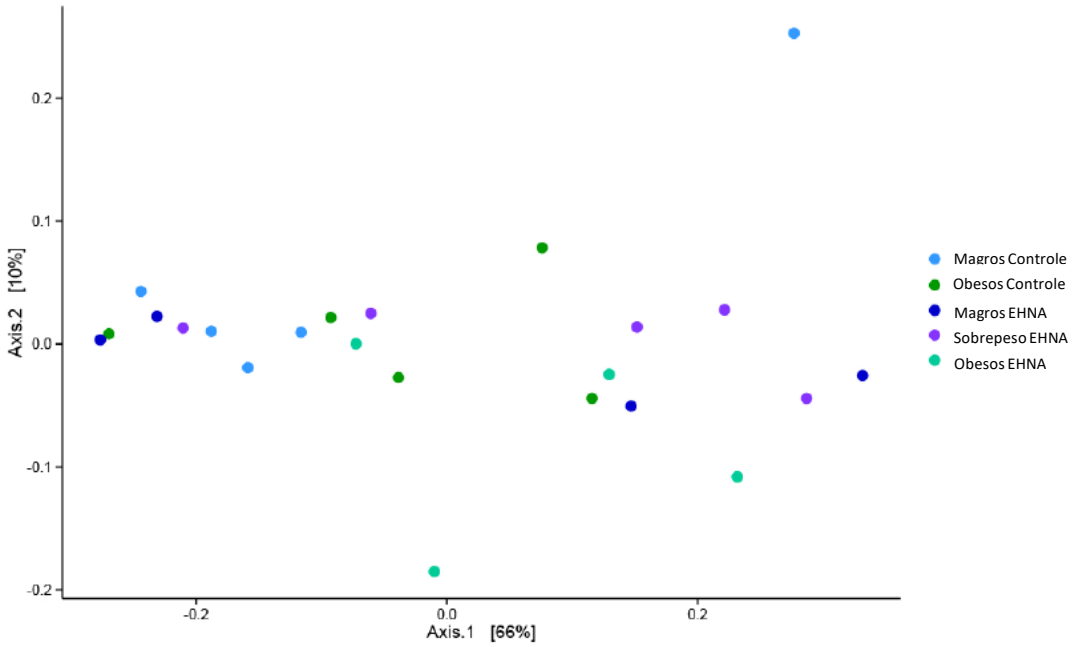


Figura 3. Análise de coordenadas principais (PCoA), baseada na matriz de distância UniFrac ponderada para Unidades taxonômicas operacionais (OTUs) (Qiime). Estratificação dos indivíduos de acordo com o índice de massa corpórea (IMC) e presença ou ausência de Esteato-hepatite não alcoólica (EHNA).

Comparando as bactérias fecais dos indivíduos com EHNA (obesos, sobrepeso e magros) com os controles obesos e magros, não foi encontrada diferença significativa no nível de filo (Tabela 5).

Tabela 5. Análise da quantidade diferencial de filos bacterianos entre os grupos de pacientes magros, com sobrepeso e obesos e com Esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) e de indivíduos (magros e obesos) sem Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) utilizados como controle.

Filos	Magros EHNA *vs* Controles (*logFC*)	*p-value*	*p-value* ajustado	Magros EHNA *vs* Controles Magros (*logFC*)	*p-value*	*p-value* Ajustado	Magros EHNA *vs* Controles Obesos (*logFC*)	*p-value*	*p-value* Ajustado	Magros EHNA *vs* Obesos EHNA (*logFC*)	*p-value*	*p-value* Ajustado
Bacteroidetes	0,9	0,392	0,908	-0,171	0,88	0,893	-0,074	0,948	0,965	1.942	0,109	0,436
Actinobacteria	-0,291	0,791	0,908	-544	0,666	0,893	-0,055	0,965	0,965	0,043	0,972	0,972
Firmicutes	-0,132	0,865	0,908	0,417	0,648	0,893	-0,291	0,753	0,965	-0,408	0,644	0,972
Proteobacteria	-0,075	0,908	0,908	0,104	0,893	0,893	-0,124	0,874	0,965	-0,136	0,854	0,972
Filos	**Sobrepeso EHNA *vs* Controles (*logFC*)**	***p-value***	***p-value* ajustado**	**Sobrepeso EHNA *vs* Controles Magros (*logFC*)**	***p-value***	***p-value* ajustado**	**Sobrepeso EHNA *vs* Controles Obesos (*logFC*)**	***p-value***	***p-value* ajustado**	**Sobrepeso EHNA *vs* Magros EHNA (*logFC*)**	***p-value***	***p-value* ajustado**
Firmicutes	1.226	0,089	0,359	1.362	0,106	0,427	1.062	0,225	0,581	1.353	0,131	0,524
Actinobacteria	0,388	0,692	0,908	0,186	0,868	0,875	0,631	0,596	0,795	0,687	0,57	0,76
Bacteroidetes	-0,142	0,878	0,908	0,691	0,5	0,875	-1.148	0,29	0,581	-1.073	0,328	0,657
Proteobacteria	0,068	0,908	0,908	0,11	0,875	0,875	0,017	0,981	0,981	0,142	0,849	0,849

Continua

Continuação

Filos	Obesos EHNA *vs* Controles (*logFC*)	*p-value*	*p-value* ajustado	Obesos EHNA *vs* Controles Magros (*logFC*)	*p-value*	*p-value* ajustado	Obesos EHNA *vs* Controles Obesos (*logFC*)	*p-value*	*p-value* ajustado	Obesos EHNA *vs* Sobrepeso EHNA (*logFC*)	*p-value*	*p-value* ajustado
Bacteroidetes	-1,04	0,329	0,927	-0,171	0,88	0,893	-2,01	0,093	0,373	-0,899	0,434	0,731
Firmicutes	0,275	0,728	0,927	0,417	0,648	0,893	0,117	0,899	0,988	-0,95	0,273	0,731
Actinobacteria	-0,334	0,764	0,927	-0,544	0,666	0,893	-0,099	0,938	0,988	-0,722	0,548	0,731
Proteobacteria	0,06	0,927	0,927	0,104	0,893	0,893	0,011	0,988	0,988	-0,007	0,991	0,991

As mudanças na quantidade de filos bacterianos são relatadas como alterações de *log2 fold change* (*logFC*). O aumento ou a diminuição da quantidade bacteriana é expressa por um l*ogFC* positivo ou negativo e é proporcional ao valor absoluto *logFC*. O significado estatístico é expresso como valor p e valor p ajustado para comparações múltiplas.

** resultados com *logFC* ≥±1 e *p-value* ajustado <0,05

*resultados com *logFC* ≥±1 e *p-value* <0,05

No entanto, analisando a composição dos gêneros bacterianos, os pacientes com EHNA apresentaram diferenças na quantidade de *Faecalibacterium, Ruminococcus, Lactobacillus* e *Bifidobacterium* em comparação com os indivíduos (magros e obesos) sem DHGNA (Tabela 6 e Figura 4). Em particular, o grupo de pacientes magros com EHNA apresentou uma quantidade 3 vezes menor de *Faecalibacterium* e *Ruminococcus* quando comparados a todos os indivíduos (magros e obesos) sem DHGNA (*logFC* -3,625, p= 0,004, *p-value* ajustado p= 0,047 e *logFC* -3,782, p= 0,004, *p-value* ajustado p= 0,048, respectivamente). Comparando os pacientes com EHNA magros com indivíduos saudáveis (magros e obesos) individualmente, essa diferença foi confirmada.

A MI dos pacientes obesos com EHNA foi abundante em *Lactobacillus* (*logFC* 5,459, p= 0,002, *p-value* ajustado p= 0,048), enquanto *Bifidobacterium* apresentou-se reduzido em pacientes com sobrepeso com EHNA comparados aos indivíduos (magros e obesos) sem DHGNA (*logFC* -4,494, p= 0,018, *p-value* ajustado p= 0,041). Diferenças menores também foram observadas na quantidade de *Roseburia* e *Lachnospira* nos pacientes obesos com EHNA (Tabela 6 e Figura 5).

A quantidade de *Ruminococcus* foi menor em pacientes magros com EHNA quando comparados aos pacientes com sobrepeso e obesos com EHNA (pacientes magros com EHNA *vs* pacientes obesos com EHNA: *logFC* -3,340, p= 0,034, *p-value* ajustado p= 0,415; pacientes magros com EHNA *vs*

pacientes com sobrepeso com EHNA: *logFC* -3,643, p= 0,015, *p-value* ajustado p= 0,337; Tabela 6 e Figura 6). Os pacientes magros com EHNA também foram deficientes em *Lactobacillus* quando comparados com os pacientes obesos com EHNA (magros com EHNA *vs* obesos com EHNA *logFC* -4,031, p= 0,0037, *p-value* ajustado p= 0,415).

Tabela 6. Análise da quantidade diferencial de gêneros bacterianos entre os grupos de pacientes magros, com sobrepeso e obesos e com Esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) e de indivíduos (magros e obesos) sem Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) utilizados como controle.

Filo/Classe/Ordem/Família/Gênero	Magro EHNA *vs* Controles (logFC)	*p-value*	*p-value* ajustado	Magros EHNA *vs* Controles Magros (logFC)	*p-value*	*p-value* ajustado	Magros EHNA *vs* Controles Obesos (logFC)	*p-value*	*p-value* ajustado	Magros EHNA *vs* Obesos EHNA (logFC)	*p-value*	*p-value* ajustado
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Ruminococcaceae; Faecalibacterium	**-3,625**	**0,004***	**0,047****	**-4,278**	**0,006***	**0,107**	**-3,72**	**0,015***	**0,17**	-1,814	0,211	0,743
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Ruminococcaceae; Ruminococcus	**-3,782**	**0,004***	**0,048****	**-4,625**	**0,009***	**0,107**	**-4,7**	**0,003***	**0,07**	**-3,34**	**0,034***	**0,415**
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Lachnospiraceae; Roseburia	-1,391	0,183	0,993	-1,875	0,166	0,734	-2,045	0,109	0,602	1,636	0,198	0,743
Firmicutes;Erysipelotrichi;Erysipelotrichales;Erysipelotrichaceae;Eubacterium	1,85	0,346	0,993	1,808	0,514	0,844	1,445	0,573	0,849	-0,389	0,863	0,959
Proteobacteria;Deltaproteobacteria;Desulfovibrionales;Desulfovibrionaceae;Bilophila	1,303	0,411	0,993	0,457	0,838	0,97	1,528	0,458	0,849	1,872	0,306	0,743
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Lachnospiraceae; Coprococcus	-1,032	0,314	0,993	-1,17	0,362	0,844	-2,229	0,07	0,517	-0,988	0,426	0,743
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Lachnospiraceae; Blautia	-1,038	0,315	0,993	-1,368	0,308	0,844	-1,492	0,237	0,849	-1,556	0,217	0,743
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Veillonellaceae; Phascolarctobacterium	-1,047	0,426	0,993	-2,187	0,229	0,841	-1,371	0,413	0,849	1,278	0,399	0,743
Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Lactobacillaceae; Lactobacillus	1,427	0,356	0,993	2,917	0,146	0,734	1,06	0,575	0,849	**-4,031**	**0,037***	**0,415**
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales; Ruminococcaceae;Oscillospira	-0,589	0,606	0,993	-0,576	0,717	0,876	-1,095	0,459	0,849	-0,029	0,982	0,982

Continua

Continuação

Filo/Classe/Ordem/Família/Gênero	Magro EHNA *vs* Controles (logFC)	*p-value*	*p-value* ajustado	Magros EHNA *vs* Controles Magros (logFC)	*p-value*	*p-value* ajustado	Magros EHNA *vs* Controles Obesos (logFC)	*p-value*	*p-value* ajustado	Magros EHNA *vs* Obesos EHNA (logFC)	*p-value*	*p-value* ajustado
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Lachnospiraceae;Lachnospira	-0,514	0,614	0,993	0,137	0,921	0,97	-1,14	0,382	0,849	1,413	0,236	0,743
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;[Odoribacteraceae];Butyricimonas	0,241	0,85	0,993	1,308	0,43	0,844	-1,037	0,498	0,849	-1,188	0,439	0,743
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;[Odoribacteraceae];Odoribacter	0,012	0,993	0,993	-2,095	0,272	0,844	1,684	0,332	0,849	-0,525	0,757	0,926
Firmicutes;Erysipelotrichi;Erysipelotrichales;Erysipelotrichaceae;Holdemania	0,099	0,935	0,993	-0,694	0,685	0,876	-0,54	0,733	0,878	0,504	0,725	0,926
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales; Prevotellaceae;Prevotella	1,152	0,584	0,993	1,129	0,575	0,844	0,285	0,911	0,966	0,406	0,872	0,959
Actinobacteria;Actinobacteria;Bifidobacteriales; Bifidobacteriaceae;Bifidobacterium	-0,487	0,677	0,993	-1,315	0,442	0,844	-0,797	0,618	0,849	-2,217	0,126	0,743
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales; Porphyromonadaceae;Parabacteroides	-0,392	0,737	0,993	-0,056	0,97	0,97	0,623	0,665	0,861	-0,669	0,637	0,877
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Lachnospiraceae; Dorea	-0,24	0,792	0,993	-0,089	0,939	0,97	-0,869	0,431	0,849	-0,559	0,615	0,877
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Lachnospiraceae; Ruminococcus	0,087	0,929	0,993	0,8	0,536	0,844	0,117	0,922	0,966	-0,102	0,932	0,977
Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Streptococcaceae; Streptococcus	0,059	0,966	0,993	2,959	0,091	0,668	0,067	0,966	0,966	-1,574	0,363	0,743
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales; Bacteroidaceae;Bacteroides	-0,037	0,978	0,993	1,023	0,575	0,844	0,942	0,581	0,849	1,092	0,524	0,824
Proteobacteria;Betaproteobacteria;Burkholderiales; Alcaligenaceae;Sutterella	0,022	0,985	0,993	0,869	0,575	0,844	0,444	0,758	0,878	1,295	0,377	0,743

