

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

Fabiana de Faria Ghetti

**EFEITOS DA INTERVENÇÃO DIETÉTICA NA MICROBIOTA INTESTINAL E
PERFIL METABÓLICO-NUTRICIONAL DE PACIENTES COM ESTEATO-
HEPATITE NÃO ALCOÓLICA: UM ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO**

Orientador: Dr. Lincoln Eduardo Villela Vieira de Castro Ferreira

Coorientadora: Dra. Ana Paula Boroni Moreira

Juiz de Fora

2019

Fabiana de Faria Ghetti

**EFEITOS DA INTERVENÇÃO DIETÉTICA NA MICROBIOTA INTESTINAL E
PERFIL METABÓLICO-NUTRICIONAL DE PACIENTES COM ESTEATO-
HEPATITE NÃO ALCOÓLICA: UM ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO**

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

Orientador: Dr. Lincoln Eduardo Villela Vieira de Castro Ferreira

Coorientadora: Dra. Ana Paula Boroni Moreira

Juiz de Fora

2019

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Ghetti, Fabiana de Faria.

Efeitos da intervenção dietética na microbiota intestinal e perfil metabólico-nutricional de pacientes com esteato-hepatite não alcoólica : um ensaio clínico randomizado / Fabiana de Faria Ghetti. - 2019.

126 f. : il.

Orientador: Lincoln Eduardo Villela Vieira de Castro Ferreira

Coorientadora: Ana Paula Boroni Moreira

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

1. Hepatopatia gordurosa não alcoólica. 2. Fígado gorduroso. 3. Microbiota. 4. Disbiose. I. Ferreira, Lincoln Eduardo Villela Vieira de Castro, orient. II. Moreira, Ana Paula Boroni, coorient. III. Título.

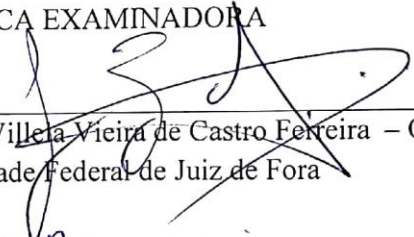
FABIANA DE FARIA GHETTI

**EFEITOS DA INTERVENÇÃO DIETÉTICA NA MICROBIOTA INTESTINAL E
PERFIL METABÓLICO-NUTRICIONAL DE PACIENTES COM ESTEATO-
HEPATITE NÃO ALCOÓLICA: UM ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO**

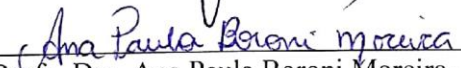
Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde, da Faculdade de Medicina de Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Saúde - Área de concentração: Saúde Brasileira.

Aprovada em 28 / 02 / 2019

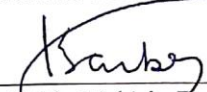
BANCA EXAMINADORA




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




Profa. Dra. Ana Paula Boroni Moreira - Coorientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora



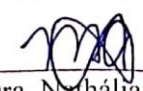
Profa. Dra. Kátia Valéria Bastos Dias Barbosa
Universidade Federal de Juiz de Fora



Profa. Dra. Dionéia Evangelista Cesar
Universidade Federal de Juiz de Fora



Profa. Dra. Júlia Maria Geraldo Gomes
Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais



Profa. Dra. Nathália Sernizon Guimarães
Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais

*Dedico essa tese aos meus queridos pais, Pedro
Paulo e Maria, ao meu amado esposo, Thiago.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre esteve a minha frente para me guiar, ao meu lado para me acompanhar, atrás de mim para me proteger e sobre mim para me abençoar.

À minha família, que tanto me apoiou e acreditou nas minhas capacidades.

Ao Programa de Pós-graduação em Saúde (UFJF), pela oportunidade de qualificação profissional.

Ao Hospital Universitário-EBSERH/UFJF, por permitir minha dedicação integral à pesquisa e apoio nessa jornada.

À Universidade Federal de Juiz de Fora, pela concessão de bolsa de estudo, por meio do Programa de Apoio à Qualificação (PROQUALI).

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

Ao meu orientador, Dr. Lincoln Eduardo Villela Vieira de Castro Ferreira, que me recebeu de forma acolhedora em seu núcleo de pesquisa. Obrigada pela confiança!

A minha coorientadora, Prof^a. Dr^a. Ana Paula Boroni Moreira, por ter abraçado essa missão, por me acolher com carinho, e por toda dedicação. Muito obrigada!

À Prof^a. Dr^a. Dionéia Evangelista César pelo acolhimento no LEBIOMM, parceria, atenção, ensinamentos e participação na banca de doutorado.

À Daiane Oliveira por ser uma grande parceira nesse projeto, companheira e amiga. Obrigada por tudo!

*Ao Dr. **Juliano Moreira de Oliveira**, que muito contribuiu para o meu ingresso no doutorado. Obrigada pelo convite para participar do ambulatório de Hepatologia/Esteatose do Hospital Universitário-UFJF, pelos ensinamentos e cooperação na pesquisa.*

*Aos estagiários **Marcelo Monjardim, Rafael Silva e Geraldo Claudiano** pelo valioso auxílio nas análises de microbiota fecal.*

*Ao **Laboratório de Análises Clínicas do HU-EBSERH/UFJF**, pelos serviços prestados.*

*Ao **Serviço de Endoscopia Digestiva**, por ceder o espaço para a realização dos testes respiratórios e acolhimento dos pacientes para o exame.*

*Às professoras, **Kátia Valéria Bastos Dias Barbosa, Júnia Maria Geraldo Gomes e Nathalia Sernizon Guimarães**, pela participação na banca de doutorado.*

*Às professoras, **Aline Silva de Aguiar, Sheila Cristina Potente Dutra Luquetti, Eliene da Silva Martins Viana e Flávia Galvão Cândido**, pelo aceite em participar como suplente da banca de doutorado.*

*Aos **pacientes**, pela delicadeza e sensibilidade em colaborarem com a ciência, com a nobreza de trazer melhores perspectivas de vida.*

E a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito Obrigada!

RESUMO

GHETTI, F. F. **Efeitos da intervenção dietética na microbiota intestinal e perfil metabólico-nutricional de pacientes com esteato-hepatite não alcoólica: um ensaio clínico randomizado.** 126 f. Tese (Doutorado em Saúde) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2019.

Introdução: A modulação da microbiota intestinal, por meio da dieta, emerge como uma possibilidade terapêutica para melhorar a saúde. **Objetivo:** Caracterizar a composição da microbiota intestinal e o perfil metabólico-nutricional em pacientes com esteato-hepatite não alcoólica, bem como os efeitos da intervenção dietética nos parâmetros supracitados. **Métodos:** Estão apresentados em dois artigos. No artigo 1 (estudo transversal) foram avaliados dados parciais de 30 pacientes com EHNA e no artigo 2 (estudo randomizado, paralelo, aberto) 40 pacientes com EHNA foram alocados em dois grupos: DIETA (dieta individualizada com $1.651,34 \pm 263,25$ kcal/dia, 47% carboidratos, 28% lipídeos, 25% proteínas e $30,3 \pm 4,7$ g/dia de fibras mais orientação nutricional) e Controle (CT- orientação nutricional). Os grupos foram avaliados no tempo basal e após 3 meses de intervenção. O estudo foi realizado no Hospital Universitário-UFJF. Realizou-se análise da histologia hepática, coleta de fezes (microbiota fecal), teste respiratório de hidrogênio e metano (supercrecimento bacteriano no intestino delgado-SBID), coleta de sangue (bioquímica hepática, perfil glicêmico e lipídico), antropometria, avaliação do percentual de gordura corporal e do consumo dietético. **Resultados: Artigo 1: Associação da microbiota fecal com parâmetros clínicos e dieta na esteato-hepatite não alcoólica** – A maior densidade de microrganismos fecais foi Bacteroidetes [$4,77 (3,61-5,81) \times 10^8$ células g⁻¹], que se correlacionou positivamente com aspartato aminotransferase (p=0,008) e, negativamente, com ingestão de carboidratos (p=0,021). Archaea correlacionou positivamente com colesterol total (p=0,007); Acidobacteria, positivamente, com inflamação lobular (p=0,024) e triacilglicerol (p=0,007), Verrucomicrobiales, positivamente, com IMC (p=0,007), Proteobacteria, positivamente com ingestão de polinsaturados (p=0,026). O grupo Acidobacteria foi quantificado pela primeira vez em adultos com EHNA [$1,57 (1,01-1,83) \times 10^8$ células g⁻¹]. Os resultados sugerem que a microbiota intestinal provavelmente está envolvida na modulação dos fatores de risco para EHNA. **Artigo 2: Efeitos da intervenção dietética na microbiota intestinal e perfil metabólico-nutricional de pacientes com esteato-hepatite não alcoólica:**

um ensaio clínico randomizado –A intervenção no grupo DIETA reduziu peso corporal, cintura, percentual de gordura, colesterol total, triacilgliceróis, glicemia, insulina de jejum, HOMA-IR e transaminases ($p < 0,05$) em relação ao basal. Porém o grupo CT não apresentou modificações no perfil metabólico-nutricional ($p > 0,05$). Não houve diferença, entre os grupos, na frequência de SBID no basal ($p = 0,723$) e após 3 meses ($p = 0,327$). O grupo DIETA aumentou microrganismos totais ($p = 0,04$), enquanto o grupo CT reduziu Bacteroidetes ($p = 0,04$) e Verrucomicrobiales ($p = 0,02$). Os resultados sugerem que modificações exclusivamente dietéticas contribuem para promoção da saúde de pacientes com EHNA e devem constituir a base do tratamento nutricional para esta condição.

Palavras-chave: Hepatopatia gordurosa não alcoólica. Fígado gorduroso. Microbiota. Disbiose.

ABSTRACT

GHETTI, F. F. **Effects of dietary intervention on gut microbiota and metabolic-nutritional profile of outpatients with non-alcoholic steatohepatitis: a randomized clinical trial.** 126 f. Thesis (Doctorate in Health) – School of Medicine. Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2019.

Introduction: Modulation of the gut microbiota, through diet, emerges as a therapeutic possibility to improve health. **Objective:** To characterize the intestinal microbiota composition and the metabolic-nutritional profile in patients with non-alcoholic steatohepatitis, as well as the effects of dietary intervention on the aforementioned parameters. **Methods:** They are presented in two articles. In article 1 (cross-sectional study), partial data from 30 patients with NASH and article 2 (randomized, parallel, open-label study) were analyzed. 40 patients with NASH were allocated to two groups: DIET (individualized diet with $1,651.34 \pm 263.25$ kg / day, 47% carbohydrates, 28% lipids, 25% proteins and 30.3 ± 4.7 g / day of fiber plus nutritional orientation) and Control (CT - nutritional orientation). The groups were evaluated at baseline and after 3 months of intervention. The study was conducted at the University Hospital-UFJF. Hepatic histology, faecal collection (fecal microbiota), hydrogen and methane respiratory test (bacterial overgrowth in SBID), blood collection (hepatic biochemistry, glycemic and lipid profile), anthropometry, percentage evaluation of body fat and dietary intake. **Results: Article 1: Association of fecal microbiota with clinical parameters and diet in nonalcoholic steatohepatitis** The highest density of fecal microorganisms was Bacteroidetes [$4.77 (3.61-5.81) \times 10^8$ cells g⁻¹], which correlated positively with aspartate aminotransferase ($p=0.008$) and, negatively, with carbohydrate intake ($p=0.021$). Archaea positively correlated with total cholesterol ($p=0.007$); Acidobacteria, positively, with lobular inflammation ($p = 0.024$) and triacylglycerol ($p=0.007$), Verrucomicrobiales positively with BMI ($p = 0.007$), Proteobacteria, positively with polyunsaturated ingestion ($p = 0.026$). The Acidobacteria group was quantified for the first time in adults with NASH [$1.57 (1.01-1.83) \times 10^8$ g⁻¹ cells]. The results suggest that the intestinal microbiota is probably involved in the modulation of risk factors for NASH. The intervention in the DIET group reduced body weight, waist, percentage of fat, total cholesterol, triacylglycerols, glycemia, insulin, HOMA-IR and transaminases ($p<0.05$) in relation to baseline. However, the CT group did not present changes in the metabolic-

nutritional profile ($p > 0.05$). There was no difference between the groups in the SIBO frequency at baseline ($p = 0.723$) and after 3 months ($p = 0.327$). The DIETA group increased total microorganisms ($p = 0.04$), while the CT group reduced Bacteroidetes ($p = 0.04$) and Verrucomicrobiales ($p = 0.02$). The results suggest that exclusively dietary modifications contribute to the health promotion of patients with NASH and should form the basis of nutritional treatment for this condition.

Key words: Non-alcoholic fatty liver disease. Fatty liver. Microbiota. Dysbiosis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAM	Antimitocôndria
AAML	Antimúsculo liso
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AgHBs	Antígeno de superfície do vírus da hepatite crônica B
ALT	Alanina aminotransferase
AMP-Q	5'-monofosfato-adenosina proteína quinase
Anti-HCV	Anticorpo contra o vírus da hepatite C
AST	Aspartato aminotransferase
CH ₄	Metano
ChREBP	Proteína ligadora do elemento responsivo ao carboidrato
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DRI	<i>Dietary Reference Intakes</i>
EH	Esteatose hepática
EHNA	Esteato-hepatite não alcoólica
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAN	Fator antinúcleo
FIAF	Fator adipocitário induzido por jejum
FISH	Hibridização <i>In Situ</i> fluorescente
FXR	Receptor farsenoide X
GGT	γ -glutamyltransferase
GLP-1	Peptídeo semelhante ao glucagon-1
Gpr	Receptor acoplado à proteína G
H ₂	Hidrogênio
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HOMA-IR	Modelo de homeostase da resistência à insulina
HU-EBSERH	Hospital Universitário – Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares
IL	Interleucinas
IMC	Índice de massa corporal
LBP	Proteína ligadora de LPS
LDL	Lipoproteína de baixa densidade

LLP	Lipase lipoproteica
LPS	Lipopolissacarídeo
NAS	<i>NAFLD activity score</i> – escore de atividade da doença hepática gordurosa não alcoólica
NF- κ B	Fator de transcrição regulador da expressão de citocinas pró-inflamatórias e de moléculas de adesão
NLRP	Receptores intracelulares semelhantes à NOD
ON	Orientação nutricional
PGC1- α	Co-ativador-1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma
ppm	Parte por milhão
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
rRNA	RNA ribossômico
SBID	Supercrescimento bacteriano no intestino delgado
TAG	Triacilglicerol
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGR	Receptor acoplado à proteína G
TLR	Receptor do tipo Toll
TMA	Trimetilamina
TMAO	Óxido de trimetilamina
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1	ESTEATO-HEPATITE NÃO ALCOÓLICA	18
2.2	DISBIOSE INTESTINAL E EHNA.....	21
2.2.1	Estudos em animais	22
2.2.2	Estudos em humanos	24
2.2.3	Mecanismos envolvidos no desenvolvimento e progressão da EHNA	28
2.2.3.1	<i>Modificação da homeostase energética</i>	28
2.2.3.2	<i>Endotoxemia pelo LPS</i>	29
2.2.3.3	<i>Aumento da produção endógena de etanol</i>	30
2.2.3.4	<i>Alteração do metabolismo dos ácidos biliares</i>	31
2.2.3.5	<i>Alteração do metabolismo da colina</i>	32
2.3	DIETA E MICROBIOTA INTESTINAL.....	34
3	OBJETIVOS	38
3.1	OBJETIVO GERAL.....	38
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	TIPO DE ESTUDO, LOCAL E CASUÍSTICA.....	39
4.2	PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	42
4.2.1	Anamnese	42
4.2.2	Histologia hepática	43
4.2.3	Avaliação bioquímica	43
4.2.4	Avaliação antropométrica e dietética	43
4.2.5	Caracterização da microbiota fecal	44
4.2.6	Avaliação de supercrescimento bacteriano no intestino delgado	45
4.2.7	Intervenção dietética	45
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47

5	RESULTADOS	48
5.1	Artigo 1: Association of fecal microbiota with clinical parameters and diet in nonalcoholic steatohepatitis.....	48
5.2	Artigo 2: Effects of dietary intervention on gut microbiota and metabolic-nutritional profile of outpatients with non-alcoholic steatohepatitis: a randomized clinical trial.....	70
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	101
	REFERÊNCIAS	102
	APÊNDICES	121
	APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	121
	APÊNDICE B – Orientações nutricionais.....	123
	APÊNDICE C – Orientações para realização do teste respiratório.....	124
	ANEXOS	126
	ANEXO I - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Humana.....	126

1 INTRODUÇÃO

A esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) é uma forma grave da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (LIU et al., 2016). Histologicamente, se caracteriza por progressivo acúmulo de gordura (esteatose) macro/microvesicular, infiltrado inflamatório lobular misto e balonização hepatocelular em área da veia centro lobular (zona III), com ou sem fibrose (OSEINI; SANYAL, 2017; STEFAN et al., 2018). Essas alterações podem progredir para cirrose, insuficiência hepática e carcinoma hepatocelular (BACON et al., 1994; EKSTEDT et al., 2006; WHITE et al., 2012; ORMAN et al., 2013), aumentando o risco de comorbidades e mortalidade por causas hepáticas e não hepáticas (EKSTEDT et al., 2015).

Enquanto a prevalência de EHNA varia de 2% a 5% na população geral (WANLESS et al., 1990; BROWNING et al., 2004), aproximadamente 70% dos indivíduos com obesidade mórbida são acometidos por essa condição (LOSEKANN et al., 2015). Apesar da forte associação com o índice de massa corporal (IMC), a etiologia da EHNA é multifatorial (CONLON et al., 2013). Alterações metabólicas relacionadas à resistência à insulina, diabetes melito tipo 2, dislipidemia e hipertensão arterial sistêmica também são considerados fatores de risco para a doença (POLIMENI et al., 2015), assim como o consumo de dietas hipercalóricas e ingestão excessiva de gorduras saturadas e/ou carboidratos simples (EASL–EASD–EASO CLINICAL PRACTICE GUIDELINES FOR THE MANAGEMENT OF NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE, 2016). É cada vez mais reconhecido que a disbiose intestinal está envolvida na patogênese e progressão de EHNA (BUZZETTI et al., 2016). Assim, a microbiota intestinal tornou-se um tema de interesse em investigações científicas recentes e um potencial alvo de intervenção clínica (MOUZAKI et al., 2016; XUE et al. 2017; FENG et al., 2017).

A disbiose intestinal pode favorecer a multiplicação de microrganismos potencialmente patogênicos, levando à produção excessiva de produtos ou metabólitos microbianos que podem prejudicar a saúde do hospedeiro, causando doenças locais ou sistêmicas (KHO & LAL, 2018). De fato, em modelo animal foi demonstrado que alterações na composição da microbiota intestinal aumentam a gordura intra-hepática por meio de mecanismos associados ao aumento da extração de energia da dieta ou alteração na expressão de genes envolvidos na lipogênese e β -oxidação (BACKHED et al., 2004; JUMPERTZ et al., 2011). Além disso, a inflamação hepatocelular pode ser secundária ao aumento da permeabilidade intestinal e translocação de bactérias ou de componentes da célula microbiana

para a circulação (CSAK et al., 2011). Por último, a microbiota intestinal pode contribuir para a fibrogênese por meio da ativação de células hepáticas estreladas (MIURA et al., 2010).

Embora experimentos em animais tenham observado associação entre microbiota intestinal e componentes histológicos da DHGNA (BACKHED et al., 2004; MIURA et al., 2010; JUMPERTZ et al., 2011; CSAK et al., 2011), há pouco conhecimento sobre a saúde intestinal de pacientes com EHNA. Estudos sugerem que pacientes com EHNA apresentam maior prevalência de supercrescimento bacteriano do intestino delgado (SBID) (WIGG et al., 2001; MIELE et al., 2009) e menor percentual de Bacteroidetes no conteúdo fecal, quando comparados a indivíduos saudáveis (MOUZAKI et al., 2013). Porém, os resultados dos estudos ainda são controversos em relação ao perfil da microbiota intestinal nessa população (MOUZAKI et al., 2013; ZHU et al., 2013).

Há evidências de que a quantidade de energia da dieta e a proporção dos três macronutrientes (lipídeos, carboidratos e proteínas) têm o potencial de modular a saúde intestinal (SANTACRUZ et al., 2009; FAVA et al., 2013; KIM et al., 2013). Na obesidade, foi demonstrado que o consumo de uma dieta hipocalórica diminuiu Firmicutes e aumentou Bacteroidetes, tornando a microbiota intestinal dos indivíduos obesos semelhante à dos indivíduos magros (SANTACRUZ et al., 2009; KIM et al., 2013). Além disso, a restrição calórica aumentou a riqueza de genes microbianos (COTILLARD et al., 2013) e reduziu os níveis circulantes de lipopolissacarídeos (LPS) nos indivíduos obesos (BREUSING et al., 2017). Independente da restrição calórica, mudanças qualitativas na dieta promovem mudanças positivas na microbiota intestinal. Por exemplo, no estudo de Fava et al. (2013), com indivíduos obesos, o consumo de dieta normocalórica, composta de 55% de carboidratos, 17% de proteínas e 28% de lipídeos, resultou em aumento da população de *Bifidobacterium spp.*, grupo de bactérias que melhora a regulação energética corporal e reduz fatores de risco para doenças metabólicas.

Existe um consenso de que a dieta, por meio do equilíbrio de calorias e macronutrientes, é uma das principais intervenções para reduzir a concentração hepática de gordura e melhorar o controle metabólico da doença hepática gordurosa não alcoólica (NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CARE EXCELLENCE, 2016). Porém, até o momento, nenhum estudo investigou os efeitos da intervenção exclusivamente dietética na microbiota intestinal e perfil metabólico-nutricional de pacientes com EHNA.

Diante do exposto, o presente estudo justifica-se pela escassez de literatura sobre microbiota intestinal em pacientes com EHNA e pelo seu caráter inédito no que diz respeito ao impacto da modificação apenas dos hábitos alimentares sobre a saúde intestinal, nesta

população. O estudo irá verificar se pacientes com EHNA podem se beneficiar somente da intervenção dietética para a melhoria da saúde intestinal. Além disso, os dados coletados servirão de base para elaboração de critérios de avaliação e prescrição de dieta na EHNA.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ESTEATO-HEPATITE NÃO ALCOÓLICA

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é uma doença heterogênea, caracterizada histologicamente em dois subtipos: o fígado gorduroso não alcoólico, definido pela presença de esteatose isolada, e a esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), subtipo mais agressivo, definida pela presença de esteatose hepática associada à inflamação e balonização dos hepatócitos, com ou sem fibrose (OSEINI & SANYAL, 2017 e STEFAN et al., 2018). A EHNA pode acometer indivíduos de todas as faixas etárias e de ambos os gêneros, entretanto é mais comum em adultos e tende a aumentar com a idade (LAZO et al., 2011). Em geral, os pacientes com EHNA são assintomáticos, embora ocasionalmente alguns possam apresentar fadiga, dispepsia ou desconforto no hipocôndrio direito (LAZO et al., 2011). A doença é geralmente detectada em exames de rotina, sendo os pacientes investigados por alterações de aminotransferases, hepatomegalia percebida ao exame físico ou pelo achado de infiltração gordurosa detectada por exame de imagem. Porém, o diagnóstico definitivo da EHNA requer biópsia hepática (EASL–EASD–EASO CLINICAL PRACTICE GUIDELINES FOR THE MANAGEMENT OF NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE, 2016).

Apesar de na maioria dos casos não provocar sintomas, estima-se que 15% a 39% dos pacientes com EHNA desenvolverão cirrose hepática em um período de 10 anos (BACON et al., 1994; MATTEONI et al., 1999; EKSTEDT et al., 2006). Além disso, aproximadamente 13% dos pacientes que desenvolvem cirrose por EHNA irão progredir para carcinoma hepatocelular em 3 anos (WHITE et al., 2012) e 31% para insuficiência hepática em 8 anos (ORMAN et al., 2013). Nos últimos três anos, a EHNA foi considerada a segunda indicação mais comum de transplante hepático (WONG et al., 2015), e provavelmente se tornará a principal causa de doença hepática avançada nas próximas décadas, devido à epidemia global de obesidade (MILIC et al., 2014; TIJERA et al., 2015).

Ainda que exista forte associação com o índice de massa corporal (IMC), a etiologia da EHNA é multifatorial (CONLON et al., 2013). Alterações metabólicas relacionadas à resistência insulínica, diabetes melito tipo 2, dislipidemia e hipertensão arterial sistêmica também são considerados fatores de risco para a doença (POLIMENI et al., 2015), assim como o consumo excessivo de calorias, gorduras saturadas, carboidratos refinados e frutose (EASL–EASD–EASO CLINICAL PRACTICE GUIDELINES FOR THE MANAGEMENT

OF NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE, 2016). Entretanto, a fisiopatologia da EHNA ainda não é bem conhecida. Tradicionalmente, o desenvolvimento e a progressão da doença têm sido explicados pela hipótese dos dois “*hits*”, proposta por Day e James (1998). Segundo os autores, a resistência à insulina seria o primeiro estímulo (primeiro “*hit*”), que determinaria o acúmulo de gordura nos hepatócitos, resultando em esteatose. A esteatose, por si mesma, aumentaria a sensibilidade do fígado ao segundo “*hit*”. O segundo “*hit*” seria o estresse oxidativo, que promoveria injúria hepática, caracterizada por lesões teciduais, inflamação e fibrose (DAY & JAYMES, 1998).

De acordo com a hipótese dos dois “*hits*”, a resistência à insulina favoreceria a lipólise no tecido adiposo e a lipogênese hepática, aumentando a quantidade de ácidos graxos liberados para o fígado (DONNELLY et al., 2005). Em condições fisiológicas normais, os ácidos graxos livres, ao entrar nos hepatócitos, são oxidados pelas mitocôndrias para gerar energia ou são esterificados em triacilglicerol (TAG), incorporados em partículas de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), e exportados do fígado para os tecidos periféricos (MITTENDORFER et al., 2016). No entanto, na DHGNA o aporte de ácidos graxos livres nos hepatócitos excede sua capacidade de metabolização e exportação, levando à infiltração gordurosa (MITTENDORFER et al., 2016).

O acúmulo de ácidos graxos livres no fígado resulta em aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas mitocôndrias (PESSAYRE et al., 2001). Adicionalmente, as vias de oxidação peroxissomal e microsomal são ativadas e geram mais EROs, culminado em estresse oxidativo hepático (LECLERQ et al., 2000). O estresse oxidativo parece ser o responsável pelo início da necroinflamação. A consequência do estresse oxidativo hepático é a peroxidação lipídica na membrana mitocondrial e celular, produzindo malondialdeído e hidroxinonenal (PAROLA et al., 2004). O malondialdeído ativa o fator de transcrição regulador da expressão de citocinas pró-inflamatórias e de moléculas de adesão (NF- κ B), promovendo a produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 8 (IL-8) e selectina E (JAESCHKE et al., 1996). O hidroxinonenal ativa as células estreladas do fígado, promovendo a deposição de colágeno e, conseqüentemente, o desenvolvimento de fibrose (LEE et al., 1995). Portanto, as EROs, os produtos da peroxidação lipídica e as citocinas estão envolvidos no segundo “*hit*”, o qual induz a progressão da esteatose simples para EHNA.

Atualmente, acredita-se que o processo de dois “*hits*” seja insuficiente para explicar a patogênese dessa doença heterogênea, principalmente em indivíduos não obesos (WANG et al., 2016). Além disso, a esteatose simples e a EHNA, podem refletir patogêneses diferentes

(TAKAKI et al., 2013). De fato, o acúmulo de ácidos graxos livres no fígado ocorre principalmente na forma de TAG (YAMAGUCHI et al., 2007). Há evidência de que os TAG, por si mesmos, não são hepatotóxicos (YAMAGUCHI et al., 2007). Portanto, a síntese de TAG parece ser uma resposta adaptativa e benéfica em situações, nas quais os hepatócitos estão expostos a metabólitos de TAG potencialmente tóxicos (YAMAGUCHI et al., 2007). Ao contrário, outros lipídios (como os ácidos graxos livres, diacilgliceróis, colesterol, ceramidas e fosfolipídeos) também acumulam no fígado e são considerados lipídeos “agressivos” (TILG & MOSCHEN, 2010). Esses compostos lipídicos induzem estresse do retículo endoplasmático, disfunção mitocondrial e estresse oxidativo, resultando em inflamação hepática e fibrogênese (FELDSTEIN et al., 2004; MARI et al., 2006).

Nesse sentido, uma nova teoria foi proposta por Tilg et al. (2010): a hipótese dos “*hits* multiparalelos”. Essa hipótese propõe que vários estímulos simultâneos e não consecutivos resultam tanto em esteatose hepática, quanto em esteato-hepatite (TILG; MOSCHEN, 2010). Enquanto a hipótese dos dois “*hits*” sugere que a esteatose sempre precede a inflamação, a hipótese dos “*hits* multiparalelos” indica que a inflamação na EHNA pode preceder a esteatose em alguns casos (TILG & MOSCHEN, 2010). Nesse novo paradigma, a EHNA resulta não apenas do estresse oxidativo, mas da interação entre diferentes “*hits*”, incluindo alterações da microbiota intestinal (TILG & MOSCHEN, 2010).

É cada vez mais reconhecido que a microbiota intestinal está implicada na patogênese e progressão da EHNA (BUZZETTI et al., 2016). Assim, a microbiota intestinal tornou-se um tema de interesse em investigações recentes e um potencial alvo de intervenção (MOUZAKI et al., 2016; XUE et al. 2017; FENG et al., 2017).

2.2 DISBIOSE INTESTINAL E EHNA

O intestino humano contém um grande número de microrganismos, na maioria bactérias, coletivamente denominado de microbiota intestinal (EREJUWA et al., 2014). A estimativa mais recente para o número total de células bacterianas no organismo humano é de cerca de 40 trilhões ($3,8 \times 10^{13}$), a mesma ordem que o número de células humanas ($3,0 \times 10^{13}$), e sua massa total é de 0,2 kg (SENDER et al., 2016). Mais de 1000 espécies gastrointestinais cultiváveis já foram identificadas na microbiota humana (RAJILIC-STOJANOVIC & WILLEM, 2014). Os avanços recentes das técnicas moleculares e nos programas de sequenciamento têm permitido a identificação de específicos grupos taxonômicos, isto é, de filos, classes, ordens, famílias, gêneros e espécies microbianas (ZHERNAKOVA et al., 2016). Atualmente, técnicas metagenômicas têm sido utilizadas para caracterizar a composição, a diversidade e os efeitos fisiológicos potenciais das comunidades microbianas inteiras sem a necessidade de cultivo e isolamento de membros dessa comunidade (LEPAGE et al., 2013).

Na maioria dos adultos, cerca de 90% dos filos são Firmicutes e Bacteroidetes, seguidos por Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria, Spirochaetae e Verrucomicrobia (COSTELLO et al., 2009). O estômago e o intestino delgado são ricos em Firmicutes (Lactobacillaceae) e Proteobacterias (Enterobacteriaceae), enquanto o intestino grosso mostra maiores contagens de Bacteroidetes (Bacteroidaceae, Prevotellaceae e Rikenellaceae) e de alguns Firmicutes (Lachnospiraceae e Ruminococcaceae) (SCHEITHAUER et al., 2016). A composição da microbiota adulta é parcialmente estável. Embora a diversidade microbiana seja adquirida nas primeiras horas após o nascimento, ela pode ser moldada ao longo do tempo à medida que a dieta se torna mais complexa e o sistema imunológico amadurece (YATSUNENKO et al., 2012). Assim, a combinação de múltiplos fatores, incluindo características genéticas e ambientais (tipo de parto, terapia com antibióticos, composição da dieta, estilo de vida, interações sociais e exposição a vários xenobióticos), modulam a microbiota intestinal para tornar cada indivíduo microbialmente único (TURNBAUGH et al., 2009).

A microbiota intestinal também pode ser muito dinâmica e mudar rapidamente, em resposta a mudanças na dieta. Um estudo mostrou que um aumento na ingestão calórica de 2400 para 3400 kcal / dia (com um perfil de nutrientes semelhante que inclui 24% de proteína, 16% de gordura e 60% de carboidratos), durante 3 dias, aumentou a proporção de Firmicutes

e diminuiu a proporção de Bacteroidetes (JUMPERTZ et al., 2011). A dieta é um fator importante na modificação da composição e metabolismo da microbiota intestinal (ZHERNAKOVA et al., 2016), e a influência da dieta sobre a saúde intestinal está descrita com mais detalhes na última sessão.

A microbiota intestinal é considerada um órgão metabólico que desempenha um papel importante na manutenção da saúde do hospedeiro. Os microrganismos que habitam o intestino atuam na digestão, metabolismo e absorção de nutrientes, síntese de vitaminas, proteção contra patógenos e modulação do sistema imunológico (EREJUWA et al., 2014). Embora esses benefícios sejam bem conhecidos, ainda não está clara a definição de uma microbiota intestinal saudável (KASHTANOVA et al., 2016). Por outro lado, o desequilíbrio da microbiota intestinal (distúrbio chamado de disbiose intestinal) pode favorecer a multiplicação de microrganismos potencialmente patogênicos, levando à produção excessiva de produtos ou metabólitos microbianos que podem prejudicar a saúde do hospedeiro, causando diversas doenças locais ou sistêmicas (KHO & LAL, 2018). A disbiose intestinal pode estar relacionada a fatores externos (por exemplo, uso de antibióticos, dieta, estresse físico e psicológico) e fatores ligados ao hospedeiro (por exemplo, imunidade e pH intestinal) (KHO; LAL, 2018).

Há evidências de que a composição da microbiota intestinal de indivíduos saudáveis é diferente da microbiota de pessoas acometidas por doenças crônicas, como a EHNA (MOUZAKI et al., 2013; WONG et al., 2013; ZHU et al., 2013; BOURSIER et al., 2016). Além disso, alterações na composição da microbiota intestinal foram associadas com o desenvolvimento de DHGNA e à sua progressão para a forma histológica mais grave (IMAJO et al., 2012; XIE et al., 2016). Apesar de os estudos em humanos serem escassos na literatura (Tabela 1), experimentos com animais sustentam a relação entre disbiose intestinal e EHNA.

2.2.1 Estudos em animais

Experimentos com animais vêm demonstrando a influência direta da microbiota intestinal no desenvolvimento e progressão da EHNA. Bäckhead et al. (2007) foram pioneiros em demonstrar que camundongos desprovidos de microbiota intestinal (chamados de “*germ-free*”) eram resistentes à esteatose hepática induzida pela dieta e apresentavam menor conteúdo de gordura corporal, quando comparados com camundongos convencionais (providos de microbiota intestinal). Os camundongos “*germ-free*”, quando colonizados com a microbiota de camundongos obesos e submetidos novamente à primeira dieta, aumentaram

em 57% o peso corporal, sendo que o ganho de gordura ocorreu especialmente no fígado, associado ao maior conteúdo de TAG (BÄCKHEAD et al., 2007).

Posteriormente, Le Roy et al. (2013) mostraram que as diferenças na composição da microbiota de camundongos podem determinar respostas a uma dieta rica em gordura e contribuir para o desenvolvimento da esteatose, independente de obesidade. Segundo os autores, camundongos convencionais alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram esteatose hepática, hiperglicemia, e inflamação sistêmica, sendo chamados de "respondedores". Por outro lado, alguns camundongos convencionais, alimentados com a mesma dieta, apresentaram-se normoglicêmicos e com menor nível de inflamação sistêmica, sendo chamados "não-respondedores". Em seguida, camundongos "germ-free" foram colonizados com a microbiota intestinal dos camundongos "respondedores" ou dos "não respondedores" e alimentados com a mesma dieta hiperlipídica. Apesar de um ganho de peso semelhante, os camundongos "receptor-respondedores" desenvolveram maior grau de esteatose hepática, glicemia e resistência à insulina, quando comparados aos camundongos "receptor-não-respondedores". A análise da microbiota intestinal revelou que os camundongos "respondedores" e os camundongos "não-respondedores" possuíam diferenças na microbiota intestinal a nível de filo, gênero e espécie. Os camundongos "respondedores" apresentavam maior proporção do filo Firmicutes, do gênero *Barnesiella*, e da espécie *Barnesiella intestinihominis* (LE ROY et al., 2013). A espécie *Barnesiella intestinihominis* foi associada, em outro experimento, à progressão da EHNA (HENAO-MEJIA et al., 2012).

A associação de disbiose com a progressão da EHNA também foi demonstrada por Xie et al. (2016). Nesse estudo, a microbiota intestinal dos animais modificou-se durante o desenvolvimento de esteatose hepática, e novas alterações foram observadas na microbiota, durante a progressão da esteatose para EHNA e carcinoma hepatocelular. As modificações foram caracterizadas por aumento significativo nos filios Firmicutes e Actinobacteria e redução nos filios Bacteroidetes e Proteobacterias. Além disso, a disbiose correlacionou-se positivamente com as características fisiopatológicas e com a concentração plasmática de lipopolissacarídeos (LPS) (XIE et al., 2016), uma endotoxina presente na superfície celular de bactérias Gram-negativas que provocou inflamação nos animais (CANI et al., 2007). Recentemente, outro estudo demonstrou que durante a progressão da EHNA os níveis de LPS aumentaram significativamente, enquanto a diversidade e abundância microbiana diminuíram. (XUE et al., 2017).

As alterações na microbiota intestinal parecem ainda estimular a fibrogênese hepática. De fato, camundongos com disbiose induzida por dieta hiperlipídica desenvolveram fibrose

hepática grave, quando comparados aos animais controles que consumiram dieta padrão (DE MINICIS et al., 2014). Nos animais com fibrose hepática a porcentagem de bactérias Gram-negativas (principalmente Proteobacterias) estava aumentada, enquanto a porcentagem de bactérias Gram-positivas (principalmente Erysipelotrichaceae e Bifidobacteriaceae) apresentava-se diminuída (DE MINICIS et al., 2014). Há evidências de que as bactérias da família Bifidobacteriaceae exercem função protetora durante injúria hepática (XING et al., 2006; OSMAN et al., 2007), enquanto as Proteobacterias são consideradas as principais bactérias patogênicas, que expressam endotoxinas (UEYAMA et al., 2005). Assim, esses achados sugerem que a disbiose, particularmente associada a hábitos dietéticos inadequados, pode acelerar a fibrogênese no fígado e contribuir para o desenvolvimento de lesão hepática crônica na EHNA (DE MINICIS et al., 2014). Entretanto, ensaios clínicos em humanos são necessários para suportar a relação entre a microbiota intestinal e a progressão da EHNA.

2.2.2 Estudos em humanos

O primeiro relato, em humanos, da relação entre disbiose intestinal e EHNA foi descrita por Drenick et al. (1982). Segundo os autores, pacientes submetidos a by-pass intestinal desenvolveram, paralelamente, supercrescimento bacteriano no intestino delgado (SBID) e EHNA. Após serem tratados com antibióticos, os pacientes apresentaram regressão da esteatose hepática, sugerindo a microbiota como possível causa de EHNA (DRENICK et al., 1982). Posteriormente, outras publicações revelaram que a prevalência de SBID é maior em pacientes com EHNA, quando comparada à prevalência nos grupos controles (Tabela 1). Por exemplo, Wigg et al. (2001) observaram SBID em 50% dos pacientes com EHNA e em 22% dos indivíduos do grupo controle ($p = 0,048$). No estudo de Shanab et al. (2011) a prevalência de SBID foi de 77% no grupo EHNA versus 31% no grupo controle ($p < 0,0001$).

O SBID é definido por um aumento no número de bactérias igual ou superior a 10^3 unidades formadoras de colônia / mL de conteúdo intestinal (REZAIE et al., 2017). Geralmente, considera-se que apenas o supercrescimento de microrganismos que colonizam o cólon está clinicamente relacionado ao SBID (ADIKE & DIBAISE, 2017). Os principais fatores de risco para o desenvolvimento de SBID são: produção reduzida de ácido gástrico, prejuízo da motilidade do intestino delgado e redução da imunidade (ADIKE & DIBAISE, 2017). Embora o "padrão-ouro" para o diagnóstico de SBID seja a aspiração jejunal e cultura, esta técnica requer intubação intestinal, que pode não ser bem tolerada e ainda não detectar as espécies não cultiváveis (CORAZZA et al., 1990). Portanto, para investigar a possível

presença de SBID em pacientes com EHNA, os estudos clínicos têm utilizado testes respiratórios (Tabela 1).

O teste respiratório é uma técnica simples, não invasiva e amplamente disponível, que determina no ar expirado a concentração de hidrogênio e/ou metano produzido pelo metabolismo microbiano intestinal (SAAD & CHEY, 2014). As células humanas não são capazes de produzir esses gases. A presença de hidrogênio e metano no ar alveolar expirado significa que resíduos de carboidratos foram metabolizados pela microbiota intestinal, produzindo gases, os quais são absorvidos pelo intestino e expirados através dos pulmões. Baseado neste princípio, quando uma substância de teste (geralmente lactulose ou glicose) é consumida por um paciente com presumível SBID, as mudanças nas concentrações de hidrogênio e metano em amostras sequenciais de ar alveolar expirado indicarão a presença de SIBO (REZAIE et al., 2016). Porém, os estudos são divergentes em relação ao método e interpretação do teste respiratório, com diferentes critérios para definir um teste como positivo (KRAJICEK & HANSEL, 2016).

A maioria dos estudos tem se concentrado na análise da microbiota fecal. Entretanto, é importante ressaltar que uma amostra fecal não reflete a composição da microbiota do intestino delgado, mas representa, principalmente, o conteúdo final do cólon (ZOETENDAL et al., 2012). Nessa linha de pesquisa, estudos têm observado alterações na composição da microbiota fecal de pacientes com EHNA, com algumas controvérsias em relação ao perfil das bactérias residentes no intestino. Enquanto Mouzaki et al. (2013) observaram redução do filo Bacteroidetes e nenhuma alteração no filo Firmicutes, dois outros estudos (WONG et al., 2013; ZHU et al., 2013) observaram aumento de Bacteroidetes e diminuição de Firmicutes. Outras alterações na composição da microbiota intestinal também foram descritas (Tabela 1). Percebe-se que a variabilidade entre os métodos (qPCR vs. pirosequenciamento) e o perfil dos indivíduos (adultos vs. crianças) poderiam explicar por que ainda não há consenso na literatura sobre quais grupos microbianos estão aumentados ou reduzidos na EHNA.

Tabela 1. Estudos que investigaram a microbiota intestinal em pacientes com esteato-hepatite não alcoólica

Referência	Estudo	Amostra	Método	Resultados e valor de p
Boursier et al. (2016)	Transversal	EHNA (n=35), sem EHNA (n=22)	16S rRNA	↑Bacteroides e ↓Prevotella em EHNA vs sem EHNA (p=0,013 e p=0,053; respectivamente)
Del Chierico et al. (2016)	Transversal	Crianças com EHNA (n=26), Controles saudáveis (n=54)	16S rRNA	↑Ruminococcus, Blautia, Dorea ↓Oscillospira em EHNA vs. Controles saudáveis (p < 0,05)
Zhu et al. (2013)	Transversal	EHNA (n=22), obesos (n=25) e controles saudáveis (n=16)	16S rRNA	↑Bacteroidetes e ↓Firmicutes em EHNA e obesos vs controles saudáveis (p=0,009 e p=0,002; respectivamente) ↑Proteobacteria, Enterobacteriaceae e Escherichia em EHNA vs controles saudáveis e obesos (p=0,0007)
Wong et al. (2013)	Longitudinal (6 meses)	EHNA (n=16) e controles saudáveis (n=22)	16S rRNA	↓Faecalibacterium e Anaerospobacter em EHNA vs controles saudáveis (p<0,05) ↑Parabacteroides e Allisonella em EHNA vs controles saudáveis (p<0,05) ↓Firmicutes em NASH vs controle saudável (p<0.05)
Mouzaki et al. (2013)	Transversal	EHNA (n=22), EH (n=11) e controles saudáveis (n=17)	qRT-PCR	↓Bacteroidetes em EHNA vs EH e controles saudáveis (p=0,006)
Shanab et al. (2011)	Transversal	EHNA (n=18) e controles saudáveis (n=16)	Teste de Hidrogênio Expirado com Lactulose	SBID em EHNA (77,78%) vs SBID em controles saudáveis (31,25%) (p<0,0001)
Wigg et al. (2001)	Transversal	EHNA (n=22) e controles saudáveis (n=23)	Teste de Hidrogênio Expirado com Lactulose combinada com Xilose	SBID em EHNA (50%) vs SBID em controles saudáveis (22%) (p=0,048)

↑=aumento; ↓=diminuição; EHNA=esteato-hepatite não alcoólica, EH=esteatose simples, qRT-PCR= reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real, 16S RNA= sequenciamento do 16S RNA ribossômico.

Embora poucos estudos clínicos tenham investigado a composição da microbiota intestinal na EHNA, acredita-se que essa doença está associada à disbiose. Os reais mecanismos envolvidos na relação intestino-fígado ainda não foram esclarecidos, mas os mais consistentes na literatura estão descritos a seguir (Figura 1).

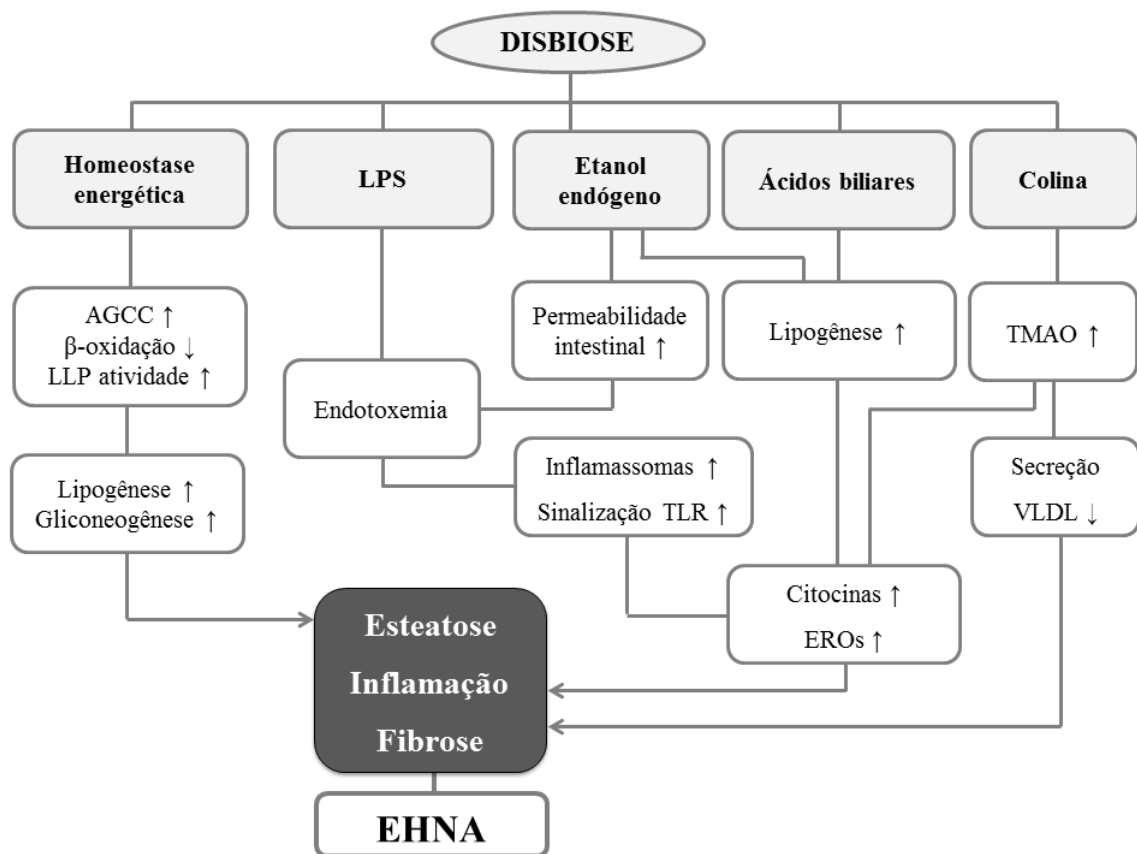


Figura 1. Mecanismos envolvidos na relação entre microbiota intestinal e esteato-hepatite não alcoólica. AGCC, ácidos graxos de cadeia curta; EHNA, esteato-hepatite não alcoólica; EROs, espécies reativas de oxigênio; LLP, lipase lipoproteica; LPS, lipopolissacarídeo; TMAO, óxido de trimetilamina; TLR; receptor do tipo Toll; VLDL, lipoproteína de muita baixa densidade.

2.2.3 Mecanismos envolvidos no desenvolvimento e progressão da EHNA

2.2.3.1 Modificação da homeostase energética

A microbiota intestinal tem a capacidade de extrair energia de alimentos via hidrolases de glicosídeos e liases de polissacarídeos, as quais não são codificadas pelo genoma humano (LE ROY et al., 2013). No cólon, essas enzimas metabolizam carboidratos não digeríveis a monossacarídeos e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), como o acetato, propionato e butirato. Os monossacarídeos produzidos pela fermentação microbiana são absorvidos e transferidos ao fígado pela circulação portal, onde ativam fatores como a proteína ligadora do elemento responsivo ao carboidrato (ChREBP), que aumenta a transcrição de proteínas envolvidas na lipogênese hepática (WOLEVER et al., 1989). Os AGCC são utilizados como fonte de energia pelos colonócitos ou transportados para tecidos periféricos, incluindo o fígado, onde são precursores para a lipogênese (SCHWIERTZ et al., 2009). Portanto, os AGCC produzidos a partir do metabolismo microbiano proveem uma fonte de energia adicional para o hospedeiro, promovendo o acúmulo de gordura no fígado (KOVATCHEVA-DATCHARY et al., 2013).

Os AGCC também atuam como sinalizadores moleculares que interagem com receptores acoplados à proteína-G, como o Gpr41 e Gpr43, expressos no intestino e tecido adiposo (MILLIGAN et al., 2009). A ativação de Gpr41 estimula células enteroendócrinas a aumentar a produção do peptídeo YY, hormônio que reduz a motilidade intestinal e propicia maior absorção de nutrientes, especialmente de AGCC (DEWULF et al., 2013). Já a ativação de Gpr43 contribui para inibição da lipólise, e diferenciação dos adipócitos com consequente aumento do tecido adiposo (ULVEN, 2012).

Adicionalmente à extração de energia dos alimentos, a presença da microbiota inibe a via da enzima 5'-monofosfato-adenosina proteína quinase (AMP-Q) e suprime a expressão intestinal do fator adipocitário induzido por jejum ou Fiaf (LE ROY et al., 2013). Quando a AMP-Q é inibida, ocorre a supressão da oxidação muscular de ácidos graxos, favorecendo a adiposidade corporal (LE ROY et al., 2013). A inibição do Fiaf resulta em aumento da atividade da lipase de lipoproteína, levando ao acúmulo de gordura no tecido adiposo e à maior captação hepática de ácidos graxos livres (DUSEJA & CHAWLA, 2014). A inibição do Fiaf ainda diminui a expressão do co-ativador-1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma α (PGC1- α) e de enzimas envolvidas na oxidação mitocondrial de ácidos graxos

(LE ROY et al., 2013). Juntos, esses efeitos aumentam a resistência à insulina, resultando em obesidade e esteatose hepática (LE ROY et al., 2013; DUSEJA & CHAWLA, 2014).

2.2.3.2 Endotoxemia pelo LPS

Alterações na microbiota intestinal, especialmente induzidas por dietas hiperlipídicas e hipercalóricas, podem aumentar os níveis de LPS circulante (MANCO et al., 2010; YE et al., 2012), favorecendo a ocorrência de endotoxemia metabólica (MANCO et al., 2010). A endotoxemia é uma inflamação de baixo grau que desempenha um papel fundamental no desenvolvimento e progressão da EHNA (CANI et al., 2008). O LPS é reconhecido por estruturas celulares, como os receptores de membrana do tipo Toll (TLRs), especialmente o TLR-4, e receptores intracelulares semelhantes à NOD (inflammasomas NLRP3 e NLRP6). A estimulação do TLR-4 resulta em ativação de várias cascatas de sinalização intracelular que induzem a síntese de citocinas inflamatórias (principalmente TNF- α), causando inflamação, estresse oxidativo e resistência à insulina (YE et al., 2012). As células de Kupffer, que expressam os níveis mais altos do TLR-4 hepático, são as células que respondem ao LPS para produzir citocinas e EROs (SU, 2002). A interação entre LPS e TLR-4 também ativa receptores nas células estreladas, resultando em fibrogênese hepática (MIELE et al., 2009). O aumento dos níveis de LPS também leva à lesão hepática por meio da ativação de inflamassomas (NLRPs), um grupo complexo de proteínas citoplasmáticas que estimula a clivagem das interleucinas pró-inflamatórias (ILs), como a pro-IL-1 β e a pro-IL-18 (SZABO & CSAK, 2012).

Vários estudos realizados tanto em animais, quanto em humanos, sustentam a relação entre endotoxemia pelo LPS e o desenvolvimento de EHNA (YANG et al., 1997; KIRSCH et al., 2006; CANI et al., 2007; RUIZ et al., 2007). Um experimento mostrou que a infusão crônica de LPS causou endotoxemia e esteatose hepática, em camundongos (CANI et al., 2007). Em pacientes com EHNA foi observado níveis aumentados de endotoxina, em comparação com indivíduos saudáveis (THUY et al., 2008; HARTE et al., 2010). Da mesma forma, foi descrito que indivíduos obesos mórbidos aumentaram os níveis de LPS e da proteína ligadora de LPS (LBP), os quais se correlacionaram com maior expressão hepática de TNF- α com a presença de EHNA (RUIZ et al., 2007). Uma possível explicação para a endotoxemia em pacientes com EHNA inclui a presença de SBID e a ruptura da integridade da barreira da mucosa intestinal, que causam aumento da permeabilidade intestinal e absorção

excessiva de LPS, resultando em inflamação de baixo grau e lesão hepática (BRUN et al., 2007; MIELE et al. 2009).