Continua

Continuação

Filo/Classe/Ordem/Família/Gênero	Sobrepeso EHNA *vs* Controles (logFC)	*p-value*	*p-value* ajustado	Sobrepeso EHNA *vs* Controles Magros (logFC)	*p-value*	*p-value* ajustado	Sobrepeso EHNA *vs* Controles Obesos (logFC)	*p-value*	*p-value* ajustado	Sobrepeso EHNA *vs* Magros EHNA (logFC)	*p-value*	*p-value* ajustado
Actinobacteria;Actinobacteria;Bifidobacteriales; Bifidobacteriaceae;Bifidobacterium	**-4,494**	**0,001***	**0,041****	**-3,284**	**0,048***	**0,697**	-2,765	0,074	0,814	-1,973	0,21	0,763
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales; [Odoribacteraceae];Odoribacter	2,516	0,148	0,915	-1,067	0,484	0,918	2,713	0,06	0,814	0,706	0,708	0,764
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Lachnospiraceae; Lachnospira	-1,432	0,16	0,915	-0,308	0,778	0,918	-1,586	0,134	0,987	-0,31	0,808	0,808
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;[Odoribacteraceae];Butyricimonas	1,616	0,207	0,915	2,493	0,063	0,697	0,147	0,903	0,991	1.356	0,401	0,763
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Eubacteriaceae; Pseudoramibacter_Eubacterium	2,494	0,202	0,915	2,618	0,235	0,918	2,254	0,279	0,991	0,839	0,729	0,764
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Lachnospiraceae; Roseburia	-1,292	0,27	0,991	-0,77	0,539	0,918	-0,94	0,424	0,991	1,106	0,366	0,763
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Ruminococcaceae; Faecalibacterium	-1,151	0,387	0,993	-1,882	0,203	0,918	-1,324	0,335	0,991	2,391	0,099	0,763
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales; Prevotellaceae;Prevotella	1,818	0,442	0,993	2,589	0,332	0,918	1,746	0,47	0,991	1,467	0,556	0,764
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Lachnospiraceae; Coprococcus	-0,829	0,47	0,993	0,295	0,805	0,918	-0,763	0,498	0,991	1,475	0,219	0,763
Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Ruminococcaceae; Ruminococcus	-0,94	0,503	0,993	-0,982	0,504	0,918	-1,057	0,443	0,991	**3,643**	**0,015***	**0,337**
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Lachnospiraceae; Blautia	-0,753	0,514	0,993	-0,448	0,72	0,918	-0,572	0,625	0,991	0,921	0,451	0,763

Continua

Continuação

Filo/Classe/Ordem/Família/Gênero	Sobrepeso EHNA *vs* Controles (logFC)	*p-value*	*p-value* ajustado	Sobrepeso EHNA *vs* Controles Magros (logFC)	*p-value*	*p-value* ajustado	Sobrepeso EHNA *vs* Controles Obesos (logFC)	*p-value*	*p-value* ajustado	Sobrepeso EHNA *vs* Magros EHNA (logFC)	*p-value*	*p-value* ajustado
Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Lactobacillaceae; Lactobacillus	0,798	0,644	0,993	1,5	0,42	0,918	-0,357	0,841	0,991	-1,402	0,444	0,763
Proteobacteria;Betaproteobacteria;Burkholderiales; Alcaligenaceae;Sutterella	-0,619	0,646	0,993	-0,673	0,644	0,918	-1,098	0,422	0,991	-1,538	0,28	0,763
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Ruminococcaceae; Oscillospira	0,34	0,761	0,993	0,505	0,685	0,918	-0,012	0,991	0,991	1,135	0,424	0,763
Proteobacteria;Deltaproteobacteria; Desulfovibrionales;Desulfovibrionaceae;Bilophila	0,013	0,993	0,993	-0,273	0,877	0,918	0,798	0,623	0,991	-0,797	0,689	0,764
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales; Porphyromonadaceae;Parabacteroides	0,544	0,679	0,993	-0,661	0,648	0,918	0,019	0,988	0,991	-0,61	0,665	0,764
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Veillonellaceae; Phascolarctobacterium	-0,207	0,872	0,993	-0,695	0,63	0,918	0,12	0,929	0,991	1,418	0,374	0,763
Firmicutes;Erysipelotrichi;Erysipelotrichales; Erysipelotrichaceae;Holdemania	-0,162	0,893	0,993	0,092	0,945	0,918	0,246	0,847	0,991	0,767	0,613	0,764
Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales; Streptococcaceae;Streptococcus	0,308	0,846	0,993	0,914	0,568	0,918	-1,977	0,193	0,991	-2,019	0,227	0,763
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales; Bacteroidaceae;Bacteroides	0,104	0,947	0,993	-0,678	0,692	0,918	-0,759	0,636	0,991	-1,7	0,309	0,763
Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae; Ruminococcus	0,064	0,954	0,993	0,208	0,863	0,918	-0,474	0,676	0,991	-0,585	0,622	0,764
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Lachnospiraceae; Dorea	0,057	0,955	0,993	0,648	0,558	0,918	-0,131	0,898	0,991	0,744	0,494	0,764

Continua

Continuação

Filo/Classe/Ordem/Família/Gênero	Obesos EHNA *vs* Controles (logFC)	*p-value*	*p-value* ajustado	Obesos EHNA *vs* Controles Magros (logFC)	*p-value*	*p-value* ajustado	Obesos EHNA *vs* Controles Obesos (logFC)	*p-value*	*p-value* ajustado	Obesos EHNA *vs* Sobrepeso EHNA (logFC)	*p-value*	*p-value* ajustado
Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Lactobacillaceae; Lactobacillus	**5,459**	**0,002***	**0,048****	**6,293**	**0,002***	**0,044***	**4,436**	**0,027***	**0,199**	**4,66**	**0,027***	**0,306**
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Lachnospiraceae; Roseburia	**-3,028**	**0,009***	**0,101**	**-2,943**	**0,025***	**0,277**	**-3,112**	**0,018***	**0,199**	-1,735	0,208	0,923
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Lachnospiraceae; Lachnospira	**-1,927**	**0,044***	**0,325**	-1,285	0,231	0,702	**-2,564**	**0,024***	**0,199**	-0,495	0,67	0,923
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Veillonellaceae; Phascolarctobacterium	-2,325	0,061	0,34	-2,739	0,06	0,3	-1,922	0,19	0,804	-2,117	0,164	0,923
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Ruminococcaceae; Faecalibacterium	-1,811	0,153	0,621	-2,092	0,157	0,579	-1,535	0,295	0,834	0,659	0,671	0,923
Actinobacteria;Actinobacteria;Bifidobacteriales; Bifidobacteriaceae;Bifidobacterium	1,73	0,169	0,621	1,473	0,36	0,794	1,991	0,219	0,804	**6,225**	**0,0003***	**0,008****
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Eubacteriaceae;Pseudoramibacter_Eubacterium	2,248	0,212	0,669	2,429	0,255	0,702	2,066	0,341	0,834	-0,246	0,912	0,923
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales; [Odoribacteraceae];Butyricimonas	1,429	0,246	0,677	2,483	0,068	0,3	0,137	0,916	0,958	-0,187	0,901	0,923
Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Streptococcaceae;Streptococcus	1,633	0,279	0,684	3,083	0,062	0,3	0,191	0,904	0,958	1,324	0,479	0,923
Proteobacteria;Betaproteobacteria;Burkholderiales; Alcaligenaceae;Sutterella	-1,272	0,319	0,703	-1,059	0,467	0,826	-1,484	0,31	0,834	-0,653	0,679	0,923
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales; Bacteroidaceae;Bacteroides	-1,13	0,45	0,858	-1,09	0,526	0,826	-1,17	0,495	0,958	-1,234	0,508	0,923

Continua

Continuação

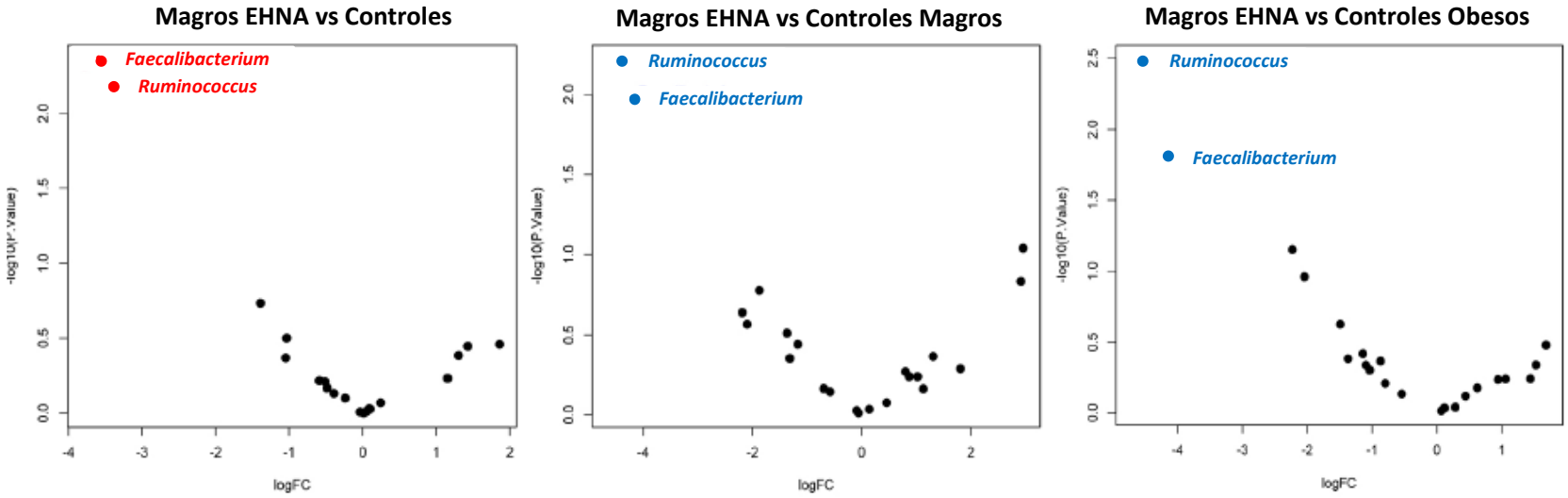
Filo/Classe/Ordem/Família/Gênero	Obesos EHNA *vs* Controles (logFC)	*p-value*	*p-value* ajustado	Obesos EHNA *vs* Controles Magros (logFC)	*p-value*	*p-value* ajustado	Obesos EHNA *vs* Controles Obesos (logFC)	*p-value*	*p-value* ajustado	Obesos EHNA *vs* Sobrepeso EHNA (logFC)	*p-value*	*p-value* ajustado
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Ruminococcaceae; Oscillospira	-0,559	0,589	0,858	-0,301	0,803	0,841	-0,819	0,507	0,958	0,9	0,491	0,923
Proteobacteria;Deltaproteobacteria; Desulfovibrionales;Desulfovibrionaceae;Bilophila	-0,568	0,696	0,858	-1,16	0,503	0,826	-0,09	0,958	0,958	-0,582	0,748	0,923
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales; [Odoribacteraceae];Odoribacter	0,538	0,692	0,858	-1,531	0,307	0,752	2,249	0,13	0,716	-1,617	0,342	0,923
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales; Lachnospiraceae;Blautia	0,518	0,633	0,858	0,58	0,642	0,827	0,456	0,715	0,958	1,272	0,35	0,923
Firmicutes;Erysipelotrichi;Erysipelotrichales; Erysipelotrichaceae;Holdemania	-0,404	0,719	0,858	-0,482	0,714	0,827	-0,328	0,806	0,958	-0,241	0,864	0,923
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales; Prevotellaceae;Prevotella	0,745	0,738	0,858	1,219	0,647	0,827	0,376	0,883	0,958	-1,072	0,696	0,923
Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Ruminococcaceae; Ruminococcus	-0,442	0,736	0,858	-0,406	0,781	0,841	-0,482	0,741	0,958	0,498	0,761	0,923
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales; Lachnospiraceae;Dorea	0,318	0,741	0,858	0,709	0,521	0,826	-0,07	0,949	0,958	0,261	0,862	0,923
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales; Porphyromonadaceae;Parabacteroides	0,277	0,822	0,897	-0,064	0,964	0,964	0,615	0,669	0,958	-0,267	0,862	0,923
Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae; Ruminococcus	0,19	0,856	0,897	0,532	0,66	0,827	-0,15	0,901	0,958	0,125	0,923	0,923
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales; Lachnospiraceae;Coprococcus	-0,043	0,967	0,967	0,486	0,684	0,827	-0,571	0,633	0,958	0,785	0,559	0,923

Continua

As mudanças na quantidade são relatadas como alterações de *log2 fold change* (*logFC*). O aumento ou a diminuição da quantidade bacteriana é expressa por um *logFC* positivo ou negativo e é proporcional ao valor absoluto *logFC*. O significado estatístico é expresso como valor p e valor p ajustado para comparações múltiplas. As variáveis significativas são destacadas em negrito.