2.2.3.3 Aumento da produção endógena de etanol

Existe a hipótese de que o etanol endógeno contribui para a patogênese da EHNA (COPE et al., 2000). A concentração elevada de álcool na respiração de camundongos obesos e demonstraram que essa concentração pode ser reduzida após intervenção com antibióticos para a microbiota intestinal (COPE et al., 2000). Posteriormente, estudos observaram aumento de etanol endógeno em pacientes com EHNA, quando comparados a controles saudáveis (NAIR et al., 2001; ZHU et al., 2013). Além disso, estudo genético revelou uma expressão aumentada de álcool desidrogenase, catalase e aldeído desidrogenase, em amostras biopsiadas do fígado de pacientes com EHNA (BAKER et al., 2010). Em resumo, esses resultados sugerem que a microbiota de pacientes com EHNA produz mais etanol, o que induz a maior expressão de enzimas metabolizadoras do álcool no fígado (BAKER et al., 2010).

Em condições fisiológicas normais, a microbiota do intestino grosso é capaz de produzir e metabolizar etanol (NOSOVA et al., 1996). Foi demonstrado que, sob condições anaeróbicas, o metabolismo bacteriano do piruvato (produzido durante a digestão de carboidratos) gera acetaldeído, que pode então ser reduzido a etanol (MCMANUS et al., 1960). Este destino metabólico dos carboidratos é favorecido quando há SBID (BARAONA et al., 1986) ou se o consumo de açúcares (por exemplo, glicose, sacarose e frutose) é excessivo (HUNNISETT et al., 1990).

É possível que o supercrescimento de bactérias produtoras de etanol possa favorecer um aumento dos níveis circulantes de etanol em pacientes com EHNA. De fato, Zhu et al. (2013) mostraram maior taxa de *E.coli* no grupo EHNA, em comparação com grupos sem EHNA. A *E. coli* é membro da Família de Enterobacteriaceae, que normalmente degrada aerobicamente carboidratos por fermentação ácida mista (BÖCK & SAWERS, 1996). O etanol é um dos produtos comuns desta via (BÖCK & SAWERS, 1996). Além disso, é possível sugerir que o crescimento excessivo de outras bactérias intestinais produtoras de etanol (por exemplo, *Lactobacillus fermentum*, *Weissella confusa*) também possa explicar a maior concentração plasmática de etanol em alguns pacientes com EHNA (ELSHAGHABEE et al., 2016), principalmente naqueles cuja dieta é rica em carboidratos (VOLYNETS et al., 2012).

No fígado, o etanol é metabolizado a acetato e acetaldeído. Enquanto o acetato é utilizado como substrato para síntese hepática de ácidos graxos, o acetaldeído estimula a produção de espécies reativas de oxigênio, causando injúria hepática por meio de mecanismos que levam à inflamação e fibrose (COPE et al., 2000; GUSTOT et al., 2006; TURNBAUGH et al., 2006). Além disso, a produção aumentada de etanol pelas bactérias intestinais pode prejudicar a barreira intestinal e aumentar a permeabilidade ao LPS, causando endotoxemia (COPE et al., 2000; GUSTOT et al., 2006; FORSYTH et al. 2011). Consequentemente, o fígado, que está exposto ao fluxo sanguíneo derivado do intestino, é estimulado a produzir citocinas, como TNF- α (COPE et al., 2000) e EROs, resultando em lesão hepática (GUSTOT et al., 2006).

2.2.3.4 Alteração do metabolismo dos ácidos biliares

Os ácidos biliares primários (colato e quenodeoxicolato) são sintetizados e conjugados com glicina ou taurina no fígado, armazenados na vesícula biliar e liberados no duodeno até a ingestão de uma refeição gordurosa (DAWSON & KARPEN, 2015). No intestino, os ácidos biliares são metabolizados por bactérias em ácidos biliares mais hidrofóbicos, através da 7 α -desidroxilação e/ou desconjugação de grupos hidrofílicos, resultando em ácidos biliares secundários (deoxicolato e litocolato) (COPPLE & LI, 2016). Mais de 95% dos ácidos biliares são reabsorvidos no íleo distal e retornam para o fígado por meio do ciclo entero-hepático (SCHAAP et al., 2013).

Além de promover a absorção de gordura, colesterol e vitaminas lipossolúveis no intestino, os ácidos biliares também atuam como moléculas sinalizadoras que modulam uma variedade de processos fisiológicos (CLAUDEL et al., 2005). Os ácidos biliares primários ativam o receptor farnesóide X (FXR) (CLAUDEL et al., 2005), enquanto os ácidos biliares secundários são ligantes para o receptor acoplado à proteína G (TGR5) (FERSLEW et al., 2015). A ativação das vias FXR regula a síntese e o ciclo entero-hepático dos ácidos biliares, e também atuam no controle da lipogênese hepática de novo no fígado e na exportação de TAG pela VLDL (SAYIN et al., 2013). A ativação de TGR5 induz à liberação intestinal do peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1) e melhora a tolerância à glicose (FERSLEW et al., 2015). Portanto, os ácidos biliares desempenham funções cruciais na homeostase lipídica e glicêmica (SAYIN et al., 2013; FERSLEW et al., 2015).

Ao alterar o metabolismo dos ácidos biliares e suas vias de sinalização, a microbiota intestinal poderá contribuir para a patogênese da EHNA (ARANHA et al., 2008). Embora o

mecanismo preciso seja desconhecido, concentrações alteradas de ácidos biliares têm sido descrito em pacientes com DHGNA (FAUBION et al., 1999; KALHAN et al., 2011; BUZZETTI et al., 2016). Os pacientes com EHNA têm concentrações séricas mais elevadas de ácidos biliares total em jejum e no período pós-prandial, incluindo os ácidos biliares secundários que tendem a ser mais hidrofóbicos e citotóxicos (KALHAN et al., 2011). Em estudo semelhante, as concentrações de ácidos biliares totais e secundários estavam aumentadas no tecido hepático de pacientes com EHNA (FAUBION et al., 1999). É possível que esse aumento circulante de ácidos biliares seja resultado da maior taxa de síntese hepática ou, possivelmente, por uma resposta adaptativa ao acúmulo de TAG no fígado (PARLESACK et al., 2007). Além disso, níveis mais elevados de ácidos biliares foram observados nas fezes de pacientes com EHNA (MOUZAKI et al., 2016). Neste mesmo estudo, houve correlação positiva entre disbiose e ácidos biliares primários não conjugados (MOUZAKI et al., 2016).

A disbiose pode alterar substancialmente a composição dos ácidos biliares. No cólon, maiores taxas de *Bacteroides*, *Clostridium* e *Escherichia* foram associadas à maior desconjugação e/ou desidroxilação de ácidos biliares e, conseqüentemente, à maior concentração de ácidos biliares secundários não conjugados na circulação (KALHAN et al., 2011). Por outro lado, menor abundância relativa de *Clostridium leptum* correlacionou-se com maior concentração de ácido cólico e deoxicólico nas fezes de pacientes com EHNA (MOUZAKI et al., 2016). Maior concentração de ácidos biliares primários não conjugados nas fezes foi positivamente correlacionada com esteatose, balonização e fibrose (MOUZAKI et al., 2016). Em níveis elevados, os ácidos biliares são capazes de causar estresse inflamatório e oxidativo, resultando em apoptose ou necrose, e eventualmente fibrose e cirrose (JIA et al., 2013; FERSLEW et al., 2015). Além disso, o aumento da desconjugação dos ácidos biliares pela microbiota pode comprometer a permeabilidade intestinal favorecendo a translocação de LPS e endotoxemia (LORENZO-ZÚÑIGA et al., 2003; MOUZAKI et al., 2016).

2.2.3.5 Alteração do metabolismo da colina

A colina é um nutriente essencial e componente fosfolipídico das membranas celulares, necessária para a formação da VLDL e exportação de lipídeos do fígado (GAO et al., 2014). O metabolismo da colina pela microbiota intestinal reduz a biodisponibilidade da colina livre para a secreção de VLDL, favorecendo o acúmulo de gordura no fígado (GAO et al., 2014; SHIH et al., 2015). Adicionalmente, as enzimas produzidas pela microbiota

intestinal catalisam a conversão da colina dietética em metilaminas tóxicas, como a trimetilamina (TMA) (LIU et al., 2016). A TMA é posteriormente oxidada no fígado a N-óxido de trimetilamina (TMAO), induzindo a inflamação (SHIH et al., 2015). Além disso, a TMAO está associada à hiperinsulinemia e aumento da resistência à insulina, prejudicando a tolerância à glicose (RAUBENHEIMER et al., 2006). Similarmente, a TMAO ativa vias metabólicas que resultam em aumento da lipogênese hepática (PELZ et al., 2012; SHIH et al., 2015). Portanto, o efeito da TMAO sobre o metabolismo da glicose e dos lipídeos pode favorecer o desenvolvimento de esteatose hepática (SHIH et al., 2015).

Poucos estudos examinaram a associação da colina ou de seus metabólitos com a EHNA. Há evidência de que uma dieta deficiente em colina exacerbou o acúmulo de gordura no fígado de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (RAUBENHEIMER et al., 2006), favoreceu o desenvolvimento de EHNA (HENAO-MEJIA et al., 2012) e resultou em fibrose hepática (PELZ et al., 2012). Similarmente, estudo clínico mostrou que o consumo de uma dieta com baixo teor de colina promoveu acúmulo de TAG no fígado e causou fibrose avançada (GUERRERIO et al., 2012), enquanto níveis elevados de TMAO plasmático associaram-se diretamente com a gravidade da EHNA (CHEN et al., 2016). Ainda há evidência de que a depleção de colina dietética modificou a composição da microbiota intestinal de mulheres saudáveis, causando variações na taxa de *Erysipelotrichi* (Firmicutes) e de *Gammaproteobacteria* (Proteobacteria) (SPENCER et al., 2012). Particularmente os microrganismos do grupo *Gammaproteobacteria*, incluindo *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.* e *Escherichia spp.*, são bactérias gram-negativas que possuem LPS (SPENCER et al., 2012). Portanto, o aumento do LPS circulante também pode ser um dos possíveis mecanismos envolvidos no desenvolvimento da EHNA em pacientes com deficiência de colina (SPENCER et al., 2011).

Assim, com base nesses dados da literatura, verificamos que pacientes com EHNA apresentam uma microbiota intestinal distinta (Tabela 1), que justifica, pelo menos em parte, a gênese dessa doença por meio de vários mecanismos. Considerando que a EHNA parece estar associada com disbiose, sugerimos que a modulação da microbiota intestinal poderia ser uma possibilidade de tratamento dessa doença hepática em alarmante crescimento. Atualmente, têm-se investigado diferentes estratégias para a modulação da microbiota intestinal, como o uso de probióticos e antibióticos, e a realização de transplante fecal (PARK et al., 2013; GALLO et al., 2016, CHOI;CHO, 2016). Porém, a dieta parece ser a forma mais simples, fisiológica e de maior adesão para melhorar a saúde intestinal (FAVA et al., 2013, XU; KNIGHT, 2015).

2.3 DIETA E MICROBIOTA INTESTINAL

A dieta inadequada é um dos principais fatores que contribui para o desenvolvimento e progressão da EHNA (SCHWENGER & ALLARD, 2014). Essa associação deve-se, em parte, à influência da alimentação sobre a composição e atividade metabólica da microbiota intestinal (ABDOU et al., 2016; KIRPICH et al., 2016, LEUNG et al, 2016). Como mencionado nas seções anteriores, dietas hipercalóricas, dietas hiperlipídicas e dietas ricas em carboidratos (principalmente frutose) podem causar disbiose, a qual tem sido implicada na patogênese da EHNA.

Corrigir os hábitos dietéticos é tipicamente uma recomendação padrão para o tratamento da EHNA (NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CARE EXCELLENCE, 2016). Entretanto, parece não haver estudos na literatura investigando os efeitos da modificação exclusivamente dietética sobre a microbiota intestinal desses pacientes. Existem evidências com animais e indivíduos sem EHNA sugerindo que a quantidade de energia da dieta e a proporção dos três macronutrientes (lipídeos, carboidratos e proteínas) têm o potencial de melhorar a saúde intestinal.

Os efeitos da dieta hipocalórica sobre a microbiota intestinal foram demonstrados em camundongos e indivíduos com obesidade (SANTACRUZ et al., 2009; KIM et al., 2013; ZHANG et al., 2013, BREUSING et al., 2017). A restrição de calorias enriqueceu grupos microbianos correlacionados com efeitos probióticos, como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, e reduziu os grupos correlacionados com inflamação e obesidade, como *Streptococcaceae* e *Desulfovibrionaceae* (ZHANG et al., 2013). As mudanças induzidas na microbiota intestinal, por meio de dieta hipocalórica, ocorreram concomitantemente com a redução dos níveis séricos da proteína ligadora de LPS, sugerindo que a restrição calórica pode estabelecer uma arquitetura estruturalmente equilibrada da microbiota intestinal, com benefícios para a saúde do hospedeiro (ZHANG et al., 2013). Em indivíduos com obesidade, a dieta hipocalórica diminuiu o filo Firmicutes e aumentou Bacteroidetes, tornando a microbiota intestinal dos indivíduos obesos semelhante a dos indivíduos magros (SANTACRUZ et al., 2009; KIM et al., 2013). Além disso, a restrição calórica aumentou a riqueza de genes microbianos em indivíduos com obesidade (COTILLARD et al., 2013) e normalizou os níveis circulantes de LPS (BREUSING et al., 2017).

Independente da redução de calorias da alimentação, o balanço entre os três macronutrientes dietéticos pode influenciar a microbiota intestinal (SCHWENGER &

ALLARD, 2014). Por exemplo, no estudo de Fava et al. (2013) o consumo de dieta normocalórica, composta de 55% de carboidratos, 17% de proteínas e 28% de lipídeos, resultou em aumento da população de *Bifidobacterium spp*, grupo de bactérias que melhora a regulação energética corporal e reduz fatores de risco para doenças metabólicas (VAMANU et al., 2016). Por outro lado, o consumo de dieta “*very low-carb*”, atualmente utilizada em dietas de emagrecimento, com 4% carboidratos, 35% proteínas e 61% lipídeos, reduziu a contagem de *Bifidobacteria*, acompanhada de redução de AGCC no conteúdo fecal, principalmente de butirato (BRINKWORTH et al., 2009), que tem efeito benéfico na inflamação (LOPEZ-LEGARREA et al., 2014). Cabe ressaltar, que dietas de baixo carboidrato podem prejudicar a microbiota fecal, desde que sejam também restritas em alimentos ricos em fibras dietéticas, como grãos, frutas, e hortaliças (DUNCAN et al., 2007; BRINKWORTH et al., 2009). Em geral, dietas ricas em fibras, especialmente em amido resistente e oligossacarídeos, conferem benefício à saúde do hospedeiro, pois possuem a capacidade seletiva de serem fermentadas e de modificar favoravelmente a composição e atividade da microbiota intestinal (WALTON et al., 2012; TERPEND et al., 2013; SALONEN et al., 2014). Assim, o papel dos macronutrientes na composição e função da microbiota intestinal precisa ser mais explorado.

A maioria dos estudos nessa linha de pesquisa são epidemiológicos observacionais, com ênfase no impacto da dieta "ocidental" (rica em gordura e proteína animal e pobre em fibras) versus dieta "não-ocidental" (pobre em gordura animal e proteína animal e rica em fibras) (DE FILIPPO et al., 2010; OBREGON-TITO et al., 2015; AMATO et al., 2015; SCHEITHAUER et al., 2016). As dietas ocidentais e não-ocidentais foram consistentemente associadas a diferentes comunidades microbianas intestinais (DE FILIPPO et al., 2010; OBREGON-TITO et al., 2015; AMATO et al., 2015; SCHEITHAUER et al., 2016). De Filippo et al. (2010) observaram maior proporção de Firmicutes e menor proporção de Bacteroidetes em crianças europeias (padrão dietético Ocidental), em comparação com crianças residentes de uma região rural da África (padrão dietético não Ocidental). Amato et al. (2015) observaram que populações não-ocidentais apresentavam maior riqueza microbiana e maior abundância relativa de *Prevotella*, quando comparadas a populações ocidentais. Estas, por sua vez, apresentavam uma abundância relativamente maior de *Bacteroides*. Esses achados são concordantes com outros estudos que associaram dieta rica em proteínas e gordura animal com altos níveis de *Bacteroides*, e dieta rica em carboidratos com altos níveis de *Prevotella* (DE FILIPPO et al., 2010; WU et al., 2011; OBREGON-TITO et al., 2015; SCHEITHAUER et al., 2016). O grupo dos *Bacteroides*, ao contrário do *Prevotella*, foi

identificado no metagenoma de indivíduos com pouca riqueza genética e associados à adiposidade, resistência à insulina e dislipidemia, bem como a um fenótipo inflamatório (LE CHATELIER et al., 2013).

Há ainda evidência de que populações não ocidentais apresentam maior abundância de *Xylanibacter* (DE FILIPPO et al., 2010). O gênero *Xylanibacter*, assim como o gênero *Prevotella*, é conhecido por expressar enzimas que hidrolisam celulose e xilano (RAJILIC-STOJANOVIC & WILLEM, 2014). Outro achado significativo foi a baixa abundância do grupo Enterobacteriaceae (*Shigella* e *Escherichia*) nas populações não ocidentais, quando comparadas às populações ocidentais (DE FILIPPO et al., 2010). A família Enterobacteriaceae é a mais diversa, prevalente e abundante de todas as Proteobacteria no trato gastrointestinal (RAJILIC-STOJANOVIC; WILLEM, 2014), e a maioria dessas bactérias estão associadas com desfechos negativos (THIELMAN & GUERRANT, 2004).

Estudos sugerem que a dieta ocidental é capaz de aumentar os níveis de LPS na circulação, levando à endotoxemia metabólica (CANI et al., 2008; PENDYALA et al., 2012; MURPHY et al., 2015). Por exemplo, em ensaio clínico com indivíduos saudáveis o consumo de dieta estilo ocidental (40% de carboidratos, 40% de lipídeos, 20% de proteínas e 12,5g de fibras) aumentou em 71% a endotoxina plasmática, enquanto a dieta padrão (60% de carboidratos, 20% de lipídeos, 20% de proteínas e 31g de fibras) reduziu o LPS em 38% (PENDYALA et al., 2012). Provavelmente, a endotoxemia pelo LPS está associada ao elevado teor de gordura da dieta, que prejudica a permeabilidade intestinal e aumenta a translocação de LPS para a circulação (CANI et al., 2008; MURPHY et al., 2015).

No entanto, evidências apontam que a qualidade do lipídeo influencia de forma diferente as concentrações de LPS circulante. Em adultos saudáveis, uma única refeição rica em ácidos graxos saturados do óleo de coco foi capaz de aumentar a concentração de LPS pós-prandial (LYTE et al., 2016). Em animais, dieta rica em ácidos graxos saturados de óleo de palma aumentou a concentração de moléculas transportadoras de LPS (LAUGERETTE et al., 2012). Dieta rica em ômega 6 de óleo de milho também foi associada à translocação intestinal de endotoxinas (GHOSH et al., 2013). Ao contrário, o ômega 6 proveniente do óleo de cártamo, assim como o ômega 3 do óleo de peixe, reduziram a permeabilidade intestinal e os níveis de endotoxina (SADEGHI et al., 1999; XIAO et al., 2015; LYTE et al., 2016). Por último, o ácido graxo monoinsaturado do azeite de oliva pode contribuir para a menor translocação de LPS, pois foi associado a um aumento na abundância de *Bifidobacteria*, a qual contribui para o aumento da função da barreira intestinal (MUJICO et al., 2013).

Outro aspecto relevante da dieta que influencia a microbiota intestinal e promove endotoxemia é o consumo de frutose. A frutose, naturalmente presente em frutas e vegetais, é encontrada em grande quantidade em alimentos processados e bebidas adoçadas, como os refrigerantes (YANG et al., 2014). A frutose dos alimentos processados está fortemente associada à DHGNA (OUYANG et al., 2008; THUY et al., 2008), e seu consumo em pacientes com DHGNA é aproximadamente duas a três vezes superior ao consumo de frutose por indivíduos saudáveis (OUYANG et al., 2008). Nesses pacientes, o consumo de bebidas ricas em frutose elevou os níveis de endotoxina circulante, a qual se correlacionou com marcadores de alterações metabólicas e com inflamação (JIN et al., 2014). Além disso, o consumo de frutose, por meio de produtos industrializados, promoveu SBID, aumentou a permeabilidade intestinal e a ativação de células Kupffer, causando injúria hepática (SPRUSS et al., 2009; WAGNERBERGER et al., 2012). Em outro experimento, o consumo de dieta rica em frutose aumentou o número de bactérias dos gêneros *Coprococcus* e *Ruminococcus* no conteúdo fecal e associou-se com o desenvolvimento de síndrome metabólica. Todos esses resultados sustentam o papel da frutose no desenvolvimento e progressão da EHNA. Assim, a substituição da frutose por carboidratos não digeríveis (fibras dietéticas) poderia evitar as consequências da disbiose no eixo intestino-fígado.

Apesar de os estudos empregarem diferentes metodologias, tipos de amostras e análises, dificultando a comparabilidade e generalização dos achados, está claro que a dieta é um importante fator ambiental que regula e modifica nossa microbiota intestinal. Além disso, existe um consenso de que a dieta é uma das principais intervenções que reduz a esteatose hepática e as alterações metabólicas da EHNA (NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CARE EXCELLENCE, 2016). Entretanto, a busca sistemática em bases de dados da literatura não encontrou estudos sobre os efeitos da modificação exclusivamente dietética na saúde intestinal de pacientes com EHNA.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a composição da microbiota intestinal e o perfil metabólico-nutricional em pacientes com esteato-hepatite não alcoólica, bem como os efeitos da intervenção dietética nos parâmetros supracitados.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Artigo 1) Caracterizar a composição da microbiota fecal em pacientes com esteato-hepatite não alcoólica. Associar a microbiota fecal com ingestão dietética, marcadores metabólicos (tolerância à glicose, metabolismo lipídico e função hepática), antropometria, composição corporal e gravidade da doença hepática gordurosa não alcoólica.

Artigo 2) Avaliar o impacto de três meses de intervenção com dieta individualizada:

- Na glicemia e insulinemia de jejum;
- Na resistência à insulina;
- Nos níveis de triacilgliceróis de jejum;
- No colesterol total, HDL e LDL em jejum;
- Nos biomarcadores hepáticos (aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, gama-glutamil transferase e bilirrubina) em jejum;
- Na frequência de síndrome metabólica;
- Nos parâmetros antropométricos (peso, índice de massa corporal e circunferência da cintura);
- Na composição corporal (gordura corporal total);
- Na frequência de testes positivos para supercrescimento bacteriano no intestino delgado;
- Na concentração de hidrogênio e metano do ar alveolar expirado, após ingestão de lactulose;
- Na composição da microbiota fecal.

Artigo 2) Caracterizar os pacientes com esteato-hepatite não alcoólica em relação à histologia hepática, histórico clínico, nível de atividade física e consumo alimentar.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDO, LOCAL E CASUÍSTICA

A metodologia envolve dois artigos originais. O Artigo 1 de caráter transversal, descritivo e analítico avaliou dados parciais de pacientes com EHNA. O Artigo 2 trata-se de um ensaio clínico randomizado, paralelo e aberto, com dados de intervenção de pacientes com EHNA. Os voluntários da pesquisa foram recrutados do ambulatório de Hepatologia/Esteatose do Hospital Universitário/EBSERH (HU/EBSERH), da Universidade Federal de Juiz de Fora/MG. Os pacientes foram incluídos de julho de 2015 a setembro de 2017, e os critérios de inclusão foram: idade ≥ 18 anos, de ambos os gêneros e com diagnóstico prévio de EHNA. O diagnóstico de EHNA foi realizado por meio de biópsia hepática, após avaliação clínica e laboratorial, conforme rotina do Ambulatório de Hepatologia/Esteatose do HU/EBSERH-UFJF. As biópsias hepáticas foram tipicamente realizadas em pacientes com sinais de doença hepática gordurosa, excluindo outras doenças hepáticas, e na presença de níveis persistentemente elevados de alanina aminotransferase (ALT) ou aspartato aminotransferase (AST), superior a 1,5 vezes o valor normal máximo em pelo menos duas medidas, com um intervalo mínimo de um mês entre elas. Esses critérios são baseados no protocolo de avaliação desenvolvido pelo Grupo Brasileiro de Estudos da DHGNA-Sociedade Brasileira de Hepatologia (COTRIM et al., 2011).

Os critérios de não inclusão foram: presença de outras hepatopatias relevantes, diagnosticadas através de testes laboratoriais para as seguintes doenças: hepatite crônica B (AgHBs), hepatite crônica C (anti-HCV), doenças autoimunes do fígado (antimúsculo liso - AAML, antimitocôndria - AAM e fator antinúcleo - FAN e hemocromatose (ferritina). Ainda não participaram do estudo portadores de infecção pelo HIV 1 e 2, pacientes com doença inflamatória intestinal, gestantes, lactantes e pacientes com hepatopatia induzida por droga. Além disso, não foram incluídos pacientes com consumo excessivo de álcool (> 30 g / dia em homens ou > 20 g / dia em mulheres) ou aqueles que utilizaram laxantes, antibióticos, prebióticos/probióticos nos dois meses anteriores à inclusão no estudo.

No Artigo 1, a amostra foi determinada por conveniência, sendo incluídos 30 pacientes com EHNA. No Artigo 2, realizou-se o cálculo amostral (POCOCK, 1983), utilizando um poder de 90% e nível de significância de 5% para detectar uma diferença de 46,5% na prevalência de SIBO (SHANAB et al., 2011). De acordo com o cálculo amostral, um mínimo de dezenove pacientes deveria ser recrutado para cada grupo do estudo. Inicialmente 45

pacientes com diagnóstico definitivo de EHNA foram recrutados; entretanto, um paciente recusou-se em participar e 4 (2 em cada grupo) foram excluídos, pois não completaram o protocolo experimental (motivos pessoais). Portanto, quarenta pacientes que completaram o protocolo experimental foram incluídos nas análises (Figura 2).

Esse ensaio clínico randomizado foi de três meses de duração. Os pacientes foram randomizados em dois grupos: o grupo experimental, que recebeu dieta individualizada mais orientação nutricional (grupo DIETA, $n = 20$), e grupo controle, que recebeu apenas orientação nutricional (grupo CT, $n = 20$). Um pesquisador que não esteve diretamente envolvido na seleção da amostra foi responsável pela randomização. Para cada quatro pacientes ambulatoriais que concordaram em participar do estudo, dois foram sorteados para pertencer ao grupo DIETA, e os outros dois foram sorteados para o grupo CT, e assim por diante, até que o número estimado da amostra fosse alcançado. A randomização de blocos foi usada para evitar ou diminuir desequilíbrios possíveis em algum momento do processo de randomização. A distribuição das variáveis idade e sexo dos pacientes foi semelhante nos grupos DIETA e CT, confirmando a adequação do processo de randomização no início do estudo. No início do estudo, os pacientes foram avaliados em relação às variáveis de interesse. Ambos os grupos foram acompanhados em consultas individuais, mensalmente, pelo mesmo nutricionista. Todos os voluntários foram instruídos a manter o mesmo nível de atividade física durante o período experimental. Após o período de intervenção, os grupos foram reavaliados.

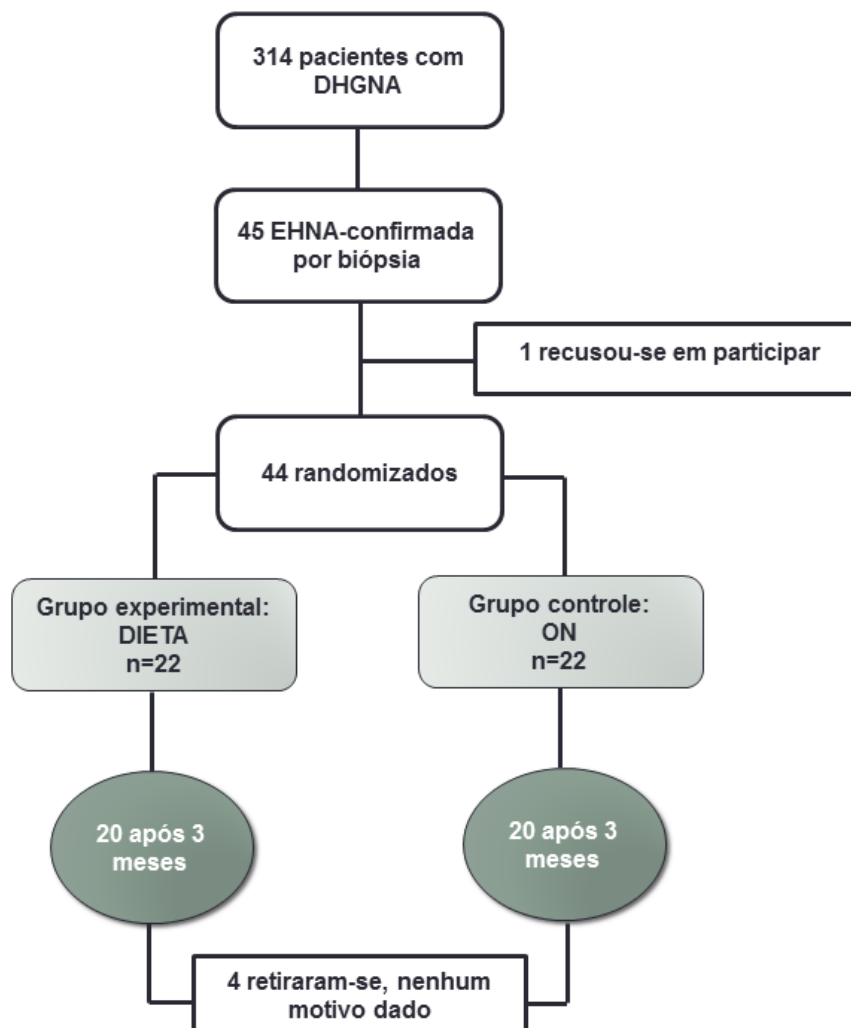


Figura 2. Fluxograma de recrutamento dos pacientes com esteato-hepatite não alcoólica.

Fonte: A autora, 2019.

Todos os voluntários, somente após esclarecimento prévio e concordância, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A), contido no projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora (HU/UFJF) sob o parecer número 1.129.516/2015 (ANEXO I). Esse ensaio clínico é registrado sob o nome "Efeitos da intervenção nutricional no perfil nutricional, inflamação e saúde intestinal de pacientes ambulatoriais com doença hepática", número de identificação do registro RBR-2rcph2, <http://ensaiosclinicos.gov.br/rg/RBR-2rcph2/>.

4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

4.2.1 Anamnese

A anamnese foi constituída de questões relativas a dados pessoais, histórico clínico, comportamento alimentar e nível de atividade física de acordo com o IPAQ versão curta (MATSUDO et al., 2002), com perguntas em relação à frequência e duração da realização de atividades físicas moderadas, vigorosas e da caminhada. Os indivíduos foram classificados em muito ativo, ativo, irregularmente ativo e sedentário. Para analisar os dados do nível de atividade física foi usado o consenso do Center for Disease Control (CDC) (CENTER DISEASE OF PREVENTION AND CONTROL), que classifica em cinco categorias:

1) MUITO ATIVO: aquele que cumpriu as recomendações de: a) VIGOROSA: 5 dias/sem e 30 minutos por sessão e/ou b) VIGOROSA: 3 dias/sem e 20 minutos por sessão + MODERADA e/ou CAMINHADA: 5 dias/sem e 30 minutos por sessão.

2. ATIVO: aquele que cumpriu as recomendações de: a) VIGOROSA: 3 dias/sem e 20 minutos por sessão; e/ou b) MODERADA ou CAMINHADA: 5 dias/sem e 30 minutos por sessão; e/ou c) Qualquer atividade somada: 5 dias/sem e 150 minutos/sem (caminhada + moderada + vigorosa).

3. IRREGULARMENTE ATIVO: aquele que realiza atividade física, porém insuficiente para ser classificado como ativo, pois não cumpre as recomendações quanto à frequência ou duração. Para realizar essa classificação soma-se a frequência e a duração dos diferentes tipos de atividades (caminhada + moderada + vigorosa). Este grupo foi dividido em dois subgrupos de acordo com o cumprimento ou não de alguns dos critérios de recomendação. IRREGULARMENTE ATIVO A: aquele que atinge pelo menos um dos critérios da recomendação quanto à frequência ou quanto à duração da atividade: a) Frequência: 5 dias /semana ou b) Duração: 150 min / semana IRREGULARMENTE ATIVO B: aquele que não atingiu nenhum dos critérios da recomendação quanto à frequência nem quanto à duração.

4. SEDENTÁRIO: aquele que não realizou nenhuma atividade física por pelo menos 10 minutos contínuos durante a semana.

O diagnóstico de hipertensão arterial sistêmica e diabetes tipo 2 foi obtido a partir de registros médicos. A presença de síndrome metabólica foi definida de acordo com os critérios da Federação Internacional de Diabetes (ALBERTI et al., 2009).

4.2.2 Histologia hepática

As amostras da biópsia hepática, coletadas antes da inclusão no estudo, foram revisadas por um patologista cego às características clínicas dos pacientes. A análise histológica foi baseada no escore de atividade da DHGNA (*NAFLD activity score* - NAS), desenvolvido pelo *Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network* (KLEINER et al., 2005). Os componentes do NAS (esteatose, inflamação lobular, balonização e fibrose hepática) foram avaliados semiquantitativamente. A "fibrose significativa" foi definida como estágio de fibrose $F \geq 2$ (BOURSIER et al., 2016).

4.2.3 Avaliação bioquímica

Após 12 h de jejum, foram colhidas amostras venosas para análise dos biomarcadores hepáticos, perfil glicêmico e lipídico. O sangue foi separado por centrifugação e analisado imediatamente no Laboratório de Análise Clínica do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora. AST, ALT, γ -glutamilttransferase (GGT), bilirrubina total (BT), glicemia em jejum, colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL) e TAG foram analisados através de métodos laboratoriais padrão, por meio de um autoanalisador WIENER LAB, CT600i. A insulina de jejum foi determinada pelo autoanalisador Architect, modelo i1000SR. A lipoproteína de baixa densidade (LDL) foi calculada de acordo com Friedewald et al., (1972). A avaliação do modelo de homeostasis da resistência à insulina (HOMA-IR) foi calculada de acordo com Matthews et al. (1985).

4.2.4 Avaliação antropométrica e dietética

O peso corporal, a altura, a circunferência da cintura e o percentual de gordura corporal foram avaliados em estado de jejum, por um único avaliador treinado. A circunferência da cintura foi medida no ponto médio entre a crista ilíaca e a última costela. O índice de massa corporal (IMC) foi calculado dividindo o peso em quilogramas por altura quadrada em metros (DEPARTMENT OF NUTRITION FOR HEALTH AND DEVELOPMENT, WHO, 2006). O percentual de gordura corporal foi avaliado por meio de bioimpedância (RJL Systems, Inc (EUA) - Modelo Quantum II, número de série Q4631IID), conforme descrito previamente (KYLE et al., 2004). Para a realização da bioimpedância, o paciente foi orientado a não realizar exercícios rigorosos, evitar bebidas alcoólicas e consumo

excessivo de café/bebidas cafeinadas na véspera do exame. Além disso, não deveria consumir líquidos até 4 horas antes da avaliação (KYLE et al., 2004).

A avaliação dietética foi realizada por meio do Questionário Quantitativo de Frequência Alimentar, validado para a população brasileira por Ribeiro & Cardoso, 2002, considerando que não há questionário validado e publicado para pacientes com EHNA. Todos os questionários alimentares foram analisados pelo mesmo nutricionista e as ingestões diárias de energia e nutrientes (carboidratos, fibras, lipídios, gorduras saturadas e insaturadas, colesterol e proteínas) foram calculadas pelo uso do software Dietpro 5i (Agromídia, Viçosa, Brasil), com base a composição proposta pela 2ª edição (versão 2) da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO e da National Nutrient Database for Standard Reference (USDA). A adequação do consumo alimentar foi avaliada de acordo com as recomendações dietéticas sugeridas para pacientes com DHGNA (OLIVEIRA et al., 2016).

4.2.5 Caracterização da microbiota fecal

As amostras de fezes foram coletadas pelos voluntários em frascos estéreis e mantidas refrigeradas por até 24h até serem levadas ao Laboratório de Ecologia e Biologia Molecular de Microorganismos da UFJF. As amostras fecais foram processadas para análise microbiológica por hibridização *In Situ* fluorescente (FISH). As amostras foram fixadas com paraformaldeído (concentração final 2%), e em cada amostra foi adicionada uma solução de Tween a 0,01%. Em seguida, as amostras foram sonicadas (Vibra Cell VCX 130PB, Sonics & Materials®) três vezes (gama 110,7 µm por 60 s). Após a sonicação, as amostras foram centrifugadas a 500 g durante 5 min. O sobrenadante foi removido e o conteúdo remanescente foi lavado duas vezes com água ultrapura. As três frações sobrenadantes foram colocadas em um mesmo frasco e agitadas vigorosamente. Alíquotas de cada amostra foram diluídas (100x) e filtradas em filtros de policarbonato (Nuclepore® - 0,2 µm) e armazenadas em um refrigerador até o processo de hibridização.

Posteriormente, as amostras foram submetidas ao protocolo FISH (MEDEIROS et al., 2014) para identificação e quantificação dos grupos microbianos de interesse. Uma sonda de controle negativo (5'CCTAGTAGACGCCGTCGAC-3'), que não possui especificidade para nenhum grupo bacteriano, também foi utilizada para avaliação da eficiência da hibridização. As sondas foram marcadas com o fluorocromo Cy3. A densidade dos microrganismos ($\times 10^8$ células g^{-1}) foi determinada por meio da contagem direta com ampliação de $100 \times$ usando um

microscópio de epifluorescência (Olympus® BX-60), equipado com o conjunto de filtros ópticos U-N41007, U-MWU2, U-MWB2 e U-MWG2.

4.2.6 Avaliação de supercrescimento bacteriano no intestino delgado

Os voluntários foram submetidos ao teste respiratório de hidrogênio (H₂) e metano (CH₄) expirados, para detecção de SBID. Para a realização do teste, os pacientes receberam orientações de preparo (APÊNDICE B), que incluíam: não usar antibiótico nas últimas 4 semanas antes do teste, suspender o uso de inibidores da bomba de prótons uma semana antes do teste, e na véspera evitar alimentos ricos em fibras. Os testes foram realizados no aparelho QuinTron BreathTracker™ Digital MicroLyzer, com o paciente em jejum de 10 horas. No dia do exame, o ar alveolar expirado foi coletado em sacos coletores específicos antes da ingestão do substrato de prova (15 ml de lactulose, 667mg / mL de xarope; seguida do consumo de 200 ml de água filtrada) no tempo 0' (em jejum), e após o uso da lactulose, nos tempos 15', 30', 45', 60', 90' e 120'. Foram considerados positivos para SBID elevações de H₂ ≥ 20 ppm e/ou de CH₄ ≥ 10 ppm, a partir da dosagem no tempo 0' até 90' (REZAIE et al., 2017).

4.2.7 Intervenção dietética

A intervenção dietética consistiu em prescrição de dieta individualizada mais orientação nutricional (grupo DIETA) ou somente em orientação nutricional (grupo CT) (APÊNDICE C). Para a elaboração da dieta individualizada considerou-se a história clínica, o estado nutricional, o estilo de vida, os hábitos alimentares e o cálculo das necessidades nutricionais de cada paciente.

O cálculo do gasto energético total (GET) foi realizado de acordo com as *Dietary Reference Intakes* (DRI) (INSTITUTE OF MEDICINE, 2005), sendo o GET médio dos grupos DIETA e ON de 2.276,3 ± 358,1 kcal e 2.269,9 ± 506,5 kcal por dia (p = 0,963), respectivamente. Pacientes eutróficos receberam dieta normocalórica para manutenção do peso corporal. Pacientes com sobrepeso ou obesidade receberam dieta hipocalórica, com déficit de 500 a 1.000 kcal por dia (média de 624,9 ± 94,8 kcal) em relação ao GET (OLIVEIRA et al., 2016). A média de calorias prescrita ao grupo DIETA foi de 1.651,3 ± 263,5 kcal. A distribuição calórica dos macronutrientes e a oferta de fibras dietéticas basearam-se nas recomendações dietéticas de Oliveira et al., 2016. As características da dieta

prescrita ao grupo DIETA estão descritas na Tabela 1. Além disso, a prescrição contemplou a redução ou exclusão de produtos alimentícios promotores da EHNA, como os ultraprocessados e ricos em carboidratos simples (BRASIL, 2014).

A adesão à dieta foi avaliada durante o acompanhamento nutricional mensal, por meio de Recordatório Alimentar de 24h e Registro Alimentar de 3 dias não consecutivos. Quando necessário, a dieta foi adaptada às recomendações preconizadas (OLIVEIRA et al., 2016), para melhorar a adesão do paciente ao tratamento proposto. Todos os pacientes que completaram os três meses do estudo apresentaram boa adesão à intervenção dietética e nenhum efeito adverso foi reportado.

Tabela 1. Características da prescrição dietética do grupo DIETA.

	Gramas/dia		% VET	
	Média	EPM	Média	EPM
Energia (kcal)				
Média	1.651,3			
EPM	58,8			
Carboidratos	198,4	7,3	47,4	0,8
Lipídeos	51,5	2,4	27,7	0,7
Proteínas	103,9	4,2	24,9	0,7
AGS	12,6	0,8	6,9	0,4
AGP	14,9	0,6	8,1	0,4
AGM	19,3	0,6	10,6	0,3
Fibras	30,3	1,0		

Dados apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Abreviações: AGM, ácidos graxos monoinsaturados; AGP, ácidos graxos polinsaturados; AGS, ácidos graxos saturados; VET, valor energético total.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por meio do software SPSS® (versão 20.0. *SPSS Inc.*, Estados Unidos da América). Testes paramétricos e não paramétricos foram utilizados de acordo com os testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e de homogeneidade de variâncias (Levene). No Artigo 1, as variáveis contínuas foram representadas em média e desvio padrão ou em mediana e intervalos interquartis (1° e 3° quartis), enquanto no Artigo 2 as variáveis contínuas foram descritas em média e erro padrão da média. As variáveis categóricas foram expressas como frequência absoluta (n) e relativa (%). No Artigo 1 foi utilizado Correlação de Spearman para avaliar relações bivariadas entre as variáveis. No Artigo 2 foi utilizado Teste T para amostras independentes ou U de Mann-Whitney para comparação, entre os grupos, das variáveis contínuas no basal e após intervenção. Para comparar, dentro do grupo, as variáveis contínuas antes e após intervenção foi utilizado o Teste T para amostras pareadas ou Wilcoxon. Variáveis categóricas foram comparadas pelo Teste Qui-Quadrado ou Teste Exato de Fisher (entre os grupos) e pelo Teste de McNemar (dentro do grupo). A análise de variância 2x4 (ANOVA 2 fatores), seguida do *post hoc* Sidak, foi utilizada para comparar as concentrações de H₂ e CH₄ entre o período basal e após intervenção dietética, ao longo do teste respiratório. Adotou-se como significativo $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Artigo 1: Association of fecal microbiota with clinical parameters and diet in nonalcoholic steatohepatitis (Autores: Fabiana de Faria Ghetti, Daiane Gonçalves Oliveira, Juliano Machado de Oliveira, Lincoln Eduardo Villela Vieira de Castro Ferreira, Dionéia Evangelista Cesar, Ana Paula Boroni Moreira).

(Microbial Pathogenesis: Under Review)

Abstract

Background: Gut microbiota appears to play an important role in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) pathogenesis. However, the knowledge about dysbiosis in NASH is still limited. **Aim:** To characterize and to associate fecal microbiota with clinical parameters and diet in NASH patients. **Methods:** A cross-sectional study was conducted with NASH patients. The groups were evaluated to hepatic histology, feces collection (fecal microbiota), blood collection (hepatic biochemistry, glycemic and lipid profile), anthropometry, percentage evaluation of body fat and dietary intake. Spearman's correlation analysis was used to assess relationships between fecal microbiota composition, clinical parameters and diet. **Results:** Thirty NASH patients were enrolled. The highest density of fecal microorganisms was Bacteroidetes (4.77×10^8 cells g^{-1}), which was correlated with aspartate aminotransferase (AST) ($r=0.477$; $p=0.008$) and carbohydrate intake ($r=0.418$; $p=0.021$). Other associations were observed: Archaea with blood total cholesterol ($r=0.483$; $p=0.007$); Acidobacteria with lobular inflammation ($r=0.412$; $p=0.024$) and triacylglycerol ($r=0.483$; $p=0.007$); Verrucomicrobiales with body mass index ($r=0.521$; $p=0.003$); Firmicutes with steatosis ($r= -0.377$; $p=0.040$) and Proteobacteria with ballooning ($r= -0.419$; $p=0.021$). The Acidobacteria was quantified for the first time in adult NASH [1.57 (1.01 ; 1.83×10^8 cells g^{-1})]. **Conclusions:** The highest density of fecal microorganisms in NASH patients was Bacteroidetes. The fecal microbiota was positively correlated with dyslipidemia, obesity, fat intake, PUFA, AST and lobular inflammation. Negative correlation was showed with carbohydrate intake and components of nonalcoholic fatty liver disease activity score. Acidobacteria, particularly, appears to play an important role in the NASH pathogenesis.

Keywords: Nonalcoholic Fatty Liver Disease; Fatty Liver; Dysbiosis; Microbiota

Introduction

Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is the most severe histological form of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) [1], characterized by the presence of hepatic steatosis and inflammation, associated with ballooning degeneration, with or without fibrosis [2]. NASH can progress to cirrhosis and liver failure and it is associated with an increased risk of development of hepatocellular carcinoma [3-5]. Obesity, diabetes mellitus and hypertriglyceridemia are the main risk factors for the development and progression of the disease [6]. Genetic and environmental factors (e.g., diet) also play a significant role in the etiology of NASH [7,8]. Recently, an innovative concept has been proposed that the gut microbiota is a critical component of NASH pathogenesis [9-11].

The involvement of the gut microbiota in NASH pathogenesis is complex and multifactorial [12,13]. The data from animal studies support the hypothesis that the altered gut microbiota (called 'disbiosis') may contribute to NASH via multiple mechanisms, including dysregulation of energy homeostasis [9,10], the ability to generate endogenous ethanol [14], altered choline and bile acid metabolism [15,16]. Also, disbiosis induces dysregulation of the gut endothelial barrier function and bacteria-derived toxins translocation, such as lipopolysaccharides (LPS) which may activate pro-inflammatory cytokine production in the liver macrophages, resulting in hepatocellular inflammation [11,17]. In human, study revealed a reduction of Bacteroidetes in NASH compared with the healthy and simple steatosis patients. A lower percentage of this phylum may facilitate the growth of other bacteria increasing the energy intake from dietary fat [18]. Another study indicated that the *Bacteroides* and *Prevotella* genus were significantly different in fecal samples of NASH patients compared with healthy controls [19]. The *Bacteroides* had a higher abundance and were independently associated with NASH, while proportions of *Prevotella* were lower in NASH patients [19].

Although NASH is associated with changes in the gut microbiota in animal studies, the knowledge about disbiosis in this population is still limited. Only a few studies with different techniques for gut microbiota evaluation are available in the literature [18-22]. Therefore, we conducted a cross-sectional study to characterize and to associate fecal microbiota with dietary intake, metabolic markers (glucose tolerance, lipid metabolism and hepatic function), anthropometric, body composition and disease severity in NASH subjects.

Methods

This cross-sectional study was conducted in the Gastroenterology/Hepatology Service of the University Hospital at the Federal University of Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil. This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. All procedures involving human subjects/patients were approved by the Ethical Committee of the Federal University of Juiz de Fora under protocol number 1.129.516. All patients gave informed written consent before participating to the study.

Subjects

Subjects were included for convenience from June 2015 to July 2017 and the inclusion criteria were NASH patients older than 18 years of age, of both genders. The diagnosis of NASH was made based on clinical, laboratory and liver biopsy, which are routine evaluations in the Gastroenterology/Hepatology Service. Liver biopsies were typically performed in patients with signs of fatty liver disease, excluding other liver diseases, and in the presence of persistently elevated alanine aminotransferase (ALT) and/or aspartate aminotransferase (AST) levels, greater than 1.5 times the maximum normal value in at least two measurements with a minimum interval of one month between them. These criteria are based on an evaluation protocol developed by the Brazilian Study Group of NAFLD of the Brazilian Society of Hepatology [23]. Patients were excluded if they had chronic hepatitis B or C infection, autoimmune diseases of the liver, HIV 1 or 2 infection, inflammatory bowel disease, concomitant steatosis-inducing drugs, excessive alcohol consumption (>30 g/day in men or >20 g/day in women), if they had been previously treated with laxatives, antibiotics or prebiotics/probiotics within the 2 months before inclusion in the study or if they were pregnant and lactating.

Liver histology

A pathologist blinded to clinical characteristics assessed liver histology. Steatosis, lobular inflammation, ballooning, and liver fibrosis were evaluated according to the NAFLD activity score [24]: steatosis (0-3), lobular inflammation (0-3), ballooning (0-2), and liver fibrosis (0-4). “Significant fibrosis” was defined as fibrosis stage $F \geq 2$ [19].

Laboratory assays

After 12 h-fasting, venous samples were taken for liver biochemistry, glucose, insulin and lipids. The blood was separated by centrifugation and analyzed immediately at the Laboratory of Clinical Analysis of the University Hospital at the Federal University of Juiz de Fora. AST, ALT, γ -glutamyltransferase (GGT), fasting blood glucose, total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL) and triacylglycerol (TAG) were analyzed through standard laboratory methods from a WIENER LAB, CT600i autoanalyzer. The fasting blood insulin was determined by the Architect autoanalyzer, model i1000SR. Low-density lipoprotein (LDL) was calculated according to Friedewald et al. [25]. The homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) was calculated according to Matthews et al [26].

The diagnosis of systemic arterial hypertension and type 2 diabetes were obtained from medical records. The presence of metabolic syndrome was defined according to the International Diabetes Federation criteria [27].

Nutritional and dietary assessment

Body weight, height, waist circumference and body composition were assessed in the fasting state by a single trained evaluator. Waist circumference was measured at the midpoint between the iliac crest and the last rib. Body Mass Index (BMI) was calculated by dividing weight in kilograms by squared height in meters [28]. Body fat was measured by bioimpedance (RJL Systems, Inc (USA) – Quantum II Model, serial n° Q4631IID), as previously described [29].

The usual diet was obtained through a quantitative food frequency questionnaire previously validated for the Brazilian population [30]. All food questionnaires were analyzed by the same nutritionist and daily intakes of energy and nutrients (carbohydrates, fibers, lipids, saturated and unsaturated fats, cholesterol, and proteins) were calculated by using computerized software Dietpro 5i (Agromídia, Viçosa, Brazil). The dietary intake was assessed according to the Dietary Recommendations [31].

Fecal microbiota composition

Subjects were asked to provide a fecal sample within 24 hours of collection; otherwise the material was kept at 4°C for up to 12 h to be brought to the laboratory. Fecal samples were processed for analysis by Fluorescent in situ Hybridization (FISH) to identify and quantify

eight microbial groups. The samples were fixed with paraformaldehyde (final concentration 2%), and to each sample, 0.01% Tween solution was added. Then, the samples were sonicated (Vibra Cell VCX 130PB, Sonics & Materials®) three times (range 110.7 μm per 60 s). After sonication, the samples were centrifuged at 500 g for 5 min. The supernatant was removed and the remaining contents were washed twice with ultrapure water. The three supernatant fractions were placed in the same bottle and shaken vigorously. Aliquots of each sample were diluted (100x) and filtered on polycarbonate filters (Nuclepore® - 0.2 μm) and stored in a refrigerator until the hybridization process.

Subsequently, the samples were subjected to FISH protocol [32] and oligonucleotide probes rRNA-targeted were used to identify sequences of bacterial and archaeal microorganisms (see Supplementary material, which describes the characteristics of the oligonucleotides probes for the identification of the microorganisms). A probe without any specificity (5'-CCTAGTGACGCCGTCGAC-3') was also used as a negative control in assessing the hybridization efficiency. All probes were labeled with the Cy3 fluorochrome. The density of microorganisms ($\times 10^8$ cells g^{-1}) was determined by direct counting at 100 \times magnification using an epifluorescence microscope (Olympus® BX-60) equipped with Chroma U-N41007, U-MWU2, U-MWB2 and U-MWG2 optical filter set.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with SPSS software, version 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Parametric and non-parametric tests were used based on normality testing (Shapiro-Wilk) and variance homogeneity (Levene) tests. A 5% level of significance was adopted. Data are shown as mean, standard deviation, median and first–third quartile. Categorical variables were expressed as relative (%) and absolute (n) frequencies. Spearman's correlation analysis was used to assess bivariate relationships between variables.

Results

Subjects characteristics

Thirty NASH patients were enrolled in this study. The characteristics of the patients are shown in Table 1. Twenty-five (50%) NASH patients had steatosis grade ≥ 2 , twenty-one (42%) had lobular inflammation grade 2 and fourteen (28%) had ballooning grade ≥ 2 .

Twenty (59%) patients had fibrosis, however, fibrosis stage ≥ 2 (significant fibrosis) was present only in 4 (12%). The median NAFLD activity score was 5 (4; 6). Sixteen (47%) patients were considered obese (BMI ≥ 30 kg/m²) and had systemic arterial hypertension. Eight (23.5%) patients had type 2 diabetes, however, analysis of HOMA-IR revealed that 28 (82%) patients had insulin resistance (≥ 2.5). Twenty-one (62%) patients had hypertriglyceridemia and the metabolic syndrome was diagnosed in 18 (53%).

Dietary intake

The dietary intake is summarized in Table 2. The average of protein, fiber, saturated and monounsaturated fatty acids (MFA) was below dietary recommendations.