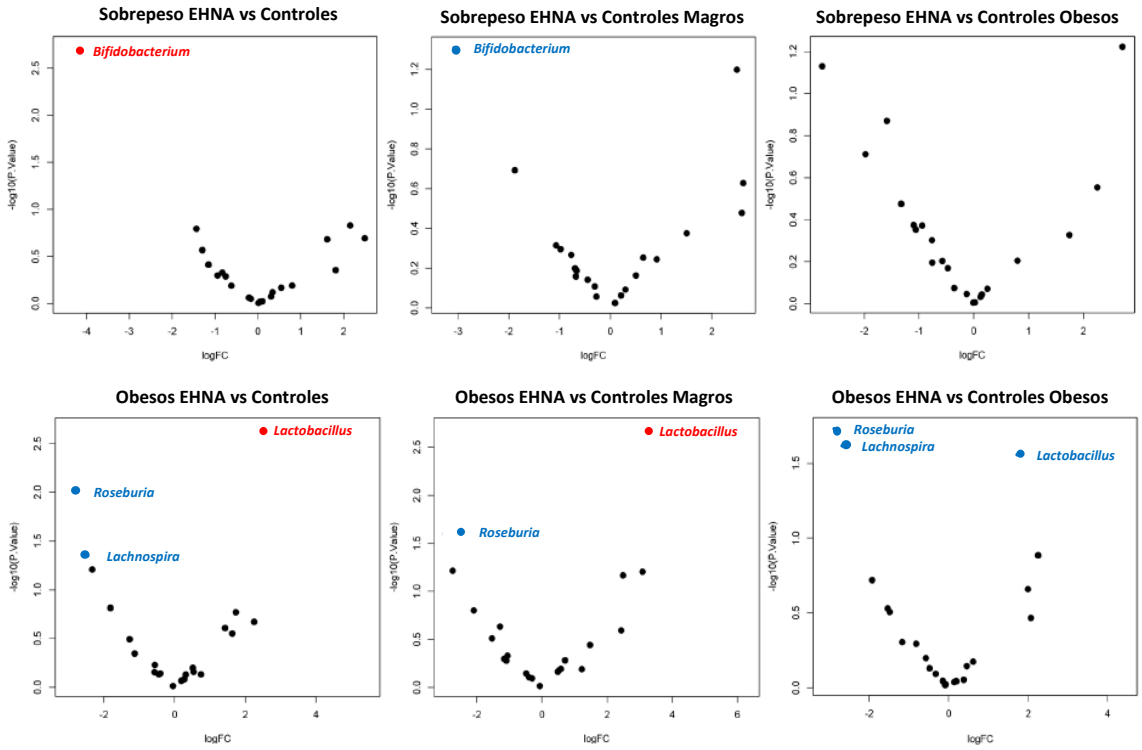
** resultados com *logFC* ≥±1 e *p-value* ajustado <0,05

* resultados com *logFC* ≥±1 e *p-value* <0,05



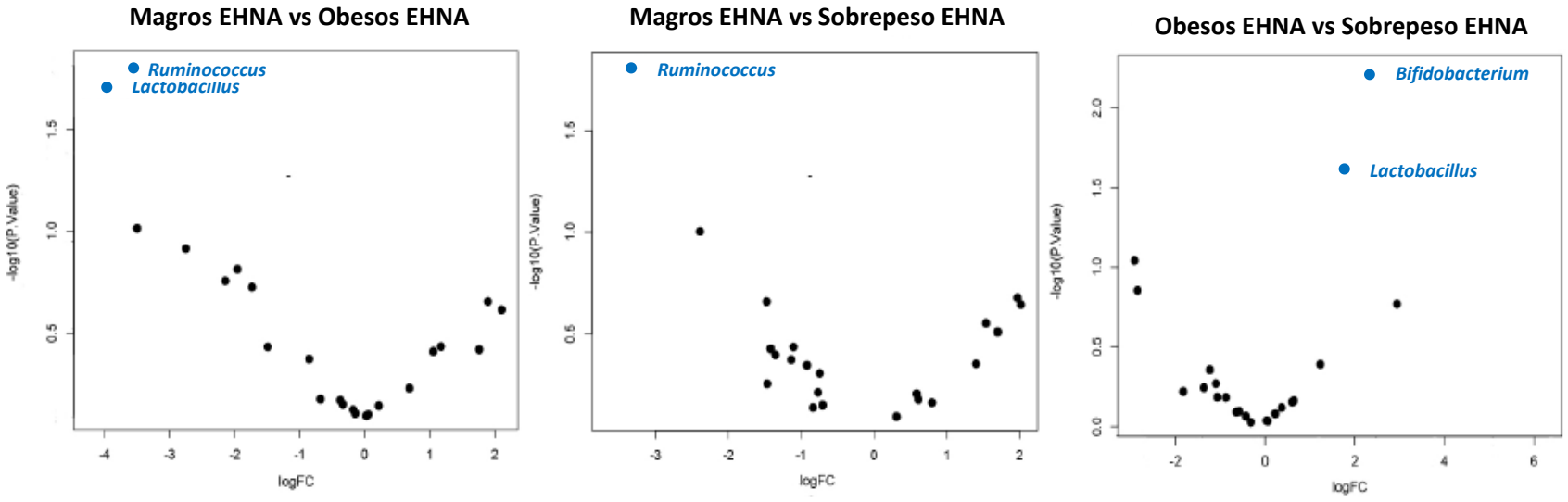
Os resultados considerados significativos (*logFC* ≥ ± 1 e valor p ajustado <0,05) são coloridos em vermelho, os resultados de interesse (*logFC* ≥ ± 1 e valor p <0,05) são coloridos em azul. O aumento ou a diminuição da quantidade bacteriana é expressa por um valor positivo ou negativo e é proporcional ao valor absoluto *logFC*.

Figura 4. *Volcano plot* de *log fold change* (*logFC*) e *p-value –log*10 que comparam a quantidade bacteriana em pacientes magros com Esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) e em indivíduos (magros e obesos) sem Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) utilizados como controle.



Os resultados considerados significativos (*logFC* ≥ ± 1 e valor p ajustado <0,05) são coloridos em vermelho, os resultados de interesse (*logFC* ≥ ± 1 e valor p <0,05) são coloridos em azul. O aumento ou a diminuição da quantidade bacteriana é expressa por um valor positivo ou negativo e é proporcional ao valor absoluto *logFC*.

Figura 5. *Volcano plot* de *log fold change* (*logFC*) e *p-value –log*10 que comparam a quantidade bacteriana em pacientes obesos e com sobrepeso com Esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) e em indivíduos (magros e obesos) sem Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) utilizados como controle.



Os resultados considerados significativos (*logFC* ≥ ± 1 e valor p ajustado <0,05) são coloridos em vermelho, os resultados de interesse (*logFC* ≥ ± 1 e valor p <0,05) são coloridos em azul. O aumento ou a diminuição da quantidade bacteriana é expressa por um valor positivo ou negativo e é proporcional ao valor absoluto *logFC*.

Figura 6. *Volcano plot* de *log fold change* (*logFC*) e *p-value –log*10 que comparam a quantidade bacteriana em pacientes magros, obesos e sobrepeso com Esteato-hepatite não alcoólica (EHNA).

A análise da alfa diversidade da MI não mostrou diferenças substanciais entre os grupos (Figura 7). O grupo de pacientes magros com EHNA apresentou resultados semelhantes aos indivíduos controles (magros e obesos) (p= 0,265), que por sua vez foram menores do que nos pacientes com sobrepeso e obesos com EHNA, porém sem significância estatística (p= 0,05). Pacientes obesos e sobrepeso com EHNA apresentaram valores maiores de alfa diversidade quando comparados aos indivíduos controle (magros e obesos), mas não apresentaram significância estatística (p= 0,05).

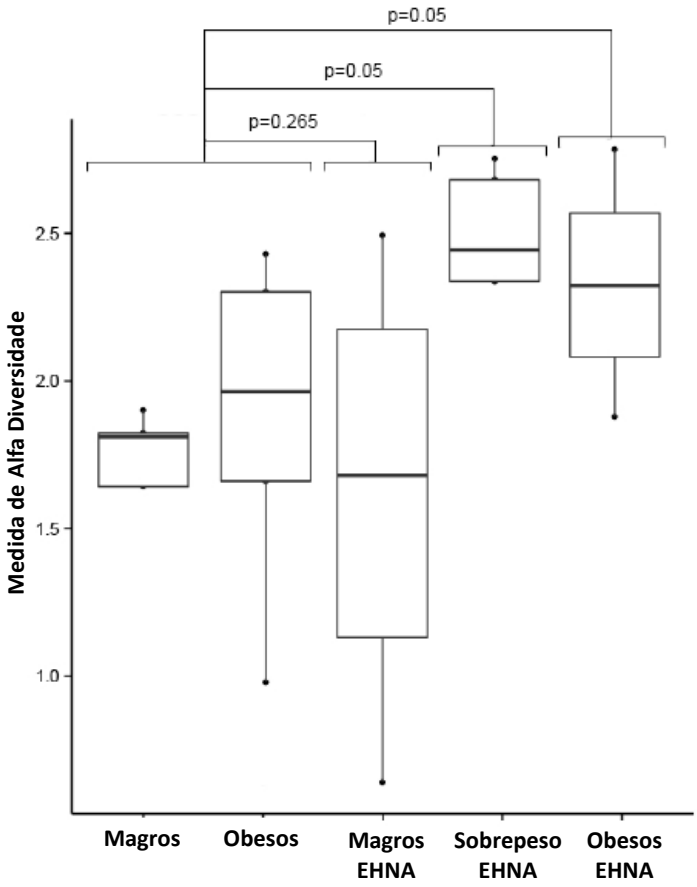


Figura 7. Alfa diversidade bacteriana (índice de Shannon) de pacientes magros, com sobrepeso e obesos e com Esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) e indivíduos (magros e obesos) sem Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) utilizados como controle de acordo com o Índice de massa corpórea (IMC).

De acordo com o recordatório alimentar de 7 dias, observou-se diferenças qualitativas entre os grupos. No grupo de pacientes magros com EHNA, o consumo de carboidratos simples (alimentos produzidos a partir de farinha branca, açúcar refinado) foi maior do que carboidratos complexos (alimentos integrais, frutas frescas e vegetais). Além disso, observou-se que o

consumo de proteínas de origem animal como carnes, leite e derivados foi maior do que proteína vegetal. Os medicamentos utilizados pelos pacientes deste grupo foram suplementação de N-acetilcisteína e metformina. A quantidade de exercício por semana desses pacientes não excedeu 90 minutos por semana. Por outro lado, os indivíduos do grupo magro sem DHGNA utilizados como controle apresentou baixo consumo de carboidratos simples e o consumo de carboidratos complexos apareceu em pelo menos duas refeições por dia. O consumo de proteína neste grupo foi bem variado, proteína de origem animal *vs* proteína vegetal, como feijão, lentilhas e sementes (chia, quinoa e gergelim). Nenhum dos indivíduos deste grupo estava em uso de medicação contínua. A quantidade de exercícios por semana também não excedeu 90 minutos semanais. Já nos grupos de pacientes com sobrepeso e, ou também, obesos com EHNA, observamos maior consumo de alimentos processados e superprocessados, como refrigerantes, lanches, *fast-food* e bebidas açucaradas (café, sucos) e baixo consumo de carboidratos complexos (alimentos integrais, frutas frescas e vegetais), levando a um baixo consumo de fibras, não atingindo 10 g por dia. O consumo de proteínas foi muito baixo, cerca de 10% do valor calórico total diário e maior consumo de proteína animal do que vegetal. As drogas utilizadas pelos pacientes deste grupo foram N-acetilcisteína, losartana, atenolol e fluoxetina. A maior parte desses pacientes não praticava nenhum tipo de exercício físico. No grupo de indivíduos obesos utilizados como controle, o recordatório alimentar de 7 dias demonstrou que o consumo de carboidratos simples predominou durante a semana observada,

principalmente alimentos de cafeteria e açúcar refinado. Em contraste, os carboidratos complexos foram consumidos na forma de frutas, em média uma unidade por dia. O consumo de proteínas animais, como carnes, leite integral e manteiga, foi maior do que de proteínas vegetais. Esses pacientes não relataram uso de medicação contínua, apenas um paciente relatou o uso de Fluoxetina. Nenhum deles praticava exercícios físicos.

Embora houvesse algumas diferenças qualitativas, tais como, os pacientes magros com EHNA apresentarem maior ingestão de lipídios na dieta do que os pacientes com sobrepeso e obesos com EHNA, essas diferenças não foram estatisticamente significativas (28,35% *vs* 23,05% e 24%, respectivamente, p= 0,618; (Tabela 7), estes dados foram semelhantes aos dos indivíduos (magros e obesos) sem DHGNA utilizados como controles (28,8% e 25,3% para indivíduos magros e obesos, p= 0,604). Da mesma forma, os pacientes obesos com EHNA apresentarem ingestão reduzida de fibra (6,8% *vs* 9,65% e 12,3% para os pacientes magros e com sobrepeso com EHNA, p= 0,242; estes valores foram de 12% e 9,2% para os indivíduos obesos e magros utilizados como controle respectivamente, p= 0,381). A ingestão calórica dos pacientes magros com EHNA foi maior do que a dos pacientes com sobrepeso e obesos com EHNA, porém não houve diferença estatística (1541 kcal *vs* 1160 kcal e 1200 kcal, respectivamente, p= 0,781). A ingestão calórica foi semelhante entre os indivíduos (magros e obesos) sem DHGNA utilizados como controle (1802 kcal e 1894 kcal, respectivamente, p= 0,552). No entanto, nem a ingestão de macronutrientes nem a ingestão

calórica foram associadas a diferenças específicas na composição da MI intestinal.

Tabela 7. Ingestão calórica, de macronutrientes e de fibras dos indivíduos do estudo.

Variáveis	Magro EHNA (4)	Sobrepeso EHNA (5)	Obeso EHNA (4)	Magro Contole (5)	Obeso Controle (5)	*p-value* (Pacientes EHNA)	*p-value* (Todos)
Ingestão de Carboidratos (%)	52,85 (38-58,1)	52,95 (50-61)	56,3 (44,7-61,8)	51,2 (32,2-54)	56 (43,2-62)	0,84	0,74
Ingestão de proteínas (%)	4,46 (13,6-24)	5,77 (13,2-25,8)	2,89 (14-19,7)	6,22 (17-32,8)	7,22 (13-27,3)	0,385	0,788
Ingestão de Lipídeos (%)	28,35 (21,7-40,3)	23,05 (14-36,8)	24 (20,5-41,3)	28,8 (27-35)	25,3 (25-29,9)	0,618	0,604
Ingestão de Fibras (%)	9,65 (7,1-16,5)	12,3 (8,7-21)	6,8 (3,3-11,6)	12 (9,9-15,4)	9,2 (1,7-17,5)	0,242	0,381
Ingestão Calórica (kcal)	1541,5 (970-2196)	1160 (961-3014)	1200 (1152-1803)	1802 (1527-2018)	1894 (1120-2010)	0,781	0,552

O escore médio para NAS foi maior em pacientes obesos com EHNA (6 pontos, intervalo 6-7) em comparação com os magros (5 pontos, intervalo 5-6) e sobrepeso com EHNA (5 pontos, intervalo 5-7) (p= 0,084). Três dos 4 pacientes magros com EHNA (75%), 3dos 5 pacientes com sobrepeso e EHNA (60%) e todos os pacientes obesos com EHNA apresentaram escores de fibrose maiores ou iguais a 2 de acordo com o escore de Kleiner e colaboradores (2005) (80) (Tabela 8). A pontuação NAS não foi associada a uma alteração específica da MI, enquanto um índice de fibrose maior ou igual a 2 foi associado ao aumento da quantidade de *Lactobacillus* (logFC 6,11, p= 0,0007, *p-value* ajustado p= 0,015).

Tabela 8. Distribuição dos escores de atividade necroinflamatória (NAS) e estadiamento da fibrose hepática secundária à EHNA dos pacientes do estudo segundo a classificação de Kleiner e colaboradores (2005) (80).

Variáveis	Magro EHNA (4)	Sobrepeso EHNA (5)	Obeso EHNA (4)	Magro Contole (5)	Obeso Controle (5)	*p-value* (Pacientes EHNA)	*p-value* (Todos)
NAS score	5 (5-6)	5 (5-7)	6 (6-7)	-	-	-	0,084
Estágio de Fibrose (Kleiner)	3 (1-4)	2 (0-4)	3 (3-4)		-	-	0,412
Fibrose ≥2	3 (75%)	3 (60%)	4 (100%)				

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Embora a DHGNA esteja comumente associada ao excesso de peso e à obesidade, uma pequena porcentagem de pacientes não apresenta sobrepeso ou obesidade e, os estudos sobre alterações da MI neste grupo de pacientes são escassos. Nosso estudo é o primeiro da América Latina a caracterizar a MI de pacientes magros com EHNA e compará-la com a MI de pacientes com sobrepeso e obesos com EHNA comprovada por biópsia e, com a de indivíduos saudáveis (magros e obesos) sem DHGNA.

Fatores genéticos e ambientais como sedentarismo e dieta inadequada podem ser um gatilho importante para o desenvolvimento da DHGNA tanto em pacientes magros quanto em obesos (43). O consumo excessivo de carboidratos simples e gorduras saturadas leva a disbiose que, por sua vez, aumenta a permeabilidade do epitélio intestinal favorecendo o crescimento de bactérias patogênicas no intestino, que, por sua vez, influenciam na obtenção de energia dos alimentos, aumentam produção de LPS, estimulam receptores pró-inflamatórios e, potencialmente, estimulam o desenvolvimento da obesidade e da DHGNA (18, 22).

No presente estudo a análise da composição da MI da população estudada foi heterogênea, mesmo quando estratificamos estes pacientes de acordo com o IMC e comparamos pacientes magros, com sobrepeso e obesos com EHNA e indivíduos magros e obesos sem EHNA.

Em nosso estudo, a análise dos filos bacterianos não demonstrou diferença significativa na composição da MI de pacientes magros, com sobrepeso e obesos com EHNA nem em indivíduos sem DHGNA. No entanto, dados da literatura mostram resultados discordantes em relação aos filos bacterianos de pacientes com DHGNA. Betrapally e colaboradores (2016) descreveram quantidades menores de *Bacteroidetes* em pacientes com DHGNA quando comparados a indivíduos saudáveis. Adicionalmente, demonstraram proporções maiores de *Firmicutes* em relação às quantidades de *Bacteroidetes* quando avaliaram a MI de camundongos magros e obesos (64). Outro estudo em pacientes com DHGNA mostrou associação entre esteatose e proporção aumentada de *Clostridium coccoides*, bactérias pertencentes ao filo *Firmicutes,* e redução na quantidade de *Bacteroidetes* (85). Estas discrepâncias provavelmente refletem não só as diferenças nas técnicas utilizadas para quantificação e análise dos dados gerados, mas também, características não homogêneas dos pacientes envolvidos nos estudos, incluíndo a não classificação histológica destes pacientes pela ausência de biópsia hepática. Na tentativa de encontar a melhor forma de avaliar a MI humana, Sharpton e colaboradores (2019) utilizaram diferentes métodos de sequenciamento microbiano e elucidaram como estas técnicas podem ser utilizadas para aprofundar a compreensão da composição da MI e sua função no espectro clínico da DHGNA (86).

Analisando a composição da MI da população de nosso estudo, encontramos uma redução significativa de bactérias do gênero

Faecalibacterium em pacientes magros com EHNA. *Faecalibacterium prausnitzii* é uma das bactérias produtoras de butirato que apresenta propriedades imunomoduladoras e anti-inflamatórias (87). O butirato, o propionato e o acetato são AGCC que derivam da degradação das bactérias de polissacarídeos indigestíveis da dieta e representam 10% da energia extraída da dieta (7, 88). A redução de *Faecalibacterium* observada na MI de nossos pacientes pode ter favorecido um ambiente pró-inflamatório, fator importante no desencadeamento da EHNA. Encontramos também uma redução significantiva de bactérias do gênero *Ruminococcus* nos pacientes magros com EHNA. Corroborando esses achados, Machado e colaboradores (2016) descreveram uma diminuição na família de *Ruminococcaceae* em pacientes com DHGNA (65), bem como, Da Silva e colaboradores (2018) demonstraram que pacientes com DHGNA apresentam quantidades menores de *Ruminococcus* independente do IMC (89), enquanto que, Boursier e colaboradores (2016) observaram que o aumento da quantidade de bactérias do gênero *Ruminococcus* foi preditor independente de fibrose hepática (≥F2) em pacientes com DHGNA (66). O gênero *Ruminococcus* é bastante heterogêneo e inclui espécies de bactérias benéficas e outras que apresentam papel pró-inflamatório. Por exemplo, as *Ruminococcus bromii* apresentam efeitos terapêuticos para doenças intestinais, pois são capazes de fermentar carboidratos complexos, como celulose, pectina e amido resistente (90). Já as *Ruminococcus gnavus* apresentaram efeitos pró-inflamatórios (91) e as *Ruminococcus albus 7* são capazes de produzir acetato e etanol e, com isto,

podem aumentar a permeabilidade intestinal, SCBDI e a inflamação hepática (92).

Na análise da MI dos pacientes obesos e com sobrepeso com EHNA, encontramos maior prevalência de bactérias do gênero *Lactobacillus* e uma quantidade reduzida de bactérias do gênero *Bifidobacteria* em comparação aos indivíduos sem DHGNA utilizados como controle. Quantidades aumentadas de *Bifidobacteria* foram relatadas como protetoras da barreira da mucosa intestinal e, também, como reguladoras dos níveis séricos de glicose por meio da via de sinalização da insulina e diminuição da citocina inflamatória IL-6 em camundongos diabéticos (31), enquanto que uma quantidade reduzida destas bactérias foi associada à maior permeabilidade intestinal e à maior absorção de gordura hepática em pacientes com EHNA (64, 93). O gênero *Lactobacillus* compreende mais de 180 espécies com importantes funções imunológicas e atividades metabólicas (94). Algumas destas bactérias produzem ácido láctico a partir da fermentação de carboidratos da dieta e podem produzir acetato e também etanol (95), podendo desenvolver danos hepáticos, como a inflamação, levando à progressão da EHNA (96). Por outro lado, algumas bactérias deste gênero como o *Lactobacillus rhamnosus* mostram efeitos protetores para saúde do hospedeiro podendo melhorar a permeabilidade da barreira intestinal, modular a síntese de triglicérides e transporte de colesterol hepático e reduzir inflamação hepática (97, 98). Curiosamente, os pacientes magros com EHNA apresentaram uma quantidade significantemente menor de *Lactobacillus* quando comparados com pacientes com sobrepeso com EHNA e

uma quantidade significantemente maior de *Lactobacillus* quando comparados com pacientes obesos com EHNA.

Na presente investigação o grupo de pacientes obesos com EHNA foi 100% feminino, o que pode ser um fator importante para explicar as diferenças expressivas da MI, como a quantidade aumentada de *Lactobacillus* e menor quantidade de *Ruminococcus* nos pacientes deste grupo em relação aos demais. Sheng e colaboradores (2017) (94) demonstraram que há diferenças entre homens e mulheres na sinalização do *Farnesoid X receptor* (FXR) e no processo de desenvolvimento de doenças metabólicas, bem como, da MI. As interações entre FXR e hormônios sexuais já foram descritas na literatura. Trottier e colaboradores (2011) demonstraram uma redução significativa na sinalização e concentração total de ácidos biliares relacionada ao sexo masculino enquanto que em mulheres com DHGNA, a sinalização e concentração total de ácidos biliares permaneceu praticamente inalterada (95). Recentemente, Org e colaboradores (2016) demonstraram em estudo experimental que alterações hormonais aumentam diretamente a síntese de ácidos biliares em camundongos fêmeas quando comparados aos machos, bem como, diferenças na composição da MI. Neste estudo camundongos machos apresentaram quantidades maiores de bactérias protetoras do epitélio intestinal, enquanto as fêmeas apresentaram quantidades maiores de *Bacteroidetes* e bactérias produtoras de butirato (99).