Table 1. Characteristics of patients with nonalcoholic steatohepatitis

Characteristics	NASH patients (n = 30)
Age, years	48.6 \pm 10.3
Gender, n (%) male	17 (56.6)
BMI, kg/m ²	31.2 \pm 5.4
Body fat, %	31.0 (27.7; 39.2)
Waist circumference, cm	97.0 \pm 11.9
Glucose, mg/dL	98.5 (91.0; 114.5)
Insulin, μ U/mL	13.4 (10.5; 17.6)
HOMA-IR	3.2 (2.5; 5.1)
Total cholesterol, mg/dL	182.5 \pm 36.7
HDL, mg/dL	42.0 \pm 7.5
LDL, mg/dL	107.3 \pm 27.8
TAG, mg/dL	163.3 \pm 69.2
AST, U/L	41.5 (32.2; 55.0)
ALT, U/L	52.0 (38.0; 69.5)
GGT, U/L	50.0 (31.2; 83.7)

Data are represented as mean \pm SD (standard deviation) or median (interquartile range). Abbreviation: ALT, Alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; GGT, γ -glutamyltransferase; HDL, high-density lipoprotein, HOMAR-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; LDL, low-density lipoprotein; TAG, triacylglycerol.

Table 2. Dietary intake of patients with non-alcoholic steatohepatitis.

Dietary intake	NASH patients (n = 30)
Total energy, kcal/day	2456.6 ± 684.5
Carbohydrate, g/day	283.5 (246.9; 409.3)
%	52.3 (44.8; 56.6)
Fat, g/day	86.7 ± 29.6
%	30.6 (26.3; 33.6)
Protein, g/day	96.4 (77.4; 123.3)
%	16.3 (14.3; 19.4)
Cholesterol, mg/day	255.5 (180.7; 346.8)
Fiber, g/day	19.8 ± 5.6
MUFA, g/day	18.5 (10.5; 25.4)
%	6.5 (4.7; 9.1)
PUFA, g/day	26.9 (19.4; 33.2)
%	9.1 (8.3; 11.4)
SFA, g/day	15.0 (9.3; 24.4)
%	5.5 (3.6; 7.5)

Data are represented as mean ± SD (standard deviation) or median (interquartile range). Abbreviation: MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids; SFA, saturated fatty acids.

Microbiota analysis of stools

The median density of total microorganisms was 11.46 (9.17; 13.30) x 10⁸ cells g⁻¹ in NASH. Bacteroidetes was the group with the highest number of fecal microorganisms, followed by Firmicutes and Acidobacteria phylum (Table 3).

Table 3. Density of microorganisms in patients with non-alcoholic steatohepatitis by the analysis of stools.

Target microbial group	NASH patients (n = 30) x 10 ⁸ cells g ⁻¹
Archaea	0.98 (0.56; 1.57)
Bacteroidetes	4.77 (3.61; 5.81)
Firmicutes	1.63 (1.13; 1.94)
Acidobacteria	1.57 (1.01; 1.83)
Actinobacteria	1.53 (1.05; 2.12)
Proteobacteria	0.94 (0.64; 1.42)
Verrucomicrobiales	1.53 (1.08; 1.82)

Data are represented as median (interquartile range).

Correlation between fecal microbiota, clinical parameters and dietary intake in NASH patients

Archaea domain was positively correlated with blood total cholesterol, LDL and PUFA intake. Bacteroidetes phylum was negatively correlated with NAFLD activity score and carbohydrate intake, but positively correlated with AST and PUFA intake. Firmicutes phylum was negatively correlated with steatosis and NAFLD activity score, but positively correlated with AST. Actinobacteria phylum was negatively correlated with steatosis, ballooning, NAFLD activity score, but positively correlated with LDL. Acidobacteria phylum was positively correlated with lobular inflammation, total cholesterol, LDL and TAG levels. Proteobacteria phylum was negatively correlated with ballooning and NAFLD activity score, but positively correlated with AST and PUFA intake. Verrucomicrobiales order was positively correlated with body mass index, waist circumference, body fat and fat intake. The relationships between fecal microbiota, clinical markers and dietary intake are shown in Table 4.

Table 4. Correlations (r) between fecal microbiota, clinical markers and dietary intake in patients with non-alcoholic steatohepatitis.

Parameters	r-value	p-value
Archaea		
Total cholesterol, mg/dL	0.483	0.007
LDL, mg/dL	0.450	0.013
PUFA, g/day	0.433	0.017
PUFA, %	0.541	0.002
Bacteroidetes		
NAFLD activity score, 0-8	-0.393	0.032
AST, U/L	0.477	0.008
Carbohydrate, g/day	-0.418	0.021
PUFA, g/day	0.391	0.033
PUFA, %	0.514	0.004
Firmicutes		
Steatosis, 0-3	-0.377	0.040
NAFLD activity score, 0-8	-0.370	0.044
AST, U/L	0.362	0.050
Actinobacteria		
Steatosis, 0-3	-0.462	0.010
Ballooning, 0-2	-0.380	0.039
NAFLD activity score, 0-8	-0.548	0.002
LDL, mg/dL	0.383	0.037
Acidobacteria		
Lobular inflammation, 0-3	0.412	0.024
Total cholesterol, mg/dL	0.683	<0.001
TAG, mg/dL	0.483	0.007
LDL, mg/dL	0.568	0.001
Proteobacteria		
Ballooning, 0-2	-0.419	0.021
NAFLD activity score, 0-8	-0.464	0.010
AST, U/L	0.421	0.021
PUFA, g/day	0.405	0.026
PUFA, %	0.492	0.006
Verrucomicrobiales		
BMI, kg/m ²	0.484	0.007
Waist circumference, cm	0.454	0.012
Body fat, %	0.425	0.019
Fat, g/day	0.395	0.031

Abbreviation: AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; LDL, low-density lipoprotein; TAG, triacylglycerol; MUFA, monounsaturated fatty acids; NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease; PUFA, polyunsaturated fatty acids; SFA, saturated fatty acids.

Spearman's correlation analysis was used to assess bivariate relationships between variables.

Discussion

It has been recognized in animal studies that disbiosis play an important role in NASH pathogenesis [9-11], but data about gut microbiota in these patients remain poorly documented. Similar to previous studies [18,19], we showed that fecal microbiota composition, clinical markers and dietary intake are altered in NASH patients. Therefore, we investigated the association of fecal microbiota with dietary intake, metabolic markers (glucose tolerance, lipid metabolism and hepatic function), anthropometric, body composition and NASH severity. The specific relationships elucidated by this study suggest that the gut microbiota is probably involved in modulating risk factors for NASH development.

The density of three groups of microorganisms (Archea, Actinobacteria and Acidobacteria), which could be accounted by the FISH technique, was positively correlated with dyslipidemia. However, only the Acidobacteria was related with hypertriglyceridemia, which is the main serum lipidic change in NASH. Our study seems to be the first to identify and quantify the Acidobacteria group in adult NASH patients. The first sequenced genomes of Acidobacteria strains became available in 2009 [33]. Acidobacteria known to inhabit soil globally [34]; however, it is not consistently reported in gut microbiome data. There is evidence that the class Chloracidobacteria, which belongs to phylum Acidobacteria, was increased in prediabetes subjects [35]. Although the metabolism of Acidobacteria is still not understood, it is possible that the Acidobacteria increases TAG levels by reduction of the expression of fasting-induced adipose factor (FIAF), in the gut. FIAF is a potent inhibitor of the enzyme lipoprotein lipase, which mediates cellular uptake of triglycerides [10]. Inhibition of FIAF increases the activity of the lipoprotein lipase, leading to increased hepatic uptake of free fatty acids [11], resulting in high synthesis of very-low-density lipoproteins (VLDL) [36]. It is still possible that bacteria of this phylum alter bile acid metabolism and its regulated signaling pathways, such as farnesoid X receptor (FXR). FXR, which is highly expressed in hepatocytes and enterocytes [37], acts on the control of hepatic de novo lipogenesis in the liver and exportation of TAG by VLDL [38]. Studies evaluating the mechanisms mentioned above would be of great interest to test this hypothesis. Besides that, several acidobacterial genomes have been shown to contain genes encoding for the degradation of different polysaccharides [39]. Enzymes encoded by gut microbiota genome extract energy from food, resulting in hepatic lipogenesis [40]. Further studies are necessary to elucidate the role of Acidobacteria phylum in NASH pathogenesis.

We also showed correlation between fecal microbiota composition and obesity markers. Verrucomicrobiales order (from Verrucomicrobia phylum) was positively correlated with body fat, BMI and waist circumference, which were increased in the NASH group. However, it has been reported that the abundance of *Akkermansia muciniphila*, a Gram-negative bacterium of the order Verrucomicrobiales, is inversely correlated with obesity [41,42]. Thus, we suggest that in NASH patients the density of *A. muciniphila* can be decreased and other species Gram-negative in this group may be associated with mechanisms that result in increased insulin resistance and consequently increased adiposity and obesity. Indeed, recent experiment showed positive correlation between Verrucomicrobia and serum LPS in obese rats fed a high fat diet (HFD) [43]. LPS is an endotoxin present on the cell surface of gram-negative bacteria [44]. The relationship between obesity and metabolic endotoxemia (increased serum LPS) has been confirmed in many animal studies [43,45-47]. Several studies also support the link between LPS-endotoxemia and the development of NASH [48-51]. An animal study demonstrated that chronic infusion of LPS caused endotoxemia, hepatic steatosis, and changed gut microbiota in HFD mice [48]. Genetically obese mice exhibit increased sensitivity to endotoxin hepatotoxicity, quickly developing steatohepatitis after exposure to low doses of LPS [49]. In human studies, NASH patients had higher levels of endotoxin compared to healthy individuals [50,51].

There are literature supporting that an increase circulatory LPS levels may be due to high fat intake [52,53]. Two hypothesis have been made to explain the mechanism: LPS is taken up with dietary fats in chylomicrons [54] or LPS reaches the circulation because the gut is more permeable in obese mice [48]. LPS molecules bind to Toll-like receptor 4 (TLR4), which activates proinflammatory signalling cascades [48]. HFD can induce changes in the composition of gut microbiota, including the increasing in proportion of Gram-negative bacteria [48], that can favor the transfer of LPS into the circulatory system [48,55]. The effects of dietary fat on the human gut microbiota are still poorly understood. David et al. [56] showed that HFD increased the abundance of *Bacteroides* genus (from Bacteroidetes phylum) and reduced Firmicutes phylum in healthy subjects. Although no correlation was found between fat intake, Bacteroidetes and Firmicutes, we showed positive correlation with Verrucomicrobiales. Thus, the high fat intake may be one of the factors that explain the changes in the fecal microbiota in NASH patients.

The type of fat can also influence intestinal health. Animal experiments found that HFD containing SFA [57] or HFD rich in n-6 PUFA [58] depleted microbes from the Bacteroidetes and Firmicutes phyla and increased the ratio of Firmicutes:Bacteroidetes. Our

results showed in patients with NASH low energy percentage of SFA intake in relation to recommendations [31] and no correlation between this type of fat and fecal microbiota. On the other hand, PUFA intake was high in relation to recommendations [31] and it was positively correlated with Archaea, Bacteroidetes and Proteobacteria. Some Archaea [59,60], Bacteroidetes [61] and Proteobacteria species [62] appears to be associated with an important pro-inflammatory effect and increased host fat. Similarly, a high-n-6, low-n-3 PUFA diet (typical in 'Western' diets) has been linked to several pro-inflammatory conditions such as insulin resistance [63] and weight gain associated with disbiosis [58]. In line with these findings [58,61-63], the BMI, glucose, insulin and HOMA-IR were higher in NASH patients than in controls, suggesting an association between the fecal microbiota and the risk factors for NASH development.

Another relevant aspect of the diet was the negative correlation between carbohydrate intake and Bacteroidetes. Mouzaki et al. [18] did not find difference in the percentage of carbohydrate between NASH and controls, but in NAFLD patients the mean intake of carbohydrate was increased, mainly the intake of sucrose, fructose, and glucose [64]. It has been proposed that intake of sugar, particularly of fructose from industrialized products, may be a major stimulus for hepatic de novo lipogenesis and more likely to directly contribute to NAFLD than dietary fat intake [65]. The consumption of fructose also promoted small intestinal bacterial overgrowth, increased intestinal permeability and activation of Kupffer cells, causing hepatic injury [66,67]. Thus, the replacement of fructose, and other simple carbohydrates, with nondigestible carbohydrates (dietary fiber) can avoid the consequences of disbiosis in the liver histology, considering that the ingestion of fibers by the patients was below the recommendations [31].

Animal data have demonstrated the direct influence of disbiosis on each of the NAFLD activity score components: steatosis [68], inflammation [11], ballooning [69] and fibrosis [70]. Recently, Boursier et al. [19], showed in NASH patients association between gut disbiosis and NAFLD severity. They identified *Ruminococcus* genus (from Firmicutes phylum) as independent, positively correlated with significant fibrosis (fibrosis stage ≥ 2) [19]. Our data suggest negative correlation between fecal microbiota (Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria and Proteobacteria), steatosis, ballooning and NAFLD activity score. Only Acidobacteria was positively correlated with lobular inflammation and no correlation was found between fecal microbiota and fibrosis. A possible explanation for these findings is the high intra-individual variability in gut microbiota. In addition, our analyzes included large microbial groups, which are quite heterogeneous, including both beneficial and

deleterious bacteria. Thus, future studies should consider the analysis with specific bacteria. Despite the negative correlation with NAFLD activity score, we observed positive correlation between fecal microbiota (Bacteroidetes, Firmicutes and Proteobacteria) and AST level, which is an indicator of liver damage [71]. Even though we cannot yet assign cause and effect, our results suggest that large groups of the microbial community are associated with clinical parameters and dietary intake in NASH patients. A strong point of our study was the selection of NASH patients well characterized both clinically and histologically. Liver biopsy evaluation is the gold standard for the detection of NASH and is considered very useful in differentiating NASH from other diseases [72,73].

Despite the small sample size, this is the first work in the literature evaluating the fecal microbiota of NASH patients, using the FISH technique. This technique can be performed directly on the stool sample [74] and allows the visualization, identification, and quantification of individual microbial cells. It is considered a quick and objective technique for direct quantification of microorganisms [75], often in the context of studying the differential abundance of a small number of organisms [74]. Through the FISH technique we showed that the highest density of fecal microorganisms in NASH patients was the most Bacteroidaceae family, that is part of the Bacteroidetes phylum, followed by the most Flavobacteria class and Firmicutes phylum. Moreover, the lowest microorganisms density was the Proteobacteria phylum. One study [21] using 16s rRNA pyrosequencing technique has observed an increase in Bacteroidetes and decrease in Firmicutes in NASH children, compared to the healthy controls. Also, the authors [21] showed that Proteobacteria phylum was higher in NASH, when compared to healthy controls and obese patients. Instead, Mouzaki et al. [18] using the qRT-PCR technique showed a low percentage of Bacteroidetes (Bacteroidetes to total bacteria counts) and no differences in Firmicutes, in the stool samples of NASH adult patients. The variability of techniques, exclusion of all taxa with an abundance below 1% and profile of subjects (adults vs. children) may explain, in part, why there is still no consensus in the literature about which bacterial groups are increased or reduced in the gut of NASH patients, compared to no-NASH patients [12]. Because FISH is unable to identify unknown species [74], a combination of FISH with metagenomic approaches would provide assessment of microbial diversity in healthy versus NASH patients.

In conclusion, our study revealed that the highest density of fecal microorganisms in NASH patients was represented by bacteria from the Bacteroidetes phylum. In addition, the Acidobacteria phylum was identified and quantified for the first time in adult NASH patients, and this bacteria group appears to play an important role in the pathogenesis of the disease.

Overall, the fecal microbiota was positively correlated with dyslipidemia, obesity, total fat intake, PUFA, AST and lobular inflammation. On the other hand, negative correlation was showed with carbohydrate intake, steatosis, ballooning and NAFLD activity score. These findings suggest that the gut microbiota is probably involved in modulating risk factors for NASH development and liver inflammation. Furthermore, the correlations between fecal microbiota, clinical parameters and dietary intake indicate that the microbiome may be a target therapy of NASH. The evidence of correlation between gut microbiota, steatosis, ballooning and NAFLD activity score requires further studies to understand the causative role of specific bacteria in the pathogenesis of NASH.

References

1. Liu W, Baker RD, Bhatia T, Zhu L, Baker SS. Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Cell Mol Life Sc.* 2016;73(10):1969-1987.
2. Tijera FH, Servín-Caamaño AI. Pathophysiological mechanisms involved in nonalcoholic steatohepatitis and novel potential therapeutic targets. *World J Hepatol* 2015;7(10):1297-1301.
3. Ekstedt M, Franzén LE, Mathiesen UL, et al. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology* 2006;44(4):865–873.
4. Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology* 1994;107(4):1103–1109.
5. White DL, Kanwal F, El-Serag HB. Association between nonalcoholic fatty liver disease and risk for hepatocellular cancer, based on systematic review. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012;10(12):1342–1359.
6. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology* 2005;42:44-52.
7. Willner IR, Walters B, Patil SR, Reuben A, Morelli J, Riely CA. Ninety patients with nonalcoholic steatohepatitis: insulin resistance, familial tendency, and severity of disease. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2957–2961.
8. Solga S, Alkhuraishe AR, Clark JM, et al. Dietary composition and nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci* 2004;49:1578-1583.
9. Jumpertz R, Le DS, Turnbaugh PJ, 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.

10. Backhed F, Ding H, Wang T, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci* 2004;101(4):15718-15723.
11. Csak T, Ganz M, Pespisa J, Kodys K, Dolganiuc A, Szabo G. Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells. *Hepatology* 2011;54(1):133-144.
12. de Faria Ghetti F, Oliveira DG, de Oliveira JM, de Castro Ferreira LEVV, Cesar DE, Moreira APB. Influence of gut microbiota on the development and progression of nonalcoholic steatohepatitis. *Eur J Nutr* 2017;DOI 10.1007/s00394-017-1524-x.
13. Brandl K, Schnabl B. Intestinal microbiota and nonalcoholic steatohepatitis. *Curr Opin Gastroenterol* 2017;33:128–133.
14. Nair S, Cope K, Risby TH, Diehl AM. Obesity and female gender increase breath ethanol concentration: potential implications for the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2001;96(4):1200–1204.
15. Chen Y-m, Liu Y, Zhou R-f, et al. Associations of gut-flora-dependent metabolite trimethylamine-N-oxide, betaine and choline with nonalcoholic fatty liver disease in adults. *Sci Rep* 2016;6:19076.
16. Sayin SI, Wahlström A, Felin J, et al. Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of taurobeta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist. *Cell Metab* 2013;17:225–235.
17. Ruiz AG, Casafont F, Crespo J, et al. Lipopolysaccharidebinding protein plasma levels in liver TNF-alpha gene expression. in obese patients: evidence for the potential role of endotoxin in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Obes Surg* 2007;17(10):1374–1380.
18. Mouzaki M, Comelli EM, Arendt BM. Intestinal microbiota in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2013;58(1):120-127.
19. Boursier J, Mueller O, Barret M, et al. The severity of nonalcoholic fatty liver disease is associated with gut disbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota. *Hepatology* 2016;63(3):764-775.
20. Wong VW-S, Tse C-H, Lam TT-Y, et al. Molecular characterization of the fecal microbiota in patients with nonalcoholic steatohepatitis—a longitudinal study. *PLoS One* 2013;8(4):e62885.
21. Zhu L, Baker SS, Gill C, et al. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology* 2013;57(2):601–609.

22. Del Chierico F, Nobili V, Vernocchi P, et al. Gut microbiota profiling of pediatric nonalcoholic fatty liver disease and obese patients unveiled by an integrated meta-omics-based approach. *Hepatology* 2017;65:451-464.
23. Cotrim HP, Parise ER, Oliveira CPMS, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in Brazil. Clinical and histological profile. *Annals of Hepatology* 2011;10(1):33-37.
24. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;41(6):1313-1321.
25. 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;18:499-502.
26. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28:412-419.
27. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 2009;120:1640-1645.
28. Department of Nutrition for Health and Development, WHO. WHO Global Database on Body Mass Index (BMI): An Interactive Surveillance Tool for Monitoring Nutrition Transition. *Public Health Nutrition* 2006;9:658-660.
29. Kyle UG, Bosaeus I, De Lorenzo AD, et al. Bioelectrical impedance analysis—part I: review of principles and methods. *Clin Nutr* 2004;23:1226–1243.
30. Ribeiro AC, Sávio KEO, Rodrigues MLCF, Costa THM, Schmitz BAS. Validação de um questionário de frequência de consumo alimentar para população adulta. *Rev Nutr* 2006;19(5):553-562.
31. Oliveira CP, de Lima Sanches P, de Abreu-Silva EO, et al. Nutrition and Physical Activity in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Diabetes Res*. 2016;4597246.
32. Medeiros JD, Araújo LX, Silva VL, et al. Characterization of the microbial community in a lotic environment to assess the effect of pollution on nitrifying and potentially pathogenic bacteria. *Braz J Biol* 2014;74:612-622.
33. Ward NL, Challacombe JF, Janssen PH, et al. Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into the life styles of these microorganisms in soils. *Appl. Environ. Microbiol* 2009;75:2046–2056.

34. Quaiser A, Ochsenreiter T, Lanz C, et al. Acidobacteria form a coherent but highly diverse group within the bacterial domain: evidence from environmental genomics. *Mol Microbiol* 2003;50(2):563–575.
35. Lambeth SM, Carson T, Lowe J, et al. Composition, Diversity and Abundance of Gut Microbiome in Prediabetes and Type 2 Diabetes. *J Diabetes Obes* 2015;26;2(3):1–7.
36. Velagapudi VR, Hezaveh R, Reigstad CS, et al. The gut microbiota modulates host energy and lipid metabolism in mice. *J Lipid Res* 2010;51:1101–1112.
37. Amato KR, Yeoman CJ, Cerda G, et al. Variable responses of human and non-human primate gut microbiomes to a Western diet. *Microbiome* 2015;3:53. doi:10.1186/s40168-015-0120-7.
38. Claudel T, Staels B, Kuipers F. The farnesoid X receptor: a molecular link between bile acid and lipid and glucose metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2020–2031.
39. Kielak AM, Barreto CC, Kowalchuk GA, Van Veen JA, Kuramae EE. The ecology of acidobacteria: moving beyond genes and genomes. *Front Microbiol* 2016;7:744.
40. Benhamed F, Denechaud FD, Lemoine M, et al. The lipogenic transcription factor ChREBP dissociates hepatic steatosis from insulin resistance in mice and humans. *J Clin Investig* 2012;122(6):2176–2194.
41. Everard A, Belzer C, Geurts L, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110(22):9066–9071.
42. Plovier H, Everard A, Druart C, et al. A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nat Med* 2017;23:107–113.
43. Guerville M, Leroy A, Siquin A, Laugerette F, Michalski MC, Boudry G. Western-diet consumption induces alteration of barrier function mechanisms in the 2 ileum, that correlates with metabolic endotoxemia in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2017;313(2):107-120.
44. Caesar R, Fåk F, Bäckhed F. Effects of gut microbiota on obesity and atherosclerosis via modulation of inflammation and lipid metabolism. *J Intern Med* 2010;268(4):320-328.
45. Brun P, Castagliuolo I, Di Leo V, et al. Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;292(2):518-525.

46. Creely SJ, McTernan PG, Kusminski CM, et al. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human 561 adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;292(3):740-747.
47. de La Serre CB, Ellis CL, Lee J, Hartman AL, Rutledge JC, Raybould HE. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010;299(2):440-448.
48. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007;56(7):1761-1772.
49. Yang SQ, Lin HZ, Lane MD, Clemens M, Diehl AM. Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:2557–2562.
50. Thuy S, Ladurner R, Volynets V, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in humans is associated with increased plasma endotoxin and plasminogen activator inhibitor 1 concentrations and with fructose intake. *J Nutr* 2008;138(8):1452–1455.
51. Harte AL, da Silva NF, Creely SJ, et al. Elevated endotoxin levels in nonalcoholic fatty liver disease. *J Inflamm* 2010;7:15.
52. Erridge C, Attina T, Spickett CM, Webb DJ. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *Am J Clin Nutr* 2007;86(5):1286–1292.
53. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 2008;57:1470–1481.
54. Ghoshal S, Witta J, Zhong J, de Villiers W, Eckhardt E. Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides. *J Lipid Res* 2009;50, 90–97.
55. Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* 2007;50, 2374–2383.
56. David LA, Maurice CF, Carmody RN, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 2014;23; 505(7484): 559–563.
57. de Wit N, Derrien M, Bosch-Vermeulen H, et al. Saturated fat stimulates obesity and hepatic steatosis and affects gut microbiota composition by an enhanced overflow of dietary fat to the distal intestine. *Am J Gastrointest Liver Physiol* 2012;303:589–599.
58. Ghosh S, Molcan E, Decoffe D, Dai C, Gibson DL. Diets rich in n-6 PUFA induce intestinal microbial dysbiosis in aged mice. *Br J Nutr* 2013;110(3):515–523.

59. Bang C, Vierbuchen T, Gutschmann T, Heine H, Schmitz RA. Immunogenic properties of the human gut-associated archaeon *Methanomassiliicoccus luminyensis* and its susceptibility to antimicrobial peptides. *PLoS ONE* 2017;12(10):e0185919.
60. Samuel BS, Gordon JI. A humanized gnotobiotic mouse model of host-archaeal-bacterial mutualism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:10011-10016.
61. Xie G, Wang X, Liu P et al. Distinctly altered gut microbiota in the progression of liver Disease. *Oncotarget* 2016;7(15):19355-66. doi: 10.18632/oncotarget.8466.
62. De Minicis S, Rychlicki C, Agostinelli L et al. Dysbiosis Contributes to Fibrogenesis in the Course of Chronic Liver Injury in Mice. *Hepatology* 2014;59:1738-1749.
63. Canete R, Gil-Campos M, Aguilera CM. Development of insulin resistance and its relation to diet in the obese child. *Eur J Nutr* 2007; 46:181–187.
64. 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;57:1932–1941.
65. Chung M, Ma J, Patel K, Berger S, Lau J, Lichtenstein AH. Fructose, high-fructose corn syrup, sucrose, and nonalcoholic fatty liver disease or indexes of liver health: a systematic review and metaanalysis. *Am J Clin Nutr* 2014;100:833-49.
66. Spruss A, Kanuri G, Wagnerberger S, Haub S, Bischoff SC, Bergheim I. Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Hepatology* 2009;50(4):1094–1104.
67. Wagnerberger S, Spruss A, Kanuri G, Volynets V, Stahl C, Bischoff SC, et al. Toll-like receptors 1–9 are elevated in livers with fructose-induced hepatic steatosis. *Br. J. Nutr* 2012;107(12):1727–1738.
68. Le Roy T, Llopis M, Lepage P, et al. Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Gut* 2013;62:1787-1794.
69. Rahman K, Desai C, Iyer SS, et al. Loss of junctional adhesion molecule a promotes severe steatohepatitis in mice on a diet high in saturated fat, fructose, and cholesterol. *Gastroenterology* 2016;151(4): 733–746.e12.
70. De Minicis S, Rychlicki C, Agostinelli L, et al. Dysbiosis contributes to fibrogenesis in the course of chronic liver injury. *Hepatology* 2014;59:1738-1749.
71. Zhang D, Hao X, Xu L, Cui J, Xue L, Tian Z. Intestinal flora imbalance promotes alcohol-induced liver fibrosis by the TGF β /smad signaling pathway in mice. *Oncology Letters* 2017;14:4511-4516.