A diversidade bacteriana é importante para o equilíbrio simbiótico e manutenção da homeostase intestinal e a baixa diversidade da MI é uma

característica da disbiose intestinal e pode afetar a saúde do hospedeiro (17). Embora Del Chierico e colaboradores (2017) tenham descrito uma diversidade bacteriana reduzida em pacientes com DHGNA (100), em nosso estudo não observamos alterações significativas da diversidade microbiana em pacientes com EHNA de acordo com IMC. A diversidade bacteriana intestinal de pacientes magros com EHNA foi semelhante à de indivíduos (magros e obesos) sem DHGNA utilizados como controle e, menor quando comparada aos pacientes com sobrepeso e obesos com EHNA.

Considerando o fato de que em nosso estudo não estabelecemos uma dieta com padronização de consumo energético e de macronutrientes, não pudemos esclarecer com precisão o papel da dieta nos achados da MI. Para avaliar se a ingestão calórica total ou a ingestão específica de macronutrientes poderia ter impacto na composição da MI da população estudada, realizamos uma avaliação da ingestão alimentar diária durante 7 dias em todos os pacientes. A análise da ingestão alimentar total de calorias e macronutrientes de nossos pacientes não evidenciou diferenças significativas quando comparamos pacientes magros, com sobrepeso e obesos com EHNA, nem entre pacientes com EHNA e indivíduos (magros e obesos) sem DHGNA. A ingestão dietética dos pacientes magros com EHNA foi semelhante à dos indivíduos sem DHGNA, mas foi caracterizada por maior ingestão de carboidratos simples, de proteína animal e de lipídeos. Segundo Pistelli e colaboradores (2010), o desenvolvimento de doenças metabólicas pode ser influenciado pelas proporções relativas dos dois maiores filos bacterianos

humanos, *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, favorecendo a a extração e a estocagem de calorias ingeridas na dieta (101). O maior consumo de lipídeos observado em nosso estudo pode ter levado a um aumento, mas sem significância estatística, das quantidades de *Bacteroidetes* o que poderia ter favorecido o desenvolvimento e progressão da DHGNA. De acordo com estudos anteriores, a gordura e o colesterol da dieta parecem interagir sinergicamente para induzir as características metabólicas e hepáticas da EHNA (102). Estudos têm demonstrado o papel da dieta na composição da MI, uma vez que, tanto a quantidade quanto a qualidade da dieta podem modular a MI num período de 3 a 4 dias (65, 103). Um estudo experimental avaliou animais submetidos a uma dieta com alto teor de gordura e demonstrou aumento da relação de *Firmicutes* e *Bacteroidetes* e diminuição da diversidade microbiana (104). Outro estudo demonstrou que camundongos alimentados com dieta rica em gordura apresentam aumento da relação de *Firmicutes e Bacteroidetes,* e este está associado ao aumento da permeabilidade intestinal que precede o desenvolvimento de endotoxemia metabólica, inflamação e distúrbios associados que podem modificar a concentração de LPS plasmático nestes animais (105). Aranha e colaboradores (2008) observaram que quantidades aumentadas de *Bacteroidetes* estavam associadas a um aumento de ácido biliar desoxicólico, que é conhecido por induzir apoptose nos hepatócitos favorecendo a progressão da EHNA (106). As bactérias do filo *Bacteroidetes* tem sido associadas a um aumento na produção de ácidos graxos de cadeia ramificada derivados da fermentação de aminoácidos, que, quando produzidos

em excesso podem promover RI através da fosforilação do receptor de insulina (107).

Estudos anteriores comprovam que as bactérias intestinais extraem energia extra de resíduos indigestíveis, como amido resistente e fibra dietética, que não são completamente hidrolisados por enzimas no intestino delgado (14, 63). Os principais produtos da fermentação de fibras produzidos por bactérias intestinais são os AGCC, que são absorvidos pela mucosa colônica e podem ser utilizados para a síntese *de novo* de lipídios ou glicose (108). Curiosamente, embora a ingestão média de fibras relatada pelos pacientes magros com EHNA tenha sido semelhante a ingestão dos indivíduos magros e obesos sem DHGNA conforme citado anteriormente, a quantidade de bactérias *Faecalibacterium*, produtoras de AGCC, foi menor nas fezes dos pacientes magros com EHNA. Apesar de nossos resultados não demonstrarem associação entre a ingestão dietética, de macronutrientes e a ingestão calórica total, não podemos desconsiderar que fatores dietéticos poderiam influenciar na composição da MI de pacientes magros com EHNA.

Estudos recentes já associaram a composição da MI à gravidade da EHNA (61, 66). Embora os escores NAS não tenham sido associados às alterações específicas da MI, uma maior quantidade de *Lactobacillus* foi encontrada em indivíduos com um escores de fibrose maior ou igual a 2. Isso pode depender da maior prevalência de *Lactobacillus* entre pacientes obesos com EHNA, que também apresentaram maiores pontuações de fibrose. No entanto, um possível papel ativo de determinadas bactérias na progressão da

EHNA em relação a fibrose significativa não deve ser desconsiderado. Recentemente, Lomba e colaboradoes (2018) demonstraram evidências preliminares de uma nova assinatura metagenômica derivada da MI para detectar fibrose moderada e avançada na DHGNA. Os autores observaram que os pacientes com fibrose leve/moderada apresentaram quantidades maiores de bactérias do filo *Firmicutes* e espécies de bactérias *Eubacterium rectale* e *Bacteroides vulgatus* enquanto que os pacientes com fibrose avançada apresentaram quantidades aumentadas de bactérias do filo *Proteobacteria* e espécies de bactérias *Bifidobactéria vulgatus* e *Escherichia coli* (109).

Embora nosso estudo seja o primeiro a demonstrar que pacientes magros com EHNA possuem composição diferente da MI em comparação a de pacientes com sobrepeso e obesos com EHNA e a de indivíduos (magros e obesos) sem DHGNA, uma de nossas limitações está relacionada ao fato de não conseguimos incluir um número maior de pacientes magros com EHNA comprovados por biópsia hepática, o que caracterizaria melhor esta população. Apesar de nossos resultados mostrarem que fatores dietéticos podem influenciar a composição da MI, não podemos desconsiderar o fato de não termos estabelecido uma dieta com padronização de consumo energético e de macronutrientes para elucidarmos com precisão o papel da dieta nos achados da MI destes pacientes. Outra limitação deste estudo que deve ser valorizada é o fato do grupo de pacientes magros controles apresentar mediana de idade menor do que a dos demais grupos, visto que estudos demonstram que a MI varia de acordo com a faixa etária (110, 111). Adicionalmente, a

heterogeneidade na distribuição dos gêneros entre os grupos presente em nosso estudo também deve ser considerada, uma vez que estudos têm demonstrado que alterações hormonais modulam a MI, influenciando nos processos metabólicos da DHGNA (94, 112). Independente dos resultados relevantes apresentados em nosso estudo, novas investigações são necessárias para confirmar o real significado das diferenças encontradas na MI de pacientes magros com EHNA em relação à de pacientes com sobrepeso e obesos com EHNA e à de indivíduos (magros e obesos) sem DHGNA.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1. Não houve diferença significativa na alfa diversidade, bem como, entre os filos bacterianos nos grupos estudados;

2. Pacientes magros com EHNA apresentaram menor quantidade de bactérias do gênero *Ruminococcus* do que pacientes com sobrepeso com EHNA e menor quantidade de *Lactobacillus* do que pacientes obesos com EHNA;

3. Pacientes magros, com sobrepeso e obesos com EHNA apresentam gêneros bacterianos diferentes em relação aos indivíduos sem DHGNA utilizados como controle. Pacientes obesos com EHNA apresentaram maior quantidade de bactérias do gênero *Lactobacillus* e menor quantidade de bactérias do gênero *Bifidobacterium* quando comparados com pacientes com sobrepeso com EHNA e indivíduos sem DHGNA utilizados como controle;

4. A ingestão de macronutrientes isolados ou a ingestão de calorias não foi associada às diferenças específicas na composição da MI dos pacientes com ENHA e indivíduos sem DHGNA utilizados como controle.

5. Um índice de fibrose maior ou igual a 2 foi associado à uma quantidade maior de bactérias do gênero *Lactobacillus* em pacientes com EHNA.

ANEXOS

7. ANEXOS

ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dos Indivíduos Controles.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1.NOME .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: ..... SEXO: .M □ F □

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO ..... Nº .....APTO: .....

BAIRRO: .....CIDADE: .....

CEP: .....TELEFONE: DDD (.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: .....SEXO: M □ F □

DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....

ENDEREÇO: ..... Nº.....APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE: .....

CEP: .....TELEFONE: DDD (.....) .....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Avaliação da Microbiota na Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA)

2. PESQUISADOR: PROF. DRA. Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira

CARGO/FUNÇÃO: PROF. LIVRE DOCENTE DO DEPARTAMENTO DE GASTROENTEROLOGIA

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº **CRM** 75499.

UNIDADE DO HCFMUSP: DEPARTAMENTO DE GASTROENTEROLOGIA.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 24 MESES

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

A Doença Hepática Gordurosa Não Alcóolica (DHGNA) é a doença mais comum do fígado, que pode se tornar crônica em alguns casos. Uma das manifestações importantes é o depósito de gordura (esteatose) no fígado, que está relacionado com obesidade, diabetes, pressão alta e aumento das gorduras do sangue. O objetivo deste estudo é avaliar se algumas bactérias que estão no intestino podem apresentar associação com a esteatose (gordura) hepática. Este estudo será desenvolvido em pacientes que tenham a esteatose e em indivíduos saudáveis (controles) que não apresentam a doença, que é seu caso.

Logo, venho por meio deste termo convidá-lo(a) a participar, de forma voluntária, deste estudo. A seguir será feita uma explicação de todos os procedimentos que serão feitos nesta pesquisa.

Sua ficha médica será analisada para conhecer a sua doença, os remédios que você toma, seus exames clínicos, verificar se você tem alguma outra doença além da doença hepática gordurosa não alcoólica e avaliar outras informações médicas que possam ser úteis.

PROCEDIMENTOS

Você passará por avaliações que incluirão:

- consulta com o nutricionista, na qual você responderá a questionários de avaliação do consumo alimentar, terá seu peso, altura e cincunferência da cintura medidos, assim como cálculo de seu índice de massa corpórea e descrição de sua composição corporal de gordura por meio do teste de Bioimpedância.

- análise de suas fezes, por meio da coleta de material (fezes) para saber quais as bactérias que existem no seu intestino e coleta de sangue para testes sanguíneos.

DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS:

- Bioimpedância: o exame de Bioimpedância não ocasiona dor nem mal-estar. Não há desconforto esperado na realização deste exame.

- Exames de sangue: os desconfortos da coleta de sangue serão os mesmos de qualquer outro exame laboratorial, incluindo desconforto no local da punção.

-Coleta de fezes: desconforto de coleta de fezes semelhante a qualquer coleta de fezes.

BENEFÍCIOS

Não se esperam benefícios diretos para você neste estudo, já que você não tem a esteatose, nem apresenta obesidade. Será somente analisada a composição de suas bactérias intestinais e exames bioquímicos que avaliam colesterol, glicose no sangue e enzimas do seu fígado.

ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

Você terá total liberdade de perguntar sobre todos os procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa a fim de que quaisquer dúvidas sejam esclarecidas.

A qualquer momento, você poderá optar por deixar de participar do estudo. Caso ocorra algum dano à saúde decorrente da pesquisa, será assegurado o seu direito de receber assistência médica no Hospital das Clínicas (HC-FMUSP).

As suas informações pessoais serão mantidas em segredo. Os dados coletados serão usados apenas para fins de publicação científica.

Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, em relação aos exames e consultas. As despesas com relação a condução serão de responsabilidade do paciente. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa, a qual será financiada com recursos próprios da Disciplina de Gastroenterologia.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 – e-mail: cappesq@hcnet.usp.br.

CONFIDENCIALIDADE

As informações médicas geradas por esta pesquisa farão parte do seu prontuário hospitalar. Aquelas informações que não constarem no seu prontuário serão mantidas no arquivo dos pesquisadores e identificadas apenas por um número. Os resultados desse estudo poderão ser publicados em uma revista ou livro texto da área médica com a finalidade de ensinamento. Os autores se comprometem a usar os dados apenas com os propósitos desta pesquisa.

SOLICITAÇÃO DE INFORMAÇÕES ADICIONAIS

O(a) senhor(a) poderá solicitar mais informações a respeito do estudo a qualquer momento. Em qualquer etapa do estudo, o senhor (a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa. O principal investigador é a Prof. Dra. Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira, que pode ser encontrada no endereço no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, telefone (s) 2661-7830. Se o senhor(a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contado com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar, telefone 3069-6442, ramais 16,17,18 ou 20, fax 3069-6442, ramal 26, ou pelo email: cappesq@hcnet.usp.br.

O(a) senhor(a) será informado sobre novas descobertas que possam influenciar a continuidade da sua participação na pesquisa.

RECUSA OU ABANDONO DO ESTUDO

O(a) senhor(a) está livre a recusar-se a participar, retirar o seu consentimento informado ou abandonar o referido projeto, a qualquer momento, sem prejuízo à continuidade de seu tratamento na instituição.

Eu, _____, fui informado(a) dos objetivos e da justificativa do estudo" Avaliação da Microbiota na Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA)

.", de forma clara e detalhada, conforme especificados no termo de consentimento livre e esclarecido. Recebi informações específicas sobre os procedimentos aos quais serei submetido(a), seus desconfortos e riscos, bem como da utilização de material biológico para estudo.

Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disso, terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa durante o andamento da mesma.

Eu discuti com o Dr. _____ sobre minha decisão em participar deste estudo. Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou foram lidas para mim.

Ficou claro que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Fui informado/(a) que todos os custos relacionados a exames diagnósticos e tratamento médico serão cobertos por verbas próprias do Projeto de Pesquisa.

Declaro ser de livre vontade minha participação nesta pesquisa, e que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____/____/____

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dos pacientes com Doença hepática gordurosa não alcoólica (DGHNA).

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1.NOME: .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: ..... SEXO: M □ F □

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE: .....

CEP..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: ..... SEXO: M □ F □

DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....

ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE: .....

CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....) .....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Avaliação da Microbiota na Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA)

2. PESQUISADOR: PROF. DRA. Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira

CARGO/FUNÇÃO: PROF. LIVRE DOCENTE DO DEPARTAMENTO DE GASTROENTEROLOGIA

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº. **CRM** 75499.

UNIDADE DO HCFMUSP: DEPARTAMENTO DE GASTROENTEROLOGIA.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 24 MESES

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

A Doença Hepática Gordurosa Não Alcóolica (DHGNA) é a doença mais comum do fígado, que pode se tornar crônica em alguns casos. Uma das manifestações importantes é o depósito de gordura (esteatose) no fígado, que está relacionado com obesidade, diabetes, pressão alta e aumento das gorduras do sangue. O objetivo deste estudo é avaliar se algumas bactérias que estão no seu intestino apresentam associação com a esteatose (gordura) hepática. Este estudo será desenvolvido somente em pacientes que já tenham efetuado a biópsia de fígado até 1 ano, que é seu caso.

Logo, venho por meio deste termo convidá-lo(a) a participar, de forma voluntária, deste estudo. A seguir será feita uma explicação de todos os procedimentos que serão feitos nesta pesquisa.

Sua ficha médica será analisada para conhecer a sua doença, os remédios que você toma, seus exames clínicos, verificar se você tem alguma outra doença além da doença hepática gordurosa não alcoólica e avaliar outras informações médicas que possam ser úteis.

PROCEDIMENTOS

Você passará por avaliações que incluirão:

- consulta com o nutricionista, na qual você responderá a questionários de avaliação do consumo alimentar, terá seu peso, altura e cincunferência da cintura medidos, assim como cálculo de seu índice de massa corpórea e descrição de sua composição corporal de gordura por meio do teste de Bioimpedância.

- análise de suas fezes, por meio da coleta de material (fezes) para saber quais as bactérias que existem no seu intestino e coleta de sangue para testes sanguíneos.

DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS:

- Bioimpedância: o exame de Bioimpedância não ocasiona dor nem mal-estar. Não há desconforto esperado na realização deste exame.

- Exames de sangue: os desconfortos da coleta de sangue serão os mesmos de qualquer outro exame laboratorial, incluindo desconforto no local da punção.

-Coleta de fezes: desconforto de coleta de fezes semelhante a qualquer coleta de fezes.

BENEFÍCIOS

Você será avaliado e iremos desenvolver condutas dietéticas adequadas à sua condição clínica e física. Se você participar deste estudo poderá melhorar a sua alimentação, reduzir o seu peso corporal e consequentemente o depósito de gordura no seu fígado, o que trará benefícios para sua saúde e proporcionará maior qualidade de vida.

ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

O paciente (ou o seu responsável) terá total liberdade de perguntar sobre todos os procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa a fim de que quaisquer dúvidas sejam esclarecidas.

A qualquer momento, você poderá optar por deixar de participar do estudo sem que isso prejudique a continuidade da assistência médica prestada. Caso ocorra algum dano à saúde decorrente da pesquisa, será assegurado o seu direito de receber assistência médica no Hospital das Clínicas (HC-FMUSP).

As suas informações pessoais serão mantidas em segredo. Os dados coletados serão usados apenas para fins de publicação científica.

Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, em relação aos exames e consultas. As despesas com relação a condução serão de responsabilidade do paciente. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa, a qual será financiada com recursos próprios da Disciplina de Gastroenterologia.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 – e-mail: cappesq@hcnet.usp.br.

CONFIDENCIALIDADE

As informações médicas geradas por esta pesquisa farão parte do seu prontuário hospitalar. Aquelas informações que não constarem no seu prontuário serão mantidas no arquivo dos pesquisadores e identificadas apenas por um número. Os resultados desse estudo poderão ser publicados em uma revista ou livro texto da área médica com a finalidade de ensinamento. Os autores se comprometem a usar os dados apenas com os propósitos desta pesquisa.

SOLICITAÇÃO DE INFORMAÇÕES ADICIONAIS

O(a) senhor(a) poderá solicitar mais informações a respeito do estudo a qualquer momento. Em qualquer etapa do estudo, o senhor (a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa. O principal investigador é a Prof. Dra. Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira, que pode ser encontrada no endereço no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, telefone (s) 2661-7830. Se o senhor(a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contado com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar, telefone 3069-6442, ramais 16,17,18 ou 20, fax 3069-6442, ramal 26, ou pelo email: cappesq@hcnet.usp.br.

O(a) senhor(a) será informado sobre novas descobertas que possam influenciar a continuidade da sua participação na pesquisa.

RECUSA OU ABANDONO DO ESTUDO

O(a) senhor(a) está livre a recusar-se a participar, retirar o seu consentimento informado ou abandonar o referido projeto, a qualquer momento, sem prejuízo à continuidade de seu tratamento na instituição.

Eu, _____, fui informado(a) dos objetivos e da justificativa do estudo" Avaliação da Microbiota na Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA)

.", de forma clara e detalhada, conforme especificados no termo de consentimento livre e esclarecido. Recebi informações específicas sobre os procedimentos aos quais serei submetido(a), seus desconfortos e riscos, bem como da utilização de material biológico para estudo.

Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disso, terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa durante o andamento da mesma.

Eu discuti com o Dr. _____ sobre minha decisão em participar deste estudo. Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou foram lidas para mim.

Ficou claro que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Fui informado/(a) que todos os custos relacionados a exames diagnósticos e tratamento médico serão cobertos por verbas próprias do Projeto de Pesquisa.

Declaro ser de livre vontade minha participação nesta pesquisa, e que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

ANEXO C – Parecer Substanciado da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – HCFMUSP.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA USP - HCFMUSP

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da Microbiota na Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA)
Pesquisador: CLAUDIA PINTO MARQUES SOUZA DE OLIVEIRA
Área Temática:
Versão: 2
CAAE: 14813113.2.0000.0068
Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 335.530
Data da Relatoria: 03/07/2013

Apresentação do Projeto:
Estudo com 30 pacientes diagnosticados por biópsia hepática com Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica (DHGNA) (15 pacientes com esteatose; 15 pacientes com esteat-hepatite), matriculados no Ambulatório de Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica (A2MG700) da Disciplina de Gastroenterologia Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), que tenham realizado biópsia hepática, indicada de acordo com o protocolo de rotina assistencial de atendimento do serviço. O grupo controle será feito com 10 indivíduos saudáveis, com IMC normal, sem diabetes ou sintomas gastrointestinais crônicos.Todos os pacientes realizarão avaliações antropométricas e da composição corporal, bem como análise de variáveis clínicas, coleta do DNA fecal, exames laboratoriais e de imagem (ultrassonografia de abdome) no início do estudo. o propósito do estudo é compreender

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

melhor o papel da microbiota intestinal na progressão da DHGNA, dentre os muitos fatores que causam esta doença. Com isso, espera-se que o estudo contribua para a compreensão e explicação da fisiopatogênese e terapêutica na DHGNA. Os sujeitos de estudo serão adultos de ambos os sexos e de qualquer raça, com idade entre 18 a 75 anos, Presença de DHGNA, confirmada pela histologia hepática e que deem seu consentimento livre e esclarecido para participar da pesquisa. A coleta de dados inclui: a)consulta com o nutricionista para preenchimento de questionários de avaliação do consumo alimentar, pesagem, mensuração da altura e circunferência da cintura, cálculo de índicede massa corpórea, teste de Bioimpedância para descrição da composição corporal de gordura; b)análise
das fezes; c)análise de sangue
Trata-se de pesquisa de mestrado

Objetivo da Pesquisa:
Avaliar a composição da microbiota fecal em pacientes portadores de DHGNA e correlacionar com a gravidade da lesão histológica hepática neste pacientes.
End point do estudo: Identificar a diferença entre a microbiota de pacientes com DHGNA em relação ao grupo controle.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
Coleta de sangue, desconforto da coleta de fezes, deslocamentos para a consulta com nutricionista, coleta e realização de exames, desconforto do ultrassom abdominal.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:
Foram completados pontos incompletos do projeto

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi feito TCLE para grupo controle. Linguagem do TCLE de ambos grupos foi modificada para se tornar mais simples.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O TCLE para o paciente foi refeito usando linguagem mais simples e excluindo as informações do primeiro parágrafo que falavam da gravidade da doença, uma vez que já são orientados sobre isso na consulta e nos acompanhamentos de rotina. O grupo controle, com 10 participantes, será recrutado por divulgação interna na FMUSP, estando claro que não há benefícios diretos para o grupo. Foi elaborado TCLE para os sujeitos do grupo controle

PENDÊNCIAS ATENDIDAS

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com o ítem IX.2 da Resolução CNS nº 196/96 ¿ cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c)apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA USP - HCFMUSP

Continuação do Parecer: 335.530

SAO PAULO, 17 de Julho de 2013

Assinador por:
Luiz Eugênio Garcez Leme
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

ANEXO D – Artigo científico publicado na Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases 2018; 28(4):369-384.

Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases (2018) 28, 369–384

Available online at www.sciencedirect.com

Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/nmcd

Gut microbiome composition in lean patients with NASH is associated with liver damage independent of caloric intake: A prospective pilot study*

S.M.B. Duarte [a], J.T. Stefano [a], L. Miele [b,**], F.R. Ponziani [b], M. Souza-Basqueira [c], L.S.R.R. Okada [a], F.G. de Barros Costa [a], K. Toda [a], D.F.C. Mazo [a], E.C. Sabino [c], F.J. Carrilho [a], A. Gasbarrini [b], C.P. Oliveira [a,*]

[a] Divisão de Gastroenterologia e Hepatologia, Departamento de Gastroenterologia (LIM-07), Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil
[b] Division of Internal Medicine, Gastroenterology and Hepatology, Area Gastroenterologica, Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli Università Cattolica del Sacro Cuore, Rome, Italy
[c] Departamento de Doenças Infecciosas e Instituto de Medicina Tropical, Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil

Received 13 March 2017; received in revised form 9 October 2017; accepted 13 October 2017
Handling editor: A. Siani
Available online 26 October 2017

KEYWORDS
Gut microbiome;
NASH;
Lean;
Obese;
Overweight

Abstract *Background and Aim:* The aim of the study was to compare the gut microbiomes from obese and lean patients with or without NASH to outline phenotypic differences.
Methods and Results: We performed a cross-sectional pilot study comprising biopsy-proven NASH patients grouped according to BMI. Microbiome DNA was extracted from stool samples, and PCR amplification was performed using primers for the V4 region of the 16S rRNA gene. The amplicons were sequenced using the Ion PGM Torrent platform, and data were analyzed using QIIME software. Macronutrient consumption was analyzed by a 7-day food record. Liver fibrosis $\geq$ F2 was associated with increased abundance of Lactobacilli ($p = 0.0007$). NASH patients showed differences in *Faecalibacterium*, *Ruminococcus*, *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* abundance compared with the control group. Lean NASH patients had a 3-fold lower abundance of *Faecalibacterium* and *Ruminococcus* ($p = 0.004$), obese NASH patients were enriched in Lactobacilli ($p = 0.002$), and overweight NASH patients had reduced *Bifidobacterium* ($p = 0.018$). Moreover, lean NASH patients showed a deficiency in *Lactobacillus* compared with overweight and obese NASH patients. This group also appeared similar to the control group with regard to gut microbiome alpha diversity. Although there were qualitative differences between lean NASH and overweight/obese NASH, they were not statistically significant ($p = 0.618$). The study limitations included a small sample size, a food questionnaire that collected only qualitative and

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; CSS, cumulative sum scaling; DNA, deoxyribonucleic acid; GGT, gamma glutamyltransferase; HC, healthy controls; HCC, hepatocellular carcinoma; H.E, hematoxylin-eosin; HFD, high-fat diet; LPS, lipopolysaccharides; NAS, NASH Clinical Research Network Scoring System; NAFLD, Nonalcoholic fatty liver disease; NASH, Nonalcoholic steatohepatitis; PCoA, Principal Coordinates Analysis; PCR, polymerase chain reaction; rRNA, ribosomal RNAs; SCFAs, short chain fatty acids.