72. Sumida Y, Nakajima A, Itoh Y. Limitations of liver biopsy and non-invasive diagnostic tests for the diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 2014;20:475-485.
73. Stinton LM, Loomba R. Recommendations for liver biopsy evaluation in non-alcoholic fatty liver disease. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2014;60(1):5-13.
74. Fraher MH, O'Toole PW, Quigley EMM. Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012;9(6):312–322.
75. Amann R, Fuchs BM. Single-cell identification by improved FISH. *Nat Rev Microbiol* 2008;6(5):339-348.

Supplementary material

Table 1. Oligonucleotide probes used for microbial quantification by fluorescence in situ hybridization

Probe	Target microbial group	Sequence (5'-3')	FA*	NaCl**	Reference
ARCH 915	Archaea domain	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	20	225	1
LGC 354	Firmicutes phylum	TGGAAGATTCCCTACTGC	35	80	2
A		CGGAAGATTCCCTACTGC			
LGC 354		CCGAAGATTCCCTACTGC			
B					
LGC 354					
C					
HCG 236	Actinobacteria phylum	AACAAGCTGATAGGCCGC	30	112	3
ACIDO	Acidobacteria phylum	TAATCDGCCGCGAMCYCCT	35	80	4
228					
ALF 968	Alpha-proteobacteria class	GGTAAGGTTCTGCGTTT	30	112	5
BET 42 a	Beta-proteobacteria class	GCCTTCCCACATCGTTT	30	112	6
GAM 42 a	Gamma-proteobacteria class	GCCTTCCACATCGTTT	30	112	6
EPSY 549	Epsilon-proteobacteria class	CAGTGATTCCGAGTAACG	30	112	7
EUB 338	Verrucomicrobiales order	GCTGCCACCCGTAGGTGT	30	112	8
III					
	Bacteroidetes phylum				
BAC 303	Most Bacteroidaceae and Prevotellaceae, some Porphyromonadaceae families	CCAATGTGGGGGACC	40	56	9
CF 319 a	Most Flavobacteria, some Bacteroidetes, some Sphingobacteria	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	35	80	9

FA: formamide concentration in hybridization buffer.

** Sodium chloride concentration in washing buffer.

References

1. Stahl DA, Amann R. Development and application of nucleic acid probes. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons Ltd., New York; 1991:205-248.
2. Meier H, Amann R, Ludwig W, et al. Specific oligonucleotide probes for in situ detection of a major group of gram-positive bacteria with low DNA G+C content. *Syst Appl Microbiol* 1999;22:186-196.
3. Erhart R, Bradford D, Seviour RJ, et al. Development and use of fluorescent in situ hybridization probes for the detection and identification of "Microthrix parvicella" in activated sludge. *Syst Appl Microbiol* 1997;20:310–318.
4. Kleinstuber S, Müller FD, Chatzinotas A, et al. Diversity and in situ quantification of Acidobacteria subdivision 1 in an acidic mining lake. *FEMS Microbiol Ecol* 2008;63:107-117.
5. Neef A. Anwendung der in situ Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populationsanalyse in komplexen mikrobiellen Biozosen. Doctoral Thesis, Technische Universität, München. 1997.
6. Manz W, Amann R, Ludwig W, et al. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Syst Appl Microbiol* 1992;15:593–600.
7. Lin X, Wakenham SG, Putnam IF, et al. Comparison of vertical distributions of prokaryotic assemblages in the anoxic Cariaco Basin and Black Sea by use of fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:2679-2690.
8. Daims H, Nielsen JL, Nielsen PH, et al. In situ characterization of Nitrospira-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:5273-5284.

5.2 Artigo 2: Effects of dietary intervention on gut microbiota and metabolic-nutritional profile of outpatients with non-alcoholic steatohepatitis: a randomized clinical trial

(Autores: Fabiana de Faria Ghetti, Daiane Gonçalves Oliveira, Juliano Machado de Oliveira, Lincoln Eduardo Villela Vieira de Castro Ferreira, Dionéia Evangelista Cesar, Ana Paula Boroni Moreira).

(British Journal of Nutrition: Under Review)

Abstract

Modulation of the gut microbiota, through diet, emerges as a therapeutic possibility to improve health. The objective was to compare the impact of three months of intervention with prescription of individualized diet and nutritional orientation versus nutritional orientation in the gut microbiota and metabolic-nutritional profile of outpatients with non-alcoholic steatohepatitis (NASH). It was a parallel randomized clinical trial with 40 NASH outpatients (49.48 ± 10.3 years), allocated in two groups: DIET group ($n=20$), who received diet ($1.651.34 \pm 263.25$ kcal; 47% carbohydrates, 28% lipids, 25% proteins, 30 g fibers) and nutritional orientation, and control group (CT, $n = 20$), which received only nutritional orientation. The DIET group, in relation to baseline, presented a reduction in body weight ($p<0.001$), body mass index-BMI ($p<0.001$), waist circumference ($p=0.001$), percentage of body fat ($p=0.002$), serum aspartate aminotransferase ($p<0.001$), alanine aminotransferase ($p<0.001$), γ -glutamyltransferase ($p=0.001$), glycemia ($p=0.003$), homeostasis model assessment of insulin resistance ($p=0.017$), total cholesterol ($p=0.014$), and triacylglycerols ($p=0.008$), whereas the CT group did not present alterations. After intervention, the small intestinal bacterial overgrowth frequency was 30% in the DIET group and 45% in the CT group ($p = 0.327$). In the DIET group, an increase in the density of total microorganisms ($3.76 \pm 7.17 \times 10^8$ cells g^{-1} ; $p=0.048$) was detected, while the CT group reduced Bacteroidetes ($-0.77 \pm 2.01 \times 10^8$ cells g^{-1} , $p=0.044$) and Verrucomicrobiales ($-0.46 \pm 0.75 \times 10^8$ cells g^{-1} ; $p=0.022$). The results suggest that exclusively dietary modifications contribute to health promotion in NASH outpatients and should be the basis of nutritional treatment for this condition.

Keywords: Non-alcoholic fatty liver disease. Fatty liver. Microbiota. Dysbiosis. .

Introduction

Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is defined as the presence of a least 5% hepatic steatosis and inflammation with hepatocyte injury (e.g., ballooning), with or without fibrosis⁽¹⁾. While the prevalence of NASH ranges from 2% to 5% in the general population^(2,3), approximately 70% of morbid obese individuals are affected by this condition⁽⁴⁾. Although in most cases it does not cause symptoms, NASH increases the risk of cirrhosis, hepatic insufficiency and hepatocellular carcinoma⁽⁵⁻⁸⁾.

The exact cause of NASH is still unclear, but studies have suggested the role of the gut microbiota in the pathogenesis of this disease⁽⁹⁻¹¹⁾. Changes in the gut microbiota (called 'dysbiosis') have consequences on energetic homeostasis, resulting in obesity and hepatic steatosis⁽¹²⁻¹⁴⁾. Dysbiosis is also responsible for increased intestinal permeability and circulating lipopolysaccharide (LPS) concentration, causing metabolic endotoxemia^(15,16). Moreover, dysbiosis can alter the metabolism of choline⁽¹⁷⁾ and bile acids⁽¹⁸⁾ in NASH and increase endogenous ethanol production⁽¹⁹⁾. However, few studies have evaluated the gut microbiota in NASH patients. Some findings suggest that NASH patients present a higher prevalence of small intestinal bacterial overgrowth (SIBO)^(20,21). In addition, the composition of fecal microbiota is different in this population when compared to healthy individuals⁽²²⁻²⁴⁾.

There is evidence that the amount of energy and the proportion of the three macronutrients in the diet have the potential to modulate the gut microbiota^(25,26). In addition, in obesity it was shown that the consumption of a hypocaloric diet decreased the circulating levels of LPS⁽²⁶⁾. Regardless of calories, qualitative changes in diet have the potential to exert beneficial effects on the gut microbiota⁽²⁷⁾. However, to date, no study has investigated the effects of exclusively dietary modification on the gut microbiota of NASH outpatients. Thus, the objective of this study was to compare the effects of the intervention with diet and nutritional orientation versus only nutritional orientation in the gut microbiota and metabolic-nutritional profile of NASH outpatients.

Methods

Population and experimental design

Research outpatients were recruited from the Gastroenterology/Hepatology Service of the University Hospital at the Federal University of Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil. Outpatients were consecutively included from July 2015 to September 2017, and the inclusion criteria were: age ≥ 18 years, of both genders and previous diagnosis of NASH. The diagnosis of NASH was based on clinical and laboratory profiles and liver biopsy, which were routine evaluations in the Gastroenterology/Hepatology Service, as previously described by De Oliveira et al. (2018)⁽²⁸⁾.

The criteria for non-inclusion were: presence of other relevant liver diseases diagnosed through laboratory tests for the following diseases: chronic hepatitis B (HBsAg), chronic hepatitis C (anti-HCV), autoimmune hepatitis (anti-smooth muscle antibody-ASMA, anti-mitochondrial antibody-AMA, and antinuclear antibody-ANA) and hemochromatosis (ferritin). In addition, HIV-infected patients 1 and 2, inflammatory bowel disease, concomitant steatosis-inducing drugs, excessive alcohol consumption (>30 g/day in men or >20 g/day in women), if they had been previously treated with laxatives, antibiotics or prebiotics/probiotics within the 2 months before inclusion in the study or if they were pregnant and lactating. According to the sample calculation⁽²⁹⁾, using a power of 90% and significance level of 5% to detect a difference of 46.5% in the prevalence of SIBO⁽²¹⁾, nineteen outpatients had to be recruited in each group. Initially 45 outpatients met the inclusion criteria; however, one outpatient declined to participate and 4 outpatients (2 in each group) were excluded because they did not complete the three-month experimental protocol (no motive given). Therefore, 40 outpatients who completed the experimental protocol were included in the analyses (Figure 1).

This randomized, parallel open-label clinical trial, was three months long. Outpatients were randomized into two groups: the experimental group, which received individualized diet plus nutritional orientation (DIET group, n=20), or control group, which received only nutritional orientation (CT group, n=20). A researcher who was not directly involved in the sample selection was responsible for randomization. For each four outpatients who agreed to participate in the study, two were drawn to belong to the DIET group, and the other two were drawn for the CT group, and so on, until the estimated sample number was reached. Block randomization was used to avoid or lessen possible imbalances at some point in the randomization process. The distribution of the variables age and gender of the outpatients was

similar for the DIET and CT groups, confirming the appropriateness of the randomization process at the beginning of the study. At baseline, the outpatients were evaluated in relation to the variables of interest. Outpatients from both groups were followed up in individual consultations, monthly, by the same nutritionist. All volunteers were instructed to maintain the same level of physical activity during the trial period. After the intervention period, the groups were submitted to the initial evaluations again (Figure 1).

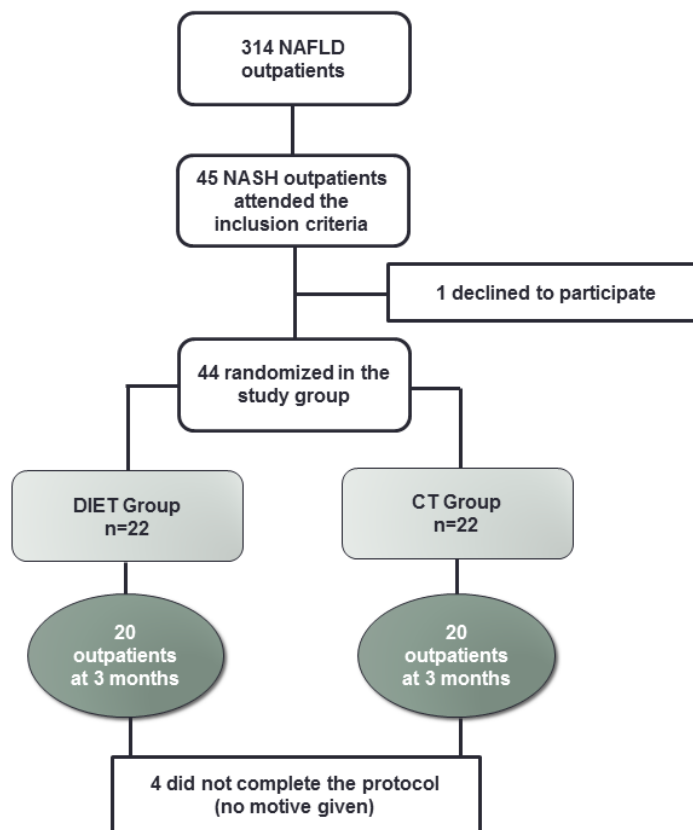


Figure 1. Recruitment flow chart and study design. NASH, non-alcoholic steatohepatitis; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease.

This study was conducted in accordance with the guidelines established in the Declaration of Helsinki and all procedures involving human subjects were approved by the Human Research Ethics Committee of the University Hospital at the Federal University of Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil (protocol number 1.129.516/2015). All subjects provided written informed consent. This clinical trial is registered under the name "Effects of nutritional intervention on the nutritional profile, inflammation and intestinal health of

outpatients with liver disease", registry identification number RBR-2rcph2, <http://ensaiosclinicos.gov.br/rg/RBR-2rcph2/>.

Anamnesis

The anamnesis consisted of questions regarding personal data, clinical history, and level of physical activity according to the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) short version⁽³⁰⁾. Outpatients were classified as very active, active, irregularly active A, irregularly active B and sedentary, according to the consensus of the Center for Disease Control (CDC, 2000)⁽³¹⁾.

The diagnosis of systemic arterial hypertension and type 2 diabetes was obtained from medical records. The presence of metabolic syndrome was defined according to the criteria of the International Diabetes Federation⁽³²⁾.

Histology of the liver

The liver biopsy specimens, collected before inclusion in the study, were reviewed by a blind pathologist for the clinical characteristics of the outpatients. The histological analysis was based on the NAFLD activity score (NAS), developed by the Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network⁽³³⁾. Significant fibrosis was defined as fibrosis stage $F \geq 2$ ⁽³⁴⁾.

Biochemical evaluation

After 12 h of fasting, venous samples were taken for analysis of liver biochemistry (alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), gamma-glutamyltransferase (GGT), total bilirubin and metabolic parameters (lipid profile and fasting insulin and glucose).

The blood was separated by centrifugation and immediately analyzed in the Laboratory of Clinical Analysis of the University Hospital of the Federal University of Juiz de Fora. AST, ALT, GGT, total bilirubin, fasting glucose, total cholesterol, high density lipoprotein (HDL) and triacylglycerols (TAG) were analyzed by standard laboratory methods using a self-analyzer WIENER LAB, CT600i. Fasting insulin was determined by a self-analyzer Architect, i1000SR. Low density lipoprotein (LDL) was calculated according to Friedewald et al., (1972)⁽³⁵⁾. The evaluation of the homeostasis model of insulin resistance (HOMA-IR) was calculated according to Matthews et al. (1985)⁽³⁶⁾.

Anthropometric and dietary assessment

Weight, height, waist circumference, and body composition were assessed by a single trained evaluator in the fasting state. Waist circumference was measured at the midpoint between the iliac crest and the last rib. Body mass index (BMI) was calculated by dividing weight in kilograms by squared height in meters⁽³⁷⁾. Body fat was measured by bioimpedance analyzer (RJL Systems, Inc (EUA) - Model Quantum II, serial number Q4631IID) as described previously⁽³⁸⁾. For bioimpedance assessment, the outpatient was instructed not to perform rigorous exercises, to avoid alcoholic beverages and excessive consumption of coffee / caffeinated drinks the day before the exam. In addition, no liquid could be consumed within 4 h before the evaluation.

Dietary assessment was performed in baseline through the Quantitative Food Frequency Questionnaire, validated for the Brazilian population⁽³⁹⁾. All dietary questionnaires were analyzed by the same nutritionist and the daily intake of energy and nutrients (carbohydrates, fiber, lipids, saturated and unsaturated fatty acids and proteins) were calculated using Dietpro 5i software (Agromídia, Viçosa, Brazil), based on composition proposed by TACO (2004) and USDA (2003). The dietary intake was assessed according to the Dietary Recommendations⁽⁴⁰⁾.

Characterization of fecal microbiota

Samples of feces were collected by outpatients in sterile vials and kept refrigerated for up to 24 hours until they were taken to the laboratory. Fecal samples were processed for microbiological analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH). The samples were fixed with paraformaldehyde (final concentration 2%), and a 0.01% Tween solution was added to each sample. The samples were then sonicated (Vibra Cell VCX 130PB, Sonics & Materials[®]) three times (range 110.7 μ m for 60 s). After sonication, the samples were centrifuged at 500 g for 5 min. The supernatant was removed and the remaining contents were washed twice with ultrapure water. The three supernatant fractions were placed in one vial and shaken vigorously. Aliquots of each sample were diluted (100x) and filtered through polycarbonate filters (Nuclepore[®] - 0.2 μ m) and stored in a refrigerator until the hybridization process.

Subsequently, the samples were submitted to FISH protocol⁽⁴¹⁾ for identification and quantification of microbial groups. Thus, 24 oligonucleotide probes labeled with Cy3 fluorochrome (supplementary material) were used. A negative control probe (5'CCTAGTAGACGCCGTCGAC-3'), which has no specificity for any bacterial group, was

also used to evaluate the efficiency of the hybridization. The density of the microorganisms ($\times 10^8$ cells g^{-1}) was determined by direct counting at $100 \times$ magnification using an epifluorescence microscope (Olympus® BX-60) equipped with the U-N41007, U-MWU2, U-MWB2 and U-MWG2 optical filters.

Small intestinal bacterial overgrowth assessment

The outpatients were submitted to expired hydrogen and methane (CH_4) breath test (H_2) for the detection of SIBO. For the test, outpatients received preparation guidelines, which included: not using antibiotics in the last 4 weeks prior to the test, discontinuing the use of proton pump inhibitors one week prior to the test, and avoiding fiber-rich foods the day before. Tests were performed on QuinTron BreathTracker™ Digital MicroLyzer, with the outpatient having fasted for 10 hours. On the day of examination, expired alveolar air was collected in specific collection bags prior to ingestion of the test substrate (15 ml syrup at the concentration of 667 mg of lactulose, followed by the consumption of 200 ml of filtered water) at time 0' (fasting), and after the use of lactulose at times 15', 30', 45', 60', 90 'and 120'. Elevations of $H_2 \geq 20$ ppm and/or $CH_4 \geq 10$ ppm were considered positive for SIBO from the 0' to 90' time dosing⁽⁴²⁾.

Dietary intervention

The dietary intervention consisted of the prescription of individualized diet plus nutritional orientation (DIET group) or only of nutritional orientation-control group (CT group). The clinical history, nutritional status, lifestyle, eating habits and the calculation of the nutritional needs of each patient were considered for the preparation of the individualized diet.

The total energy expenditure (TEE)⁽⁴³⁾ was calculated according to the DRIs⁽⁴³⁾. The average TEE of the DIET and CT groups were $2.276.3 \pm 358.1$ kcal and $2.269.9 \pm 506.5$ kcal per day ($p=0.963$), respectively. Eutrophic outpatients received a normocaloric diet to maintain body weight. Overweight or obese outpatients received a hypocaloric diet, with a deficit of 500 to 1,000 kcal per day (mean of 624.9 ± 94.8 kcal) in relation to TEE⁽⁴⁰⁾. The caloric distribution of macronutrients and the supply of dietary fiber were based on the Dietary Recommendations⁽⁴⁰⁾. The characteristics of the diet prescribed to the DIET group are described in Table 1. In addition, the prescription contemplated the reduction or exclusion of food products promoting NASH, such as ultraprocessed and rich in simple carbohydrates⁽⁴⁴⁾.

Adherence to the diet and/or to the nutritional orientation, in both groups, were evaluated during monthly nutritional monitoring, through a 24-hour Food Recall and a 3-day non-consecutive food record. When necessary, the diet was adapted to the recommendations⁽⁴⁰⁾, to improve the patient's adherence to the proposed treatment. All outpatients who completed the three months of study had good adherence to dietary intervention and no adverse effects were reported.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS[®] software (version 20.0, SPSS Inc., United States of America). Parametric and non-parametric tests were used according to the normality tests (Shapiro-Wilk) and homogeneity of variances (Levene). A significance level of 5% was adopted ($p < 0.05$). Continuous variables were represented by mean and standard error of the mean. Categorical variables were expressed as absolute (n) and relative (%) frequencies. The T-test was used for independent samples or Mann-Whitney U for comparing continuous variables at baseline and after intervention between groups. In order to compare the continuous variables before and after intervention, the T-Test for paired samples or Wilcoxon was used. Categorical variables were compared by the Chi-Square Test (χ^2) or Fisher's Exact Test (between groups) and the McNemar Test (within the group). The 2x4 variance analysis (ANOVA 2 factors), followed by the post hoc Sidak, was used to compare H₂ and CH₄ concentrations between the baseline period and after dietary intervention, throughout the respiratory test.

Results

Of the 40 outpatients included in the study analysis, the mean age was 49.4 ± 2.3 years (ranging from 25 to 69 years) and 52.5% (n=21) were males. At baseline, DIET and CT groups were similar in relation to demographic characteristics, clinical history, histological analysis (Table 2), food consumption (Table 3), physical activity level and metabolic-nutritional profile (Table 4), reinforcing homogeneity of the groups at baseline and the appropriateness of the randomization process.

After three months of dietary intervention, the DIET group presented a reduction in most of the metabolic and nutritional parameters, whereas the CT group did not present changes (Table 4). In the DIET group, body weight decreased by 4.7% (about 4 kg). BMI, waist circumference and percentage of body fat decreased by 3.7%, 3.6% and 7.1%,

respectively, in relation to baseline measurements. In addition, GGT, glycemia and TAG values normalized after diet intervention, and total cholesterol decreased by 6.8%. After three months of follow-up, the comparison between the groups showed that BMI, HOMA-IR and insulin, AST and GGT levels were significantly lower in the DIET group. At the end of the study, the volunteers had not changed their level of physical activity, and there was no difference in the IPAQ classification between the groups ($p=0.224$).

Table 1. Characteristics of the diet prescribed to the DIET group
(Mean and standard error of the mean)

	Grams/day		% TEE	
	Mean	SEM	Mean	SEM
Energy (kcal)				
Mean	1,651.3			
SEM	58.8			
Carbohydrates	198.4	7.3	47.4	0.8
Lipids	51.5	2.4	27.7	0.7
Protein	103.9	4.2	24.9	0.7
SFA	12.6	0.8	6.9	0.4
PUFA	14.9	0.6	8.1	0.4
MUFA	19.3	0.6	10.6	0.3
Fibers	30.3	1.06		

SFA, saturated fatty acid; PUFA, polyunsaturated fatty acid; MUFA, monounsaturated fatty acid; TEE, total energy expenditure.

Table 2. Demographic characteristics, clinical history and histological analysis of patients with non-alcoholic steatohepatitis at baseline

(Mean and standard error of the mean; Proportions and numbers)

	DIET group (n=20)		CT group (n=20)		P*†‡
	%	n	%	n	
Age (years)					0.48
Mean		48.3		50.6	
SEM		2.3		2.3	
Sex (male)	60	12	45	9	0.34
SAH (yes)	35	7	50	10	0.33
T2D (yes)	10	2	30	6	0.23
Steatosis					0.91
5% - 33%	15	3	15	3	
34% - 66%	40	8	50	10	
> 66%	45	9	35	7	
Lobular inflammation					1.00
< 2 foci/200x	75	15	75	15	
2 a 4 foci/200x	25	5	25	5	
Ballooning					0.20
Few cells	55	11	35	7	
Many cells	45	9	65	13	
Fibrosis stage					0.38
F0	55	11	30	6	
F1	40	8	55	11	
F2	5	1	10	2	
F3	0	0	5	1	

CT, control group; T2D, type 2 diabetes; SAH, systemic arterial hypertension;

* Statistical significance (P) was established at P < 0.05.

† Comparisons between continuous variables were made using the T or Mann-Whitney test.

‡ Comparisons between categorical variables were made using the χ^2 or Fisher's Exact test.

Table 3. Dietary intake of patients with non-alcoholic steatohepatitis at baseline
(Mean and standard error of the mean)

	DIET group (n=20)		CT group (n=20)		P*†
	Mean	SEM	Mean	SEM	
Energy (kcal)	2,444.0	142.4	2,244.8	142.2	0.33
Carbohydrates					
(g/day)	310.5	22.9	297.9	20.4	0.70
(%)	50.3	1.6	52.3	1.5	0.38
Lipids					
(g/day)	87.1	6.7	78.7	7.3	0.33
(%)	31.8	1.3	29.6	1.2	0.23
Proteins					
(g/day)	104.8	7.0	92.1	5.3	0.15
(%)	17.8	1.2	17.7	1.1	0.93
Fibers (g/day)	17.8	1.2	18.9	1.3	0.53
SFA					
(g/day)	19.4	2.4	16.8	2.9	0.19
(%)	7.0	0.7	6.4	0.9	0.35
PUFA					
(g/day)	26.7	1.8	22.0	2.4	0.13
(%)	9.9	0.5	8.7	0.6	0.15
MUFA					
(g/day)	21.9	2.5	15.8	1.8	0.07
(%)	8.0	0.7	6.1	0.5	0.15

CT, control group; SFA, saturated fatty acid; PUFA, polyunsaturated fatty acid; MUFA, monounsaturated fatty acid.

* Statistical significance (P) was established at $P < 0.05$.

† The comparisons between the continuous variables were made by the T test for independent samples or Mann-Whitney test.

Table 4. Metabolic-nutritional profile and level of physical activity of patients with non-alcoholic steatohepatitis at baseline and after three months of dietary intervention

(Mean and standard error of the mean)

	DIET group (n=20)				CT group (n=20)				P*
	Basal		3 months		Basal		3 months		
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	
MS (yes)									
%	60		40		55		55		0.34
n	12		8		11		11		
Weight (kg)	83.1 ^a	2.2	79.2 ^b	2.2	87.3	5.2	87.9	5.4	0.15
BMI (kg/m ²)	30.1 ^a	0.8	28.9 ^b	0.8	32.1	1.3	32.3	1.4	0.04†
BF (%)	33.2 ^c	1.9	30.8 ^d	1.9	34.6	2.0	34.0	2.1	0.22
WC (cm)	96.2 ^c	1.8	92.7 ^d	1.5	97.1	3.0	96.6	3.1	0.27
Glucose (mg/dL)	99.9 ^c	3.6	91.2 ^d	2.2	103.6	4.1	102.3	5.6	0.21
Insulin (μU/mL)	13.9	1.3	11.9	1.7	16.6	1.8	15.0	1.2	0.04†
HOMA-IR	3.2 ^c	0.3	2.6 ^d	0.4	4.3	0.5	3.7	0.2	0.01†

(continue)

	DIET group (n=20)				CT group (n=20)				P*
	Basal		3 months		Basal		3 months		
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	
TC (mg/dL)	184.6 ^c	9.7	171.9 ^d	7.1	197.7	7.3	191.4	8.3	0.08
HDL (mg/dL)	44.0	1.9	41.8	1.2	41.7	2.4	42.2	2.4	0.88
LDL (mg/dL)	106.5	7.4	104.3	5.9	120.0	6.3	114.4	7.4	0.29
TAG (mg/dL)	172.1 ^c	17.7	130.7 ^d	16.4	175.2	14.1	169.0	16.3	0.10
AST (U/L)	45.4 ^a	5.6	33.0 ^b	5.0	46.9	5.4	43.9	4.5	0.002†
ALT (U/L)	58.8 ^a	7.7	44.4 ^b	7.7	55.7	5.8	52.4	5.8	0.13
GGT (U/L)	69.4 ^c	16.7	44.4 ^d	8.2	89.8	13.4	91.3	14.7	0.009†
TB (mg/dL)	0.83	0.1	0.71	0.1	0.59	0.1	0.62	0.1	0.51
IPAQ									0.22
Sedentary									
%	50		50		65		70		
n	10		10		13		14		

(continue)

	DIET group (n=20)				CT group (n=20)				P*
	Basal		3 months		Basal		3 months		
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	
IAA									
%	20		15		5		0		
n	4		3		1		0		
IAB									
%	10		10		5		10		
n	2		2		1		2		
Active									
%	20		25		25		20		
n	4		5		5		4		

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; BF, body fat; CT, control group; GGT, γ -glutamyltransferase; HDL, high density lipoprotein, HOMAR-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; IAA, irregularly active A; IAB, irregularly active B; IPAQ, International Physical Activity Questionnaire; LDL, low density lipoprotein; MS, metabolic syndrome; TAG, triacylglycerol; TB, total bilirubin; TC, total cholesterol; WC, waist circumference;

No differences between groups in baseline.

^{a,b} Different letters on the same line indicate statistical difference ($p < 0.05$) within the groups (T-test for repeated samples or Wilcoxon).

^{c,d} Different letters on the same line indicate statistical difference ($p < 0.001$) within the groups (T-test for repeated samples or Wilcoxon).

* Significant difference between groups, after three months, using T-Test for independent samples or Mann-Whitney test.

† Statistical significance (P) was established at $P < 0.05$.

At baseline, the DIET and CT groups were similar in relation to SIBO frequency (30% vs. 25%, respectively, $p=0.723$). After three months of dietary intervention, there was no significant change in the proportion of positive tests within the DIET group (30%, $p=1.000$), within the CT group (45%, $p=0.289$) and between groups ($p=0.327$). However, after the intervention, the concentration of H_2 expired in the CT group increased significantly in the 90' time, when compared to the baseline, that is, before the intervention (Figure 2).

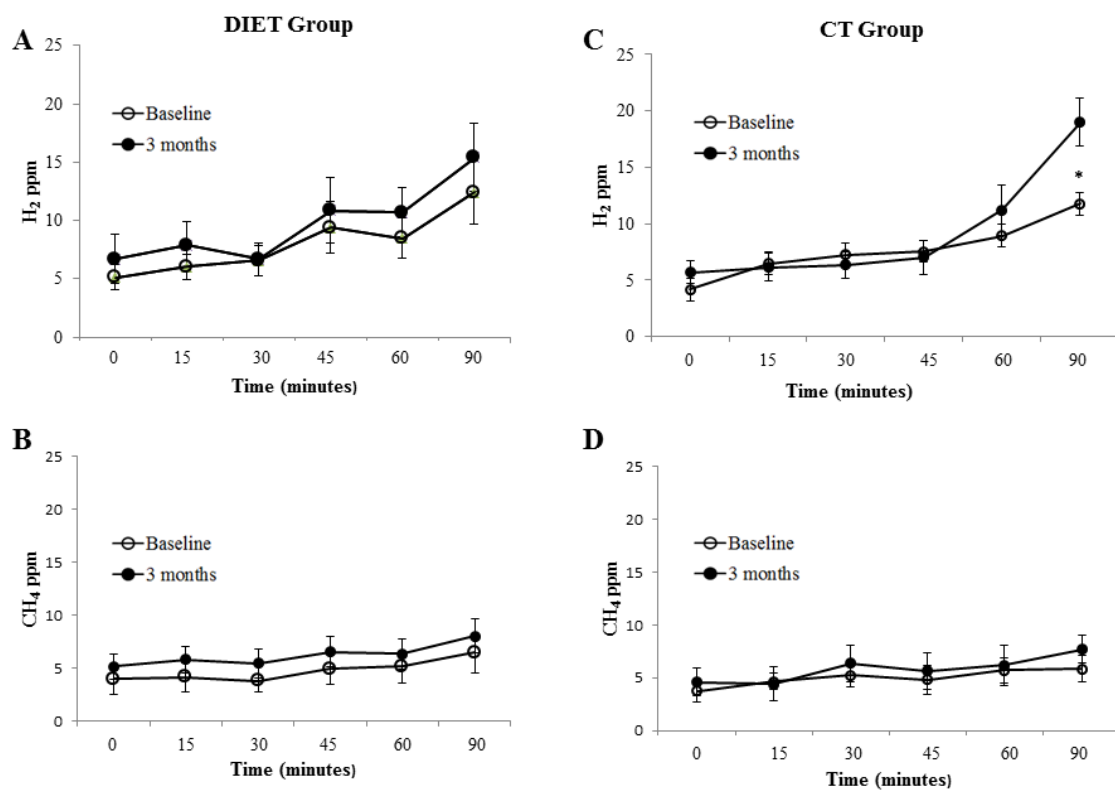


Figure 2. Concentration of H_2 and CH_4 in the expired alveolar air of the DIET and CT groups, over time, between the respiratory tests at baseline and after nutritional intervention. (a), concentration of H_2 in the DIET group; (b), concentration of CH_4 in the DIET group; (c) concentration of H_2 in the CT group; (d), concentration of CH_4 in the CT group. Values described in mean and standard error of the mean. *Significant difference between baseline and 3 months (interaction effect, $p=0.009$ at time 90'), using ANOVA for repeated measures with post hoc Sidak.

Regarding the composition of the fecal microbiota, there was no significant difference between the groups at baseline and at 3 months (Figure 3 and 4). However, after the intervention, the DIET group increased the density of total microorganisms in relation to the baseline (Figure 3), while the CT group decreased Bacteroidetes ($p=0.04$) and Verrucomicrobiales ($p=0.02$). In addition, it was observed that outpatients who received nutritional orientation only (CT group) had a tendency to decrease Actinobacteria ($p=0.05$) and tendency to increase *Escherichia coli* ($p=0.05$) (Figure 4).

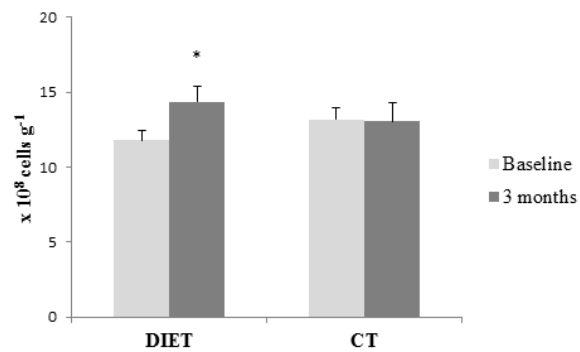


Figure 3. Density of total microorganisms in patients with non-alcoholic steatohepatitis at baseline and 3 months, according to the study group. *Significant difference between baseline and 3 months ($p=0.04$) in the DIET group, using Wilcoxon.

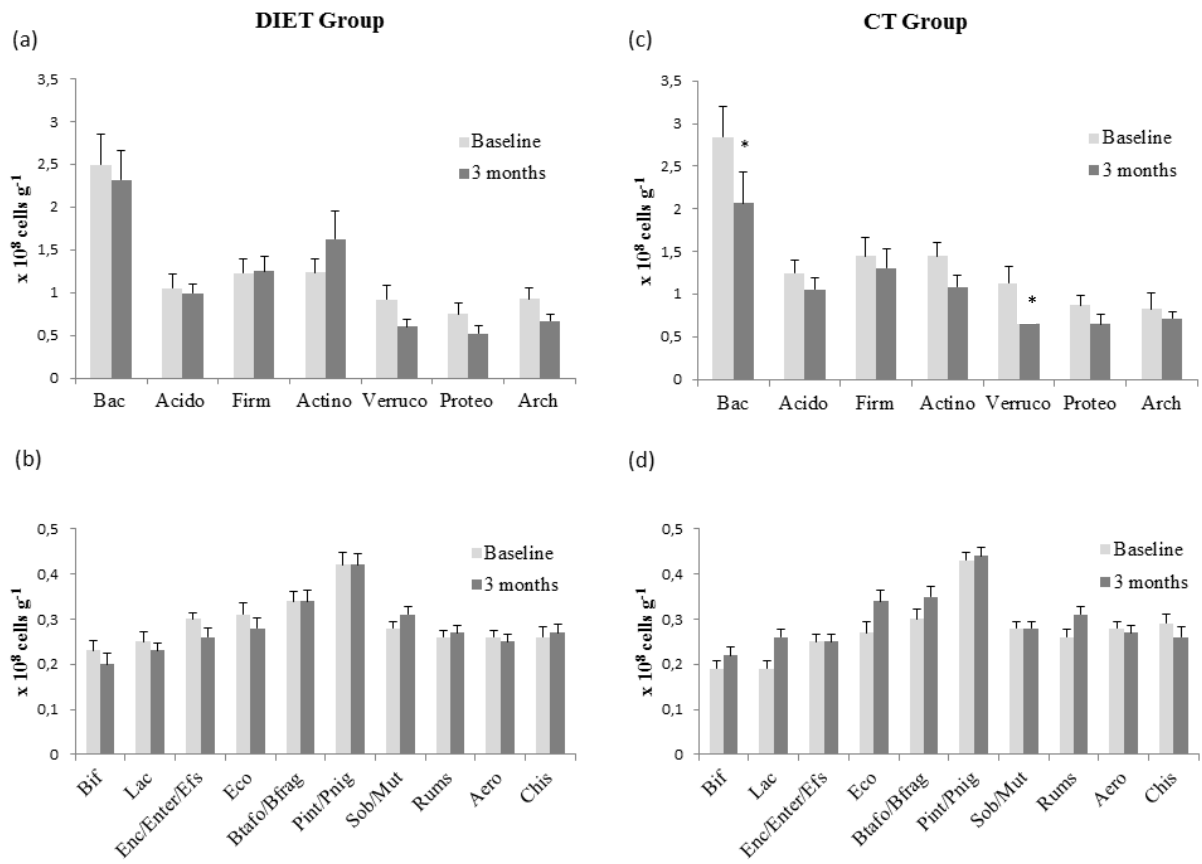


Figure 4. Characterization of fecal microbiota of patients with non-alcoholic steatohepatitis at baseline and 3 months. Bac, Majority of Bacteroidaceae, some Prevotellaceae, some Porphyromonadaceae; Acid, Acidobacteria; Firm, Firmicutes; Actino, Actinobacteria; Verruco, Verrucomicrobiales; Proteo, alpha, beta, gamma and epsilon Proteobacteria; Arch, Archeae; Bif, *Bifidobacterium spp*; Lac, *Lactobacillus*; Enc/Enter/Efs, *Enterococcus spp/Enterococcus/Enterococcus faecalis*; Eco, *Escherichia coli*; Btafo/Bfrag, *Bacteroides forsythus/Bacteroides fragilis*; Pint/Pnig, *Prevotella intermedia/Prevotella nigrescens*; Sob/Mut, *Streptococcus sobrinus/Streptococcus mutans*; Rums, Ruminococcaceae; Aero, some Aeromonas; Chis, Most *Clostridium histolyticum (Clostridium cluster I and II)*. (a), domain, phylum and order in the DIET group; (b), gender and species in the DIET group; (c), domain, phylum and order in the CT group; (d), gender and species in the CT group. Values described in mean and standard error of the mean, represented by vertical bars. *Statistical difference ($p < 0.05$) within the group compared to baseline, using Wilcoxon.

Discussion

The gut microbiota emerges as a potential therapeutic target in the fight against metabolic diseases, including NASH. This study is the first to investigate the effects of exclusively dietary intervention on the gut microbiota and metabolic-nutritional profile of NASH outpatients. Our hypothesis was that the intervention with individualized prescribed diet combined with nutritional orientation could positively affect all these parameters, when compared to the intervention with only nutritional orientation.

There is evidence that exclusively dietary modification results in positive effects on the gut microbiota of individuals with obesity and/or metabolic syndrome^(25,27,45). In obesity, the consumption of hypocaloric diet (72% of carbohydrates, 16% of proteins, 12% of lipids and 42g of fiber) for a month increased Bacteroidetes and reduced Firmicutes⁽⁴⁵⁾. In patients with metabolic syndrome, Fava et al. (2013)⁽⁴⁵⁾ observed that the consumption of normocaloric diet (55% carbohydrate, 17% protein and 28% lipid) resulted in an increase in *Bifidobacterium spp.*, a group of bacteria that improves body energy regulation and reduces risk factors for metabolic diseases. In our study, we believe that the individualized diet positively affected the gut microbiota of NASH outpatients. Intervention in the DIET group contributed to the fact that potentially pathogenic bacteria, such as *E. coli*, did not increase in fecal samples, while potentially beneficial bacteria, such as Actinobacteria, did not decrease. These changes tended to occur in the CT group. It is clear in the literature that the genus *Escherichia* is able to produce ethanol⁽⁴⁶⁾, which is associated with inflammation and hepatic injury⁽⁴⁷⁻⁴⁹⁾. On the other hand, Actinobacteria is a phylum of gram-positive bacteria, including the family Bifidobacteriaceae, that exerts protective function during hepatic injury^(50,51). In addition, in the DIET group, the densities of Bacteroidetes and Verrucomicrobiales did not decrease; unlike the CT group. Some studies have shown an inverse correlation between these microbial groups and the development of diseases, including NASH^(50,51). Besides that, in the DIET group, there was an increase in the density of total microorganisms, which may reflect in part a greater microbial diversity (greater species richness and uniformity in the distribution of residues among species), considering that in the basal the analyzed microorganisms corresponded to 73.2% of the totals, and after the intervention corresponded to 55.5% (p=0.001). Therefore, future studies should consider the analysis of other bacteria not investigated by this study.

Regarding the SIBO frequency, we observed that dietary intervention in both groups did not statistically modify the percentage of positive tests. However, we observed in clinical

practice that there was an increase of 80% of positive tests in the CT group, while the proportion in the DIET group was maintained with the intervention. It is possible that the follow-up of patients for more than three months may show statistical significance among these proportions. SIBO has been associated with increased intestinal permeability and elevated levels of LPS, supporting the role of endotoxemia in the development of steatohepatitis⁽⁵²⁾. Considering the possible relationship between SIBO and NASH, therapeutic measures are necessary to prevent or treat gut microbiota imbalance.

Traditionally SIBO treatment consists of eradication of bacteria with broad-spectrum antibiotics⁽⁵³⁾. However, the use of antibiotics is not free of risk (e.g., severe adverse reactions, antibiotic resistance and potential for *Clostridium difficile* infection)⁽⁵⁴⁾. In addition, other treatment options, such as the use of probiotics and modification of dietary habits, are under investigation. The modification of dietary habits seems to reduce the frequency of SIBO⁽⁵⁵⁾, however, studies are needed to clarify the effects of dietary intervention on the gut microbiota. For example, in irritable bowel syndrome, the use of restricted diet in fermentable oligo-di-monosaccharides and polyols (FODMAPs) normalized the respiratory test in 80% of SIBO patients⁽⁵⁵⁾. In NASH patients, one study found that the dietary intervention associated with the consumption of symbiotics did not change the frequency of SIBO⁽⁵⁶⁾. However, according to the authors, the percentage of positive tests for SIBO was only 2%⁽⁵⁵⁾. In other investigations, the SIBO frequency ranged from 50% to 77.8%^(20,21). It should be noted that the present study did not standardize a specific type of diet, such as the restricted diet in FODMAPs. We also do not associate symbiotics or other measures with dietary intervention. On the contrary, we investigated the effects of exclusively dietary modification, adjusted to the individuality of each subject, for the control of potential risk factors for the development and progression of NASH, particularly the gut microbiota.

Although the gut microbiota was the main outcome, we also evaluated the impact of dietary intervention on the metabolic and nutritional profile. We did not find in the literature clinical studies investigating the effects of exclusively dietary modification on these parameters in NASH outpatients. All the evidences associated and/or compared diet with physical exercise^(57,58), probiotic^(22,59) or symbiotic⁽⁵⁶⁾. In this way, our work is also the first to conduct this type of analysis.

According to previous studies⁽⁵⁶⁻⁵⁸⁾, the dietary intervention reduced body weight, BMI, waist circumference, and fat percentage. Considering that the majority were overweight, the dietary prescription decreased, on average, calorie consumption by 600 kcal per day. In fact, a recent guideline for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)⁽⁶⁰⁾ has

recommended the prescription of a hypocaloric diet (deficit of 500 to 1.000 kcal per day) to those who are overweight and obese for weight reduction and hepatic steatosis⁽⁵⁸⁾.

There is a consensus that lifestyle modification, including strategies for reducing body weight, represents the first line of treatment for NAFLD^(60,61). Considering the close relationship between obesity and liver disease⁽⁶²⁾, body weight should be reduced by at least 3-5%⁽⁶¹⁾, and a loss of at least 7-10% may be necessary to improve necroinflammation and liver enzymes^(57,58). It is worth noting that the evidence supporting these recommendations has obtained the results after 12 months of follow-up and combined diet with exercise^(57,58). Our study demonstrated a reduction of approximately 5% of the initial weight in only 3 months of dietary intervention, with no change in the level of physical activity. It is possible that we achieved histological improvement, since the DIET group reduced the serum levels of AST and ALT by more than 20% and normalized GGT levels. That is, the diet controlled important markers of liver injury, which in NASH have already been correlated with the degree of inflammation and fibrosis⁽⁶³⁾.

Another relevant finding in the DIET group was the improvement of glycemic and lipid parameters. The DIET group reduced total cholesterol, TAG, glycemia, insulin and HOMA-IR when compared to the CT group, which did not modify any laboratory parameter. A similar study was conducted by Elias et al. (2010)⁽⁶⁴⁾ in patients with NAFLD (including simple steatosis and NASH). According to the authors, exclusively diet intervention for a period of 6 months significantly reduced biochemical parameters of insulin resistance and metabolic syndrome (total cholesterol, glycemia, TAG and HOMA-IR) in the group of patients whose loss of body weight was at least 5% in relation to baseline. It should be emphasized that, in our study, the beneficial effects on metabolic parameters were also accompanied by a significant reduction in body weight after 3 months of intervention.

Regardless of the caloric restriction, it is possible that the qualitative modification of the diet, that is, the change in the proportion of macronutrients and the higher intake of dietary fiber, contributed to improve the laboratory markers in the DIET group. It has been suggested that dietary composition may contribute to the development of NAFLD⁽⁶⁵⁻⁶⁷⁾. Thus, qualitative modification of eating habits may be a therapeutic resource, even in the absence of weight loss⁽⁶⁸⁾. For example, Bezerra et al. (2014)⁽⁶⁹⁾ found, in NAFLD patients (simple steatosis and NASH), that a diet composed of 40% carbohydrates (50% whole grains), 25% lipids (7% saturated, 10% monounsaturated and 8% polyunsaturated) and 35% protein (animal and vegetable), reduced serum levels of total cholesterol, TAG, LDL, AST, ALT, GGT and fasting glycemia, while BMI, waist circumference, and fat percentage remained

stable. In this study, although the carbohydrate content was reduced, the consumption of dietary fiber was increased. It is known that fiber content in food is one of the most important factors related to the glycemic index of food. Diets with low glycemic index and high in dietary fiber may decrease glucose absorption, reducing hepatic carbohydrate influx and de novo lipogenesis⁽¹⁵⁾. In addition, the fibers can positively influence the gut microbiota, which is probably involved in the modulation of risk factors for the development of NASH⁽⁷⁰⁾.

Thus, our results suggest that dietary modifications in terms of calories and/or nutrient composition be measured, even isolated, contributing to health promotion in NASH outpatients and should form the basis of nutritional treatment for this condition. Both the DIET and CT groups received the same nutritional orientation, were monitored during the same time by the same nutritionist, and also presented clinical characteristics, dietary intake and similar gut microbiota at baseline. Therefore, we believe that the individualized diet was the factor that promoted positive effects on the gut microbiota and the metabolic-nutritional profile of NASH outpatients.

One limitation of our study was the failure to perform hepatic biopsy after treatment; however, for ethical reasons, we did not repeat this procedure after dietary intervention to assess liver histology. In addition, the fecal samples do not reflect the microbiota composition in the small intestine, but mainly represent the final content of the colon. Another limitation is that we did not evaluate the food consumption of the groups after three months of intervention, which could help in the interpretation of our results. Finally, we do not exclude potential confounders, such as the presence of diabetes; however, the groups were similar in relation to the percentage of diabetic patients, guaranteeing the homogeneity between them. Future large-scale intervention studies investigating the effects of diet, alone or in combination with prebiotics/probiotics, should include other substrates for the respiratory test (including glucose) in order to increase the accuracy of the technical, and to evaluate intestinal permeability, which is a good marker of intestinal health.

The most important strengths of the present study were the design of randomization, the inclusion of only outpatients with NASH diagnosed by hepatic biopsy and the individualization of dietary prescription for outpatients in the experimental group. All of these forces are relevant in comparison to other clinical trials that evaluated the effects of diet in combination with probiotics, symbiotics, and physical exercise for the treatment of NASH⁽⁵⁶⁻⁵⁹⁾.

Conclusions

In conclusion, this clinical trial demonstrated that the intervention with diet plus nutritional orientation improved the metabolic-nutritional profile and resulted in positive effects on the gut microbiota of NASH outpatients, when compared to the nutrition orientation only. The results support the importance of the nutritionist in the multidisciplinary team for the treatment of NASH, individualizing the dietary prescription according to the nutritional needs, preferences and lifestyle of the patient.

Financial Support: This study was funded by a Brazilian government organization (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais-FAPEMIG; APQ 01522-15).

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Authorship: The authors' contributions were as follows: F. F. G. designed the concept of the study, and all authors were involved in the literature search and review. F. F. G. wrote the manuscript. D. G. O. performed statistical analysis. A. P. B. M., J. M. O., D.E.C. and L. E. V. V. C. F. were involved with editing the manuscript; and all authors read and approved the final manuscript.

References

1. Stefan N, Häring H-U, Cusi K (2018) Non-alcoholic fatty liver disease: causes, diagnosis, cardiometabolic consequences, and treatment strategies. *Lancet Diabetes Endocrinol.* [http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587\(18\)30154-2](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587(18)30154-2) (accessed september 4, 2018).
2. Wanless IR, Lentz JS (1990) Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. *Hepatology* **12**, 1106–1110.
3. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R *et al* (2004) Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology*, **40**, 1387–1395.
4. Losekann A, Weston AC, de Mattos, AA *et al* (2015) Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH): Risk Factors in Morbidly Obese Patients. *Int J Mol Sci* **16**, 25552-25559.
5. Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG *et al* (1994) Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology* **107**, 1103–1109.
6. Ekstedt M, Franzén LE, Mathiesen UL *et al* (2006) Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology* **44**, 865–873.
7. White DL, Kanwal F, El-Serag HB (2012) Association between nonalcoholic fatty liver disease and risk for hepatocellular cancer, based on systematic review. *Clin Gastroenterol Hepatol* **10**, 1342–1359.
8. Orman ES, Barritt AS, Wheeler SB, *et al* (2013) Declining liver utilization for transplantation in the United States and the impact of donation after cardiac death. *Liver Transpl* **19**, 59–68.
9. Bäckhed F, Ding H, Wang T *et al* (2004) The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci* **101**, 15718-15723.
10. Jumpertz R, Le DS, Turnbaugh PJ *et al* (2011) Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. *Am J Clin Nutr* **94**, 58-65.
11. Csak T, Ganz M, Pespisa J, *et al* (2011) Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells. *Hepatology* **54**, 133-144.
12. Le Roy T, Llopis M, Lepage P *et al* (2013) Intestinal microbiota determines development of nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Gut* **62**, 17 87–1794.
13. Kovatcheva-Datchary P, Arora T (2013) Nutrition, the gut microbiome and the metabolic syndrome. *Best Prac Res Clin Gastroenterol* **27**, 59–72.

14. Ghetti FF, Oliveria DG, Oliveira JM *et al* (2018). Influence of gut microbiota on the development and progression of nonalcoholic steatohepatitis. *Eur J Nutr* **57**:861-876. DOI 10.1007/s00394-017-1524-x.
15. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C *et al* (2008) Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet–Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes* **57**, 1470–1481.
16. Manco M, Putignani L, Bottazzo GF (2010) Gut Microbiota, Lipopolysaccharides, and Innate Immunity in the Pathogenesis of Obesity and Cardiovascular Risk. *Endocrine Reviews* **31**, 817–844.
17. Spencer MD, Hamp TJ, Reid RW *et al* (2011) Association between composition of the human gastrointestinal microbiome and development of fatty liver with choline deficiency. *Gastroenterology* **140**, 976-986.
18. Buzzett E, Pinzani M, Tsochatzis EA (2016) The multiple-hit pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism* **65**, 1038-1048.
19. Zhu L, Baker SS, Gill C *et al* (2013) Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology* **57**, 601–609.
20. Wigg AJ, Roberts-Thomson IC, Dymock RB *et al* (2001) The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumor necrosis factor α in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Gut* **48**, 206–211.
21. Shanab AA, Scully P, Crosbie O *et al* (2011) Small intestinal bacterial overgrowth in nonalcoholic steatohepatitis: association with toll-like receptor 4 expression and plasma levels of interleukin 8. *Dig Dis Sci* **56**, 1524-1534.
22. Wong VW-S, Tse CH, Lam TT *et al* (2013) Molecular characterization of the fecal microbiota in patients with nonalcoholic steatohepatitis—a longitudinal study. *PLoS One* **8**, e62885.
23. Del Chierico F, Nobili V, Vernocchi P *et al* (2016) Gut microbiota profiling of pediatric nonalcoholic fatty liver disease and obese patients unveiled by an integrated meta-omics-based approach. *Hepatology*. doi:10.1002/hep.28572.
24. Mouzaki M, Comelli EM, Arendt BM (2013) Intestinal microbiota in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **58**, 120-127.
25. Haro C, García-Carpintero S, Alcalá-Díaz JF *et al* (2016) The gut microbial community in metabolic syndrome patients is modified by diet. *J Nutr Biochem* **27**, 27-31.

26. Breusing N, Lagerpusch M, Engstler AJ *et al* (2017) Influence of Energy Balance and Glycemic Index on Metabolic Endotoxemia in Healthy Men. *J Am Coll Nutr.* **0**, 1–8.
27. Fava F, Gitau R, Griffin BA *et al* (2018) The type and quantity of dietary fat and carbohydrate alter fecal microbiome and short-chain fatty acid excretion in a metabolic syndrome ‘at-risk’ population. *International Journal of Obesity.* **37**, 216-223, 2013.
28. De Oliveira DG, de Faria Ghetti F, Moreira APB *et al* (2018) Association between dietary total antioxidant capacity and hepatocellular ballooning in nonalcoholic steatohepatitis: a cross-sectional study. *Eur J Nutr.* <https://doi.org/10.1007/s00394-018-1776-0>.
29. Pocock SJ (1983) *Clinical Trials: a practical approach*. John Wiley & Sons, Chichester — New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 265 S.
30. Matsudo SM, Matsudo VR, Andrade DTA *et al.* (2002) Nível de atividade física da população do Estado de São Paulo: análise de acordo com o gênero, idade, nível socioeconômico, distribuição geográfica e de conhecimento. *Rev Bras Ciên e Mov* **10**, 41-50.
31. Center Disease of Prevention and Control (2000) *Promoting physical activity: a best buy in public health*. CDC, Atlanta.
32. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM *et al* (2009) Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* **20**, 1640-1645.
33. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M *et al* (2005) Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **41**, 1313-1321.
34. Boursier J, Mueller O, Barret M *et al* (2016) The severity of nonalcoholic fatty liver disease is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota. *Hepatology* **63**, 764-775.
35. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS (1972) Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* **18**, p. 499-502.
36. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS *et al* (1985) Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* **28**, 412-419.

37. Department of Nutrition for Health and Development, WHO (2006) WHO Global Database on Body Mass Index (BMI): An Interactive Surveillance Tool for Monitoring Nutrition Transition. *Public Health Nutrition* **9**, 658-660.
38. Kyle UG, Bosaeus I, De Lorenzo AD *et al* (2004) Bioelectrical impedance analysis—part I: review of principles and methods. *Clin Nutr* **23**, 1226–1243, 2004.
39. Ribeiro AC, Sávio KEO, Rodrigues MLCF *et al* (2006) Validação de um questionário de frequência de consumo alimentar para população adulta. *Rev Nutr* **19**, 553-562.
40. Oliveira CP, de Lima Sanches P, de Abreu-Silva EO *et al* (2016) Nutrition and Physical Activity in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Diabetes Res*.4597246.
41. Medeiros JD, Araújo LX, da Silva VL *et al* (2014) Characterization of the microbial community in a lotic environment to assess the effect of pollution on nitrifying and potentially pathogenic bacteria. *Braz J Biol* **74**, 612-622.
42. Rezaie A, Pimentel M, Rao SS (2016) How to test and treat small intestinal bacterial overgrowth: an evidence-based approach. *Curr Gastroenterol Rep*, **18**, p. 8.
43. Institute of Medicine (2005) *Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids*. Washington (DC): National Academy Press.
44. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia alimentar para a população brasileira / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – 2. ed., 1. reimpr. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014. 156 p.: il. ISBN 978-85-334-2176-9.
45. Kim MS, Hwang SS, Park EJ *et al* (2013) Strict vegetarian diet improves the risk factors associated with metabolic diseases by modulating gut microbiota and reducing intestinal inflammation. *Environ Microbiol Rep* **5**, 765–775.
46. Weimer PJ, Zeikus JG (1977) Fermentation of cellulose and cellobiose by *Clostridium thermocellum* in the absence of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Appl Environ Microbiol* **33**, 289-297.
47. Cope K, Risby T, Diehl AM (2000) Increased Gastrointestinal Ethanol Production in Obese Mice: Implications for Fatty Liver Disease Pathogenesis. *Gastroenterology* **119**, 1340–1347.
48. Gustot T, Lemmers A, Moreno C *et al* (2006) Differential liver sensitization to toll-like receptor pathways in mice with alcoholic fatty liver. *Hepatology* **43**, 989-1000.
49. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA *et al* (2006) An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* **444**, 1027-1031.

50. Xing HC, Li LJ, Xu KJ *et al* (2006) Protective role of supplement with foreign Bifidobacterium and Lactobacillus in experimental hepatic ischemia-reperfusion injury. *J Gastroenterol Hepatol* **21**, 647-656.
51. Osman N, Adawi D, Ahrné S *et al* (2007) Endotoxin- and D-galactosamine-induced liver injury improved by the administration of Lactobacillus, Bifidobacterium and blueberry. *Dig Liver Dis* **39**, 849-856.
52. Ruiz AG, Casafont F, Crespo J *et al* (2007) Lipopolysaccharide binding protein plasma levels in liver TNF-alpha gene expression. in obese patients: evidence for the potential role of endotoxin in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Obes Surg* **17**, 1374–1380.
53. Ponziani FR, Gerardi V, Gasbarrini A *et al* (2016) Diagnosis and treatment of small intestinal bacterial overgrowth. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* **10**, 215-227.
54. Adike A, Dibaise JK (2017) Small Intestinal Bacterial Overgrowth Nutritional Implications, Diagnosis, and Management. *Gastroenterol Clin N Am*, <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2017.09.008> (accessed March 13, 2018).
55. Pimentel M, Constantino T, Kong Y *et al* (2004) A 14-day elemental diet is highly effective in normalizing the lactulose breath test. *Dig Dis Sci* **49**, 73–77.
56. Ferolla SM, Couto CA, Costa-Silva L *et al* (2016) Beneficial Effect of Synbiotic Supplementation on Hepatic Steatosis and Anthropometric Parameters, But Not on Gut Permeability in a Population with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Nutrients* **8**, 397; doi:10.3390/nu8070397.
57. Promrat K, Kleiner DE, Niemeier HM *et al* (2010) Randomized Controlled Trial Testing the Effects of Weight Loss on Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH). *Hepatology* **51**, 121–129.
58. Vilar-Gomez E, Martinez-Perez Y, Calzadilla-Bertot L *et al* (2015) Weight Loss via lifestyle modification significantly reduces features of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* **149**, 367-378.
59. Malaguarnera M, Vacante M, Antic T *et al* (2012) Bifidobacterium longum with fructo-oligosaccharides in patients with non alcoholic steatohepatitis. *Dig Dis Sci* **57**, 545–553.
60. EASL–EASD–EASO (2016) Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* **64**, 1388-402.
61. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE *et al* (2012) The Diagnosis and Management of Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Am J Gastroenterol* **107**, 811– 826.

62. Lu FB, Hu ED, Xu LM *et al* (2018) The relationship between obesity and the severity of non-alcoholic fatty liver disease: systematic review and meta-analysis, *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* **12**, 491-502.
63. Suzuki A, Lymp J, St Sauver J *et al* (2006) Values and limitations of serum aminotransferases in clinical trials of nonalcoholic steatohepatitis. *Liver Int* **26**, 1209–1216.
64. Elias MC, Parise ER, de Carvalho L *et al* (2010) Effect of 6-month nutritional intervention on non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrition* **26**, 1094–1099.
65. Abdou RM, Zhu L, Baker RD *et al* (2016) Gut Microbiota of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Dig Dis Sci*, **61**, 1268-1281.
66. Kirpich IA, Marsano LS, McClain CJ (2015) Gut-liver axis, nutrition, and non alcoholic fatty liver disease. *Clin Biochem*, **48**, 923–930.
67. Leung C, Rivera L, Furness JB *et al* (2016) The role of the gut microbiota in NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **13**, 412-25.
68. Ferolla SM, Ferrari, TCA, Lima, MLP *et al* (2013) Dietary patterns in Brazilian patients with non-alcoholic fatty liver disease: a cross-sectional study. *Clinics* **68**, 11-17.
69. Bezerra Duarte SM, Faintuch J, Stefano JT *et al* (2014) Hypocaloric high-protein diet improves clinical and biochemical markers in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Nutr Hosp* **29**, 94-101.
70. Round JL, Mazmanian SK (2009) The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* **9**, 313–323.

Supplementary material

Table 1. Oligonucleotide probes used for microbial quantification by fluorescence in situ hybridization

Probe	Target microbial group	Sequence (5'-3')	FA*	NaCl†	Reference
ARCH 915	Archaea domain	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	20	225	1
LGC 354 A	Firmicutes phylum	TGGAAGATTCCCTACTGC	35	80	2
LGC 354 B		CGGAAGATTCCCTACTGC			
LGC 354 C		CCGAAGATTCCCTACTGC			
HCG 236	Actinobacteria phylum	AACAAGCTGATAGGCCGC	30	112	3
ACIDO 228	Acidobacteria phylum	TAATCDGCCGCGAMCYCCT	35	80	4
ALF 968	Alpha-proteobacteria class	GGTAAGGTTCTGCGTTT	30	112	5
BET 42 a	Beta-proteobacteria class	GCCTTCCACTTCGTTT	30	112	6
GAM 42 a	Gamma-proteobacteria class	GCCTTCCACATCGTTT	30	112	6
EPSY 549	Epsilon-proteobacteria class	CAGTGATTCCGAGTAACG	30	112	7
EUB 338 III	Verrucomicrobiales order	GCTGCCACCCGTAGGTGT	30	112	8
	Bacteroidetes:				
BAC 303	The most Bacteroidaceae, some Prevotellaceae, some Porphyromonadaceae	CCAATGTGGGGGACC	40	56	9
CF 319 a	The most Flavobacteria, some Bacteroidetes, some Sphingobacteria	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	35	80	9
MUT 590	<i>Streptococcus mutans</i>	ACTCCAGACTTTCCTGAC	30	112	10
SOB 174	<i>Streptococcus sobrinus</i>	TTAACTCCTCTTATGCGG			
Aero 2	Some Aeromonas	GTAACGTCACAGCCAGCAGA	35	80	11
RUMs 278	Ruminococcaceae	GTCCGGCTACCGATCGCG	20	225	12
	The most Clostridium	TTATGCGGTATTAATCTYCCTTT	30	112	13
Chis 150	histolyticum (Clostridium cluster I e II)				
Pint 649	<i>Prevotella intermedia</i>	GCCGCCRCTGAASTCAAGCC	40	56	14
Pnig 657	<i>Prevotella nigrescens</i>	TCCGCCTGCGCTGCGTGTA			
Bif 164	<i>Bifidobacterium spp.</i>	CATCCGGCATTACCACCC	20	225	15

(continue)

Probe	Target microbial group	Sequence (5'-3')	FA*	NaCl†	Reference
Lacto 39	Lactobacillus	TCTGTTAGTTCCGCTCGCTC	30	112	16
Lacto 15					
Enc 1259	<i>Enterococcus spp.</i>	GAAGTCGCGAGGCTAAGC	35	80	17
Enter 2	Enterococcus	TCCATCAGCGACACCCGAAA	35	80	16
Efs 129	<i>Enterococcus faecalis</i>	CCCTCTGATGGGTAGGTT	35	80	17
Eco 1167	<i>Escherichia coli</i>	GCATAAGCGTCGCTGCCG	40	56	4
	Bacteroides:				
B/TAFO	Tannerella forsythensis (Bacteroides forsythus)	CGTATCTCATTTTATTCCCCTGTA	30	112	18
Bfrag 602	Bacteroides fragilis group	GAGCCGCAAACCTTTCACAA	30	112	13
Bfrag 998	Bacteroides fragilis	GTTTCCACATCATTCCTACTG	30	112	19

* FA: formamide concentration in hybridization buffer.

† Sodium chloride concentration in washing buffer.

References:

1. Stahl DA, Amann R (1991) Development and application of nucleic acid probes. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons Ltd., New York, p. 205-248.
2. Meier H, Amann R, Ludwig W *et al* (1999) Specific oligonucleotide probes for in situ detection of a major group of gram-positive bacteria with low DNA G+C content. *Syst Appl Microbiol*, **22**,186-196.
3. Erhart R, Bradford D, Robert J *et al* (1997) Development and use of fluorescent in situ hybridization probes for the detection and identification of "*Microthrix parvicella*" in activated sludge. *Syst Appl Microbiol*, **20**, 310–318.
4. Neef A, Amann R, Schleifer KH (1995) Detection of microbial cells in aerosol using nucleic acid probes. *Syst Appl Microbiol*, **18**,113-122.
5. Manz W, Amann R, Ludwig W *et al* (1992) Phylogenic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Syst Appl Microbiol*, **15**, 593–600, 1992.
6. Daims H, Nielsen JL, Nielsen PH, *et al* (2001) In situ characterization of Nitrospira-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Appl Environ Microbiol* **67**, 5273-5284.
7. Manz W, Amann R, Ludwig W *et al* (1996) Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum Cytophaga–Flavobacter–bacteroides in the natural environment. *Microbiology*, **142**, 1097–1106.

8. Lin X, Wakeham SG, Putnam IF *et al* (2006) Comparison of vertical distributions of prokaryotic assemblages in the anoxic Cariaco Basin and Black Sea by use of fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol*, **72**, 2679-2690.
9. Kleinstuber S, Müller FD, Chatzinotas A *et al* (2008) Diversity and in situ quantification of Acidobacteria subdivision 1 in an acidic mining lake. *FEMS Microbiol Ecol*, **63**, 107-117.
10. Trebesius K, Panthel K, Strobel S *et al* (2000) Rapid and specific detection of *Helicobacter pylori* macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent in situ hybridisation. *Gut*, **46**, 608-614.
11. Kyselková M, Kopecký J, Frapolli M. *et al* (2009) Comparison of rhizobacterial community composition in soil suppressive of conducive to tobacco black root rot disease. *ISME J*, **3**, 1127-1138.
12. Xia Y, Massé DI, McAllister TA *et al* (2011) In situ identification of keratin-hydrolyzing organisms in swine manure inoculated anaerobic digesters. *FEMS Microbiol Ecol*, **78**, 451-462.
13. Franks AH, Harmsen HJ, Raangs GC *et al* (1998) Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridisation with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol*, **64**, 3336-3345.
14. Gmür R., Thurnheer T (2002) Direct quantitative differentiation between *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in clinical specimens. *Microbiology*, **148**, 1379-1387.
15. Langendijk PS, Schut F, Jansen GJ *et al* (1995) Quantitative fluorescence in situ hybridisation of bifidobacterium spp., with genus-specific 16S rRNA targeted probes and application in fecal samples. *Appl Environ Microbiol*, **61**, 3069-3075.
16. Demaneche S, Sanguin H, Poté J *et al* (2008) Antibiotic-resistant soil bacteria in transgenic plant fields. *Proc Natl Acad Sci USA*, **105**, 3957-3962.
17. Behr T, Koob C, Schedl M *et al* (2000) A nested array of rRNA targeted probes for the detection and identification of enterococci by reverse hybridization. *Syst Appl Microbiol*, **23**, 563-572.
18. Sunde PT, Olsen I, Göbel UB *et al* (2003) Fluorescent in situ hybridisation (FISH) for direct visualization of bacteria in periapical lesions of asymptomatic root-filled teeth. *Microbiology*, **149**, 1095-1102.
19. Rigottier-Gois L, Rochett V, Garrec *et al* (2003) Enumeration of *Bacteroides* species in human by fluorescent in situ hybridisation combined with flow cytometry using 16S rRNA probes. *Syst Appl Microbiol*, **26**, 110-118.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A prevalência de EHNA tem aumentado com a epidemia da obesidade, mas sua etiologia é multifatorial. A microbiota intestinal parece ter um papel chave no desenvolvimento e progressão de EHNA, porém o conhecimento sobre disbiose é limitado nessa condição, e os resultados dos poucos estudos nessa linha de pesquisa são controversos. No presente estudo, verificamos que pacientes com EHNA apresentam microbiota intestinal diferente de controles saudáveis. Além disso, grupos microbianos investigados nas amostras fecais se correlacionaram com a gravidade da DHGNA e com parâmetros clínicos e dietéticos, sugerindo que a microbiota intestinal provavelmente está envolvida na modulação de fatores de risco para EHNA, constituindo-se em um alvo potencial para o tratamento dessa doença. Ao modificar os hábitos dietéticos, durante três meses, verificamos que a dieta individualizada (em média hipocalórica, principalmente com redução de carboidratos e gorduras, e aumento de fibras), combinada com orientação nutricional, melhorou o perfil metabólico-nutricional de pacientes com EHNA e resultou em efeitos positivos sobre a microbiota intestinal, quando comparada à intervenção com apenas orientação nutricional. Os resultados sustentam a importância do profissional nutricionista na equipe multidisciplinar para o tratamento de EHNA, individualizando a prescrição dietética de acordo com as necessidades nutricionais, preferências e estilo de vida do paciente.

REFERÊNCIAS

- ABDOU, R.M.; ZHU, L.; BAKER, R.D. et al. Gut Microbiota of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Dig. Dis. Sci.**, v. 61, n. 5, p.1268-81, 2016.
- ADIKE, A.; DIBAISE, JK. Small Intestinal Bacterial Overgrowth Nutritional Implications, Diagnosis, and Management. **Gastroenterol Clin N Am**, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.gtc.2017.09.008>.
- ALBERTI, K.G. et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. **Circulation**, v. 20, p. 1640-1645, 2009.
- AMATO, K.R. et al. Variable responses of human and non-human primate gut microbiomes to a Western diet. **Microbiome**, v. 3, n. 53, doi:10.1186/s40168-015-0120-7, 2015.
- ARANHA, M.M. et al. Bile acid levels are increased in the liver of patients with steatohepatitis. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 20, n. 6, p. 519–525, 2008.
- BÄCKHED, F. et al. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. **PNAS**, v.104, n. 3, p. 979-984, 2007.
- BACKHED, F. et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 101, n. 4, p.15718-15723, 2004.
- BACON, B.R. et al. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. **Gastroenterology**, v. 107, n. 4, p. 1103–1109, 1994.
- BAKER, S.S. et al. Role of alcohol metabolism in nonalcoholic steatohepatitis. **PLoS One**, v. 5, n. 3, e9570. doi: 10.1371/journal.pone.0009570, 2010.
- BARAONA, E. et al. Role of intestinal bacterial overgrowth in ethanol production and metabolism in rats. **Gastroenterology**, v. 90, p. 103–110, 1986.
- BEHR, T. et al. A nested array of rRNA targeted probes for the detection and identification of enterococci by reverse hybridization. **Syst Appl Microbiol**, v. 23, p.:563-572, 2000.
- BÖCK, A.; SAWERS, G. “Fermentation,” in *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, 2nd Edn., eds F.C.Neidhardt, R.Curtiss III, J.L.Ingraham,

E.C.C.Lin, K.Brooks Low, B.Magasanik, B. Reznikoff, M.Riley, M.Schaechter, and H.E.Umberger (Washington, DC:ASM Press), p. 262–282, 1996.

BOURSIER, J. et al. The severity of nonalcoholic fatty liver disease is associated with gut disbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota. **Hepatology**, v. 63, n. 3, p. 764-775, 2016.

BRANDL, K.; SCHNABL, B. Intestinal microbiota and nonalcoholic steatohepatitis. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 33, p. 128–133, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia alimentar para a população brasileira / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – 2. ed., 1. reimpr. – Brasília : Ministério da Saúde, 156 p.: il. ISBN 978-85-334-2176-9, 2014.

BREUSING, N. et al. Influence of Energy Balance and Glycemic Index on Metabolic Endotoxemia in Healthy Men. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 0, n. 0, p. 1–8. 2017.

BRINKWORTH, G.D. et al. Comparative effects of very low-carbohydrate, high-fat and highcarbohydrate,low-fat weight-loss diets on bowel habit and fecal short-chain fatty acids and bacterial populations. **British Journal of Nutrition**, v. 101, p.1493–1502, 2009.

BROWNING, J.D. et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. **Hepatology**, v. 40, n. 6, p.1387–1395, 2004.

BRUN, P. et al. Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.**, v. 292, p. 518–525, 2007.

BUZZETT, E.; PINZANI, M.; TSOCHATZIS, E.A. The multiple-hit pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Metabolism**, v. 65, n. 8, p.1038-1048, 2016.

CANI, P.D. et al. Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet–Induced Obesity and Diabetes in Mice. **Diabetes**, v. 57, p. 1470–1481, 2008.

CANI, P.D. et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v. 56, n.7, p. 1761-1772, 2007.

CHALASANI, N. et al. The Diagnosis and Management of Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases,

American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. **Am J Gastroenterol**, v. 107, p. 811– 826, 2012.

CHEN, Y-m. et al. Associations of gut-flora-dependent metabolite trimethylamine-N-oxide, betaine and choline with nonalcoholic fatty liver disease in adults. **Sci. Rep.**, v. 6, n. 19076, 2016.

CHOI, C.H.; CHANG, S.K. Role of small intestinal bacterial overgrowth in functional gastrointestinal disorders. **J. Neurogastroenterol. Motil.**, v. 22, n. 1, p. 3-5, 2016.

CHOLANKERIL, G. et al. Non-alcoholic fatty liver disease: Epidemiology, natural history and diagnostic challenges. **Hepatology**, v. 64, n. 3, p. 954, 2016.

CLAUDEL, T.; STAELS, B.; KUIPERS, F. The Farnesoid X Receptor: A Molecular Link Between Bile Acid and Lipid and Glucose Metabolism. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** v. 25, p. 2020-2031, 2005.

CONLON, et al. Nutritional Management of Insulin Resistance in Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). **Nutrients**, v. 5, n. 10, p. 4093-4114, 2013.

COPE, K.; RISBY, T.; DIEHL, A.M. Increased Gastrointestinal Ethanol Production in Obese Mice: Implications for Fatty Liver Disease Pathogenesis. **Gastroenterology**, v. 119, p. 1340–1347, 2000.

COPPLE, B.L.; LI, T. Pharmacology of Bile Acid Receptors: Evolution of Bile Acids from Simple Detergents to Complex Signaling Molecules. **Pharmacol. Res.**, v.104, p. 9–21, 2016.

CORAZZA, G.R. et al. The diagnosis of small bowel bacterial overgrowth. Reliability of jejunal culture and inadequacy of breath hydrogen testing. **Gastroenterology**, v. 98, n. 2, p. 302-309, 1990.

COSTELLO, E.K. et al. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. **Science**, v. 18, n. 326, Supl. 5960, p. 1694–1697, 2009.

COTILLARD, A. et al. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. **Nature**, v. 29, n. 500, p. 585-588, 2013.

COTRIM, H.P. et al. Nonalcoholic fatty liver disease in Brazil. Clinical and histological profile. **Annals of Hepatology**, v. 10, n. 1, p. 33-37.

CSAK, T. et al. Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells. **Hepatology**, v. 54, n. 1, p. 133-144, 2011.

- DAIMS, H. et al. In situ characterization of Nitrospira-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, p. 5273-5284, 2001.
- DAWSON, P.A.; KARPEN, S.J. Intestinal transport and metabolism of bile acids. **J. Lipid. Res.**, v. 56, p. 1085–1099, 2015.
- DAY, C.P.; JAMES, O.F. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? **Gastroenterology**, v. 114, n. 4, p. 842-845, 1998.
- DE FILIPPO, C. et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. **PNAS**, v. 107, n. 33, p. 14691–14696, 2010.
- DE MINICIS, S. et al. Dysbiosis contributes to fibrogenesis in the course of chronic liver injury in mice. **Hepatology**, v. 59, n. 5, p. 1738-1749, 2014.
- DEL CHIERICO, F. et al. Gut microbiota profiling of pediatric nonalcoholic fatty liver disease and obese patients unveiled by an integrated meta-omics-based approach. **Hepatology**, v. 0, n. 0, p.000-000, doi:0.1002/hep.28572, 2016.
- DEMANECHE, S. et al. Antibiotic-resistant soil bacteria in transgenic plant fields. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 105, p.: 3957-3962, 2008.
- DEPARTMENT OF NUTRITION FOR HEALTH AND DEVELOPMENT, WHO. WHO Global Database on Body Mass Index (BMI): An Interactive Surveillance Tool for Monitoring Nutrition Transition. **Public Health Nutrition**. v. 9, p. 658-660, 2006.
- DEWULF, E.M. et al. Evaluation of the relationship between GPR43 and adiposity in human. **Nutr Metab** v. 22, n. 0, p.712-722, 2013.
- DONNELLY, K.L. et al. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **J. Clin. Invest.**, v. 115, n. 5, p. 1343-1351, 2005.
- DRENICK; E.J.; FISLER, J., JOHNSON, D. Hepatic steatosis after intestinal by-pass. Prevention and reversal by metronidazole irrespective of protein-calorie malnutrition. **Gastroenterology**, v. 82, n. 3, p. 535-548, 1982.
- DUNCAN, S.H. et al. Reduced dietary intake of carbohydrate, by obese subjects, results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, n. 4, p. 1073–1078, 2007.

DUSEJA, A.; CHAWLA, Y.K. Obesity and NAFLD: the role of bacteria and microbiota”, **Clin. Liver Dis.**, v. 18, n 1, p. 59-71, 2014.

EASL–EASD–EASO. Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. **J. Hepatol.**, v. 64, n. 6, p. 1388-402, 2016.

EKSTEDT, M. et al. Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. **Hepatology**, v.61, n. 5, p.1547–1554, 2015.

EKSTEDT, M. et al. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. **Hepatology**, v. 44, n. 4, p. 865–873, 2006.

ELIAS M.C. et al. Effect of 6-month nutritional intervention on non-alcoholic fatty liver disease. **Nutrition**, v. 26, p. 1094–1099, 2010.

ELSHAGHABEE, F.M.F. et al. Ethanol Production by Selected Intestinal Microorganisms and Lactic Acid Bacteria Growing under Different Nutritional Conditions. **Front. Microbiol.**, v. 7, n. 47, p. 1-13, 2016.

EREJUWA, O.O.; SULAIMAN, S.A.; WAHAB, M.A.S. Modulation of Gut Microbiota in the Management of Metabolic Disorders: The Prospects and Challenges. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 15, n. 3, p. 4158-4188, 2014.

ERHART, R. et al. Development and use of fluorescent in situ hybridization probes for the detection and identification of “*Microthrix parvicella*” in activated sludge. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 20, p. 310–318, 1997.

FALUDI, A.A. et al. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 109, n. 2, Supl.1, p. 1-76, 2017.

FAUBION, W.A. et al. Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. **J. Clin. Invest.**, v. 103, n.1, p. 137–145, 1999.

FAVA, F. et al. The type and quantity of dietary fat and carbohydrate alter fecal microbiome and short-chain fatty acid excretion in a metabolic syndrome ‘at-risk’ population. **International Journal of Obesity**, v. 37, n. 2, p. 216-223, 2013.

FELDSTEIN, A.E. et al. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- α expression via a lysosomal pathway. **Hepatology**, v. 40, n.1, p. 185-194, 2004.

FENG, W. et al. Modulation of gut microbiota contributes to curcumin-mediated attenuation of hepatic steatosis in rats. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1861, n. 7, p. 1801-1812, 2017.

FENG-BIN, L. et al. The relationship between obesity and the severity of non-alcoholic fatty liver disease: systematic review and meta-analysis, *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, DOI: 10.1080/17474124.2018.1460202, 2018.

FEROLLA, S.M. et al. Dietary patterns in Brazilian patients with non-alcoholic fatty liver disease: a cross-sectional study. **Clinics**, v. 68, n. 1, p.11-17, 2013.

FERSLEW, B.C. et al. Altered