* Financial support: This work is supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo grant 2013/06828-0.

* Corresponding author. Divisao de Gastroenterologia e Hepatologia, Departamento de Gastroenterologia (LIM-07), Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de Sao Paulo, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar nº 255, Instituto Central, # 9159, 05403-000, Sao Paulo, SP, Brazil. Fax: +55 11 2661 7830.
** Corresponding author. Division of Internal Medicine, Gastroenterology and Hepatology, Area Gastroenterologica, Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli Università Cattolica del Sacro Cuore, 8 Largo Gemelli, 00168 Rome, Italy.
E-mail addresses: luca.miele@policlinicogemelli.it (L. Miele), claudia.oliveira220@fm.usp.br (C.P. Oliveira).

https://doi.org/10.1016/j.numecd.2017.10.014
0939-4753/0 2017 The Italian Society of Diabetology, the Italian Society for the Study of Atherosclerosis, the Italian Society of Human Nutrition, and the Department of Clinical Medicine and Surgery, Federico II University. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

ANEXO E – Ficha de avaliação nutricional.

FICHA DE AVALIAÇÃO NUTRICIONAL

Identificação (início do protocolo: ___ /___ /___)

Nome: _____

Data de nascimento: _____ idade: _____

Sexo: _____ Profissão:_____ Estado Civil:_____

Fone: _____ RG: _____ Data da Biópsia: ___/___/___

Endereço: _____

HISTÓRICO CLÍNICO

	HMF		
	Obesidade familiar		Pai
			Mãe
	Diabetes mellitus		
	HAS		
	Cardiopatias		
	Dislipidemias		
	Câncer		Gastrointestinal
			Ñ gastrointestinal
	Outros:		

	Histórico de peso		
	Início de Obesidade		Nunca obeso
			Sempre obeso
			0 -13 anos
			Após 13 anos
			Após gestação
			Após evento
	Utilizou vários tratamentos:		Sim
			Não

OBSERVAÇÕES: _____

P ao nascer: _____

P máx: _____

P Mín: _____

P hab: _____

Observações sobre tratamentos realizados:
Medicação:
Efeitos colaterais:
Resposta:

Histórico de Doenças Associadas

	Cardiopatia		Anormalidade respiratória
	Doença coronária		Esteatose hepática
	Diabetes mellitus		Anormalidade endócrina
	Dislipidemias		HAS
	Depressão		Pro. Músc. Esquelético
	Infertilidade		Outros

Hábitos de vida: Tabagismo
_____

Atividade física: _____ nenhuma _____ lazer _____ programada (frequência_____) qual?_____

Recordatório de 24 horas (R24h)

D – Horário: _____ Local: _____

_____
_____
_____

C – Horário: _____ Local: _____

_____
_____
_____

A – Horário: _____ Local: _____

_____
_____
_____

L – Horário: _____ Local: _____

_____
_____
_____

J – Horário: _____ Local: _____

_____
_____
_____

C – Horário: _____ Local: _____

_____
_____
_____

Comportamento alimentar: ( ) Hiperfagia ( ) Comp. Alimentar ( ) Trans. Do comer noturno

ALIMENTO	Frequência
Hortaliça	
Fruta	
Carne	
Frango	
Peixe Integrais	
Leguminosas	
Leite	
Queijo	
Iogurte	
Fritura	
Doce	
Açúcar	
Adoçante	
Refrigerante	
Bebida alcoólica	

Líquidos ao dia (especificar o que): _____

Kg de açúcar ao mês: _____

Latas de óleo ao mês: _____

Nº de pessoas na casa: _____

Exame Físico e queixas referente ao TGI

Sintomas	Frequência
Náusea	
Vômito	
Refluxo	
Dor Epigástrica	
Azia/ queimação	
Dor abdominal	
Flatulência	
Outros:	
Hábito intestinal:	

ANEXO F – Registro alimentar de 7 dias.

REGISTRO ALIMENTAR (7 DIAS)		
Nome: Data: Dia da semana: ( ) seg. ( ) ter. ( ) quar. ( ) quin. ( ) sexta ( ) sábado ( ) domingo		
Refeição	Alimento	Quantidade
Café da Manhã		
Lanche		
Almoço		
Lanche		
Jantar		
Ceia		
Observações:		

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cani PD, Delzenne NM, Amar J, Burcelin R. Role of gut microflora in the development of obesity and insulin resistance following high-fat diet feeding. Pathol Biol (Paris). 2008;56(5):305-9.
2. Karagiannides I, Pothoulakis C. Obesity, innate immunity and gut inflammation. Curr Opin Gastroenterol. 2007;23(6):661-6.
3. Machado MV, Cortez-Pinto H. Gut microbiota and nonalcoholic fatty liver disease. Ann Hepatol. 2012;11(4):440-9.
4. DiBaise JK, Zhang H, Crowell MD, Krajmalnik-Brown R, Decker GA, Rittmann BE. Gut microbiota and its possible relationship with obesity. Mayo Clin Proc. 2008;83(4):460-9.
5. Blaut M, Clavel T. Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease. J Nutr. 2007;137(3 Suppl 2):751S-5S.
6. Cani PD, Delzenne NM. The gut microbiome as therapeutic target. Pharmacol Ther. 2011;130(2):202-12.
7. Goulet O. Potential role of the intestinal microbiota in programming health and disease. Nutr Rev. 2015;73 Suppl 1:32-40.
8. Robles-Alonso V, Guarner F. [Progress in the knowledge of the intestinal human microbiota]. Nutr Hosp. 2013;28(3):553-7.
9. Wołkowicz T, Januszkiewicz A, Szych J. [Gut microbiome and its dysbiosis as an important factor influencing the human health condition]. Med Dosw Mikrobiol. 2014;66(3-4):223-35.
10. Kumar DP, Asgharpour A, Mirshahi F, Park SH, Liu S, Imai Y, et al. Activation of Transmembrane Bile Acid Receptor TGR5 Modulates Pancreatic Islet α Cells to Promote Glucose Homeostasis. J Biol Chem. 2016;291(13):6626-40.
11. Mahowald MA, Rey FE, Seedorf H, Turnbaugh PJ, Fulton RS, Wollam A, et al. Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(14):5859-64.
12. Ley RE. Obesity and the human microbiome. Curr Opin Gastroenterol. 2010;26(1):5-11.

13. Bajzer M, Seeley RJ. Physiology: obesity and gut flora. Nature. 2006;444(7122):1009-10.
14. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature. 2006;444(7122):1027-31.
15. Santacruz A, Collado MC, García-Valdés L, Segura MT, Martín-Lagos JA, Anjos T, et al. Gut microbiota composition is associated with body weight, weight gain and biochemical parameters in pregnant women. Br J Nutr. 2010;104(1):83-92.
16. Zoetendal EG, Rajilic-Stojanovic M, de Vos WM. High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. Gut. 2008;57(11):1605-15.
17. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Nageshwar Reddy D. Role of the normal gut microbiota. World J Gastroenterol. 2015;21(29):8787-803.
18. Musso G, Gambino R, Cassader M. Interactions between gut microbiota and host metabolism predisposing to obesity and diabetes. Annu Rev Med. 2011;62:361-80.
19. Hildebrandt MA, Hoffmann C, Sherrill-Mix SA, Keilbaugh SA, Hamady M, Chen YY, et al. High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. Gastroenterology. 2009;137(5):1716-24.e1-2.
20. Paolella G, Mandato C, Pierri L, Poeta M, Di Stasi M, Vajro P. Gut-liver axis and probiotics: their role in non-alcoholic fatty liver disease. World J Gastroenterol. 2014;20(42):15518-31.
21. Sharma V, Garg S, Aggarwal S. Probiotics and liver disease. Perm J. 2013;17(4):62-7.
22. Soares JB, Pimentel-Nunes P, Roncon-Albuquerque R, Leite-Moreira A. The role of lipopolysaccharide/toll-like receptor 4 signaling in chronic liver diseases. Hepatol Int. 2010;4(4):659-72.
23. Boutagy NE, McMillan RP, Frisard MI, Hulver MW. Metabolic endotoxemia with obesity: Is it real and is it relevant? Biochimie. 2016;124:11-20.
24. Mandard S, Zandbergen F, Tan NS, Escher P, Patsouris D, Koenig W, et al. The direct peroxisome proliferator-activated receptor target fasting-induced

adipose factor (FIAF/PGAR/ANGPTL4) is present in blood plasma as a truncated protein that is increased by fenofibrate treatment. J Biol Chem. 2004;279(33):34411-20.

25. Zivkovic AM, German JB, Sanyal AJ. Comparative review of diets for the metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease. Am J Clin Nutr. 2007;86(2):285-300.
26. Mehal WZ. The gut-liver axis: a busy two-way street. Hepatology. 2012;55(6):1647-9.
27. Tazoe H, Otomo Y, Kaji I, Tanaka R, Karaki SI, Kuwahara A. Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions. J Physiol Pharmacol. 2008;59 Suppl 2:251-62.
28. Ulven T. Short-chain free fatty acid receptors FFA2/GPR43 and FFA3/GPR41 as new potential therapeutic targets. Front Endocrinol (Lausanne). 2012;3:111.
29. Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(44):15718-23.
30. Cani PD, Delzenne NM. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. Curr Pharm Des. 2009;15(13):1546-58.
31. Le TK, Hosaka T, Nguyen TT, Kassu A, Dang TO, Tran HB, et al. Bifidobacterium species lower serum glucose, increase expressions of insulin signaling proteins, and improve adipokine profile in diabetic mice. Biomed Res. 2015;36(1):63-70.
32. Liu WY, Lu dJ, Du XM, Sun JQ, Ge J, Wang RW, et al. Effect of aerobic exercise and low carbohydrate diet on pre-diabetic non-alcoholic fatty liver disease in postmenopausal women and middle aged men--the role of gut microbiota composition: study protocol for the AELC randomized controlled trial. BMC Public Health. 2014;14:48.
33. Sanz Y, Santacruz A, De Palma G. Insights into the roles of gut microbes in obesity. Interdiscip Perspect Infect Dis. 2008;2008:829101.
34. de Lucas Moreno B, González Soltero R, Bressa C, Bailén M, Larrosa Pérez M. [Lifestyle modulation of gut microbiota]. Nutr Hosp. 2019.
35. Moreno-Pérez D, Bressa C, Bailén M, Hamed-Bousdar S, Naclerio F, Carmona M, et al. Effect of a Protein Supplement on the Gut Microbiota of Endurance

Athletes: A Randomized, Controlled, Double-Blind Pilot Study. Nutrients. 2018;10(3).

36. Bosscher D, Breynaert A, Pieters L, Hermans N. Food-based strategies to modulate the composition of the intestinal microbiota and their associated health effects. J Physiol Pharmacol. 2009;60 Suppl 6:5-11.
37. Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Bäckhed F. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. Cell. 2016;165(6):1332-45.
38. Gentile CL, Weir TL. The gut microbiota at the intersection of diet and human health. Science. 2018;362(6416):776-80.
39. Si X, Shang W, Zhou Z, Strappe P, Wang B, Bird A, et al. Gut Microbiome-Induced Shift of Acetate to Butyrate Positively Manages Dysbiosis in High Fat Diet. Mol Nutr Food Res. 2018;62(3).
40. Conlon MA, Bird AR. The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. Nutrients. 2014;7(1):17-44.
41. Mokhtari Z, Gibson DL, Hekmatdoost A. Nonalcoholic Fatty Liver Disease, the Gut Microbiome, and Diet. Adv Nutr. 2017;8(2):240-52.
42. Shen J, Obin MS, Zhao L. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. Mol Aspects Med. 2013;34(1):39-58.
43. Day CP, Saksena S. Non-alcoholic steatohepatitis: definitions and pathogenesis. J Gastroenterol Hepatol. 2002;17 Suppl 3:S377-84.
44. Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. Hepatology. 2006;43(2 Suppl 1):S99-S112.
45. Angelico F, Del Ben M, Conti R, Francioso S, Feole K, Fiorello S, et al. Insulin resistance, the metabolic syndrome, and nonalcoholic fatty liver disease. J Clin Endocrinol Metab. 2005;90(3):1578-82.
46. Youssef WI, McCullough AJ. Steatohepatitis in obese individuals. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2002;16(5):733-47.
47. Murphy EF, Cotter PD, Hogan A, O'Sullivan O, Joyce A, Fouhy F, et al. Divergent metabolic outcomes arising from targeted manipulation of the gut microbiota in diet-induced obesity. Gut. 2013;62(2):220-6.
48. Younossi ZM, Stepanova M, Younossi Y, Golabi P, Mishra A, Rafiq N, et al. Epidemiology of chronic liver diseases in the USA in the past three decades. Gut. 2019.

49. Sayiner M, Koenig A, Henry L, Younossi ZM. Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis in the United States and the Rest of the World. Clin Liver Dis. 2016;20(2):205-14.
50. Karnikowski M, Córdova C, Oliveira RJ, Karnikowski MG, Nóbrega OeT. Non-alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome in Brazilian middle-aged and older adults. Sao Paulo Med J. 2007;125(6):333-7.
51. Cotrim HP, Parise ER, Oliveira CP, Leite N, Martinelli A, Galizzi J, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in Brazil. Clinical and histological profile. Ann Hepatol. 2011;10(1):33-7.
52. Harrison SA, Torgerson S, Hayashi PH. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a clinical histopathological study. Am J Gastroenterol. 2003;98(9):2042-7.
53. Lewis JR, Mohanty SR. Nonalcoholic fatty liver disease: a review and update. Dig Dis Sci. 2010;55(3):560-78.
54. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. Gastroenterology. 2001;120(5):1183-92.
55. Loguercio C, De Simone T, Federico A, Terracciano F, Tuccillo C, Di Chicco M, et al. Gut-liver axis: a new point of attack to treat chronic liver damage? Am J Gastroenterol. 2002;97(8):2144-6.
56. Lakhani SV, Shah HN, Alexander K, Finelli FC, Kirkpatrick JR, Koch TR. Small intestinal bacterial overgrowth and thiamine deficiency after Roux-en-Y gastric bypass surgery in obese patients. Nutr Res. 2008;28(5):293-8.
57. Madrid AM, Poniachik J, Quera R, Defilippi C. Small intestinal clustered contractions and bacterial overgrowth: a frequent finding in obese patients. Dig Dis Sci. 2011;56(1):155-60.
58. Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(3):979-84.
59. Miyake Y, Yamamoto K. Role of gut microbiota in liver diseases. Hepatol Res. 2013;43(2):139-46.
60. Gao B, Seki E, Brenner DA, Friedman S, Cohen JI, Nagy L, et al. Innate immunity in alcoholic liver disease. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2011;300(4):G516-25.

61. Schnabl B, Brenner DA. Interactions between the intestinal microbiome and liver diseases. Gastroenterology. 2014;146(6):1513-24.
62. Vespasiani-Gentilucci U, Gallo P, Picardi A. The role of intestinal microbiota in the pathogenesis of NAFLD: starting points for intervention. Arch Med Sci. 2018;14(3):701-6.
63. Zhu L, Baker SS, Gill C, Liu W, Alkhouri R, Baker RD, et al. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH. Hepatology. 2013;57(2):601-9.
64. Betrapally NS, Gillevet PM, Bajaj JS. Changes in the Intestinal Microbiome and Alcoholic and Nonalcoholic Liver Diseases: Causes or Effects? Gastroenterology. 2016;150(8):1745-55.e3.
65. Machado MV, Cortez-Pinto H. Diet, Microbiota, Obesity, and NAFLD: A Dangerous Quartet. Int J Mol Sci. 2016;17(4):481.
66. Boursier J, Mueller O, Barret M, Machado M, Fizanne L, Araujo-Perez F, 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. 2016;63(3):764-75.
67. Henao-Mejia J, Elinav E, Thaiss CA, Licona-Limon P, Flavell RA. Role of the intestinal microbiome in liver disease. J Autoimmun. 2013;46:66-73.
68. Sreenivasa Baba C, Alexander G, Kalyani B, Pandey R, Rastogi S, Pandey A, et al. Effect of exercise and dietary modification on serum aminotransferase levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis. J Gastroenterol Hepatol. 2006;21(1 Pt 1):191-8.
69. Margariti E, Deutsch M, Manolakopoulos S, Papatheodoridis GV. Non-alcoholic fatty liver disease may develop in individuals with normal body mass index. Ann Gastroenterol. 2012;25(1):45-51.
70. Volynets V, Küper MA, Strahl S, Maier IB, Spruss A, Wagnerberger S, et al. Nutrition, intestinal permeability, and blood ethanol levels are altered in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Dig Dis Sci. 2012;57(7):1932-41.
71. Engstler AJ, Aumiller T, Degen C, Dürr M, Weiss E, Maier IB, et al. Insulin resistance alters hepatic ethanol metabolism: studies in mice and children with non-alcoholic fatty liver disease. Gut. 2016;65(9):1564-71.

72. Zhu L, Baker RD, Zhu R, Baker SS. Gut microbiota produce alcohol and contribute to NAFLD. Gut. 2016;65(7):1232.
73. Dumas ME, Barton RH, Toye A, Cloarec O, Blancher C, Rothwell A, et al. Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(33):12511-6.
74. Chu H, Duan Y, Yang L, Schnabl B. Small metabolites, possible big changes: a microbiota-centered view of non-alcoholic fatty liver disease. Gut. 2019;68(2):359-70.
75. Lau E, Carvalho D, Freitas P. Gut Microbiota: Association with NAFLD and Metabolic Disturbances. Biomed Res Int. 2015;2015:979515.
76. (EASL) EAftSotL, (EASD) EAftSoD, (EASO) EAftSoO. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. J Hepatol. 2016;64(6):1388-402.
77. Seidell JC, Flegal KM. Assessing obesity: classification and epidemiology. Br Med Bull. 1997;53(2):238-52.
78. Lipschitz DA. Screening for nutritional status in the elderly. Prim Care. 1994;21(1):55-67.
79. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem. 1972;18(6):499-502.
80. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology. 2005;41(6):1313-21.
81. Paulson JN, Stine OC, Bravo HC, Pop M. Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys. Nat Methods. 2013;10(12):1200-2.
82. Lozupone CA, Hamady M, Kelley ST, Knight R. Quantitative and qualitative beta diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. Appl Environ Microbiol. 2007;73(5):1576-85.
83. Anderson MJ. Distance-based tests for homogeneity of multivariate dispersions. Biometrics. 2006;62(1):245-53.
84. Storey JD, Tibshirani R. Statistical significance for genomewide studies. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(16):9440-5.

85. Mouzaki M, Comelli EM, Arendt BM, Bonengel J, Fung SK, Fischer SE, et al. Intestinal microbiota in patients with nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology. 2013;58(1):120-7.
86. Sharpton SR, Ajmera V, Loomba R. Emerging Role of the Gut Microbiome in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: From Composition to Function. Clin Gastroenterol Hepatol. 2019;17(2):296-306.
87. Miquel S, Leclerc M, Martin R, Chain F, Lenoir M, Raguideau S, et al. Identification of metabolic signatures linked to anti-inflammatory effects of Faecalibacterium prausnitzii. MBio. 2015;6(2).
88. Jumpertz R, Le DS, Turnbaugh PJ, Trinidad C, Bogardus C, Gordon JI, et al. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. Am J Clin Nutr. 2011;94(1):58-65.
89. Da Silva HE, Teterina A, Comelli EM, Taibi A, Arendt BM, Fischer SE, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with dysbiosis independent of body mass index and insulin resistance. Sci Rep. 2018;8(1):1466.
90. Scott KP, Antoine JM, Midtvedt T, van Hemert S. Manipulating the gut microbiota to maintain health and treat disease. Microb Ecol Health Dis. 2015;26:25877.
91. Willing BP, Dicksved J, Halfvarson J, Andersson AF, Lucio M, Zheng Z, et al. A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes. Gastroenterology. 2010;139(6):1844-54.e1.
92. Christopherson MR, Dawson JA, Stevenson DM, Cunningham AC, Bramhacharya S, Weimer PJ, et al. Unique aspects of fiber degradation by the ruminal ethanologen Ruminococcus albus 7 revealed by physiological and transcriptomic analysis. BMC Genomics. 2014;15:1066.
93. Million M, Maraninchi M, Henry M, Armougom F, Richet H, Carrieri P, et al. Obesity-associated gut microbiota is enriched in Lactobacillus reuteri and depleted in Bifidobacterium animalis and Methanobrevibacter smithii. Int J Obes (Lond). 2012;36(6):817-25.
94. Sheng L, Jena PK, Liu HX, Kalanetra KM, Gonzalez FJ, French SW, et al. Gender Differences in Bile Acids and Microbiota in Relationship with Gender Dissimilarity in Steatosis Induced by Diet and FXR Inactivation. Sci Rep. 2017;7(1):1748.

95. Trottier J, Caron P, Straka RJ, Barbier O. Profile of serum bile acids in noncholestatic volunteers: gender-related differences in response to fenofibrate. Clin Pharmacol Ther. 2011;90(2):279-86.

96. Leung C, Rivera L, Furness JB, Angus PW. The role of the gut microbiota in NAFLD. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2016;13(7):412-25.

97. Ritze Y, Bárdos G, Claus A, Ehrmann V, Bergheim I, Schwiertz A, et al. Lactobacillus rhamnosus GG protects against non-alcoholic fatty liver disease in mice. PLoS One. 2014;9(1):e80169.

98. Kim B, Park KY, Ji Y, Park S, Holzapfel W, Hyun CK. Protective effects of Lactobacillus rhamnosus GG against dyslipidemia in high-fat diet-induced obese mice. Biochem Biophys Res Commun. 2016;473(2):530-6.

99. Org E, Mehrabian M, Parks BW, Shipkova P, Liu X, Drake TA, et al. Sex differences and hormonal effects on gut microbiota composition in mice. Gut Microbes. 2016;7(4):313-22.

100. Del Chierico F, Nobili V, Vernocchi P, Russo A, Stefanis C, Gnani D, et al. Gut microbiota profiling of pediatric nonalcoholic fatty liver disease and obese patients unveiled by an integrated meta-omics-based approach. Hepatology. 2017;65(2):451-64.

101. Pistelli GC, Costa CEM. Bactérias intestinais e obesidade. Revista Saúde e Pesquisa. 2010:115-6.

102. Savard C, Tartaglione EV, Kuver R, Haigh WG, Farrell GC, Subramanian S, et al. Synergistic interaction of dietary cholesterol and dietary fat in inducing experimental steatohepatitis. Hepatology. 2013;57(1):81-92.

103. Walker AW, Ince J, Duncan SH, Webster LM, Holtrop G, Ze X, et al. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. ISME J. 2011;5(2):220-30.

104. de Wit NJ, Afman LA, Mensink M, Müller M. Phenotyping the effect of diet on non-alcoholic fatty liver disease. J Hepatol. 2012;57(6):1370-3.

105. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. Diabetes. 2008;57(6):1470-81.

106. Aranha MM, Cortez-Pinto H, Costa A, da Silva IB, Camilo ME, de Moura MC, et al. Bile acid levels are increased in the liver of patients with steatohepatitis. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2008;20(6):519-25.
107. Newgard CB. Interplay between lipids and branched-chain amino acids in development of insulin resistance. Cell Metab. 2012;15(5):606-14.
108. Macfarlane GT, Macfarlane S. Fermentation in the human large intestine: its physiologic consequences and the potential contribution of prebiotics. J Clin Gastroenterol. 2011;45 Suppl:S120-7.
109. Loomba R, Seguritan V, Li W, Long T, Klitgord N, Bhatt A, et al. Gut Microbiome-Based Metagenomic Signature for Non-invasive Detection of Advanced Fibrosis in Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Cell Metab. 2017;25(5):1054-62.e5.
110. O'Toole PW, Jeffery IB. Gut microbiota and aging. Science. 2015;350(6265):1214-5.
111. Grosicki GJ, Fielding RA, Lustgarten MS. Gut Microbiota Contribute to Age-Related Changes in Skeletal Muscle Size, Composition, and Function: Biological Basis for a Gut-Muscle Axis. Calcif Tissue Int. 2018;102(4):433-42.
112. Santos-Marcos JA, Rangel-Zuñiga OA, Jimenez-Lucena R, Quintana-Navarro GM, Garcia-Carpintero S, Malagon MM, et al. Influence of gender and menopausal status on gut microbiota. Maturitas. 2018;116:43-53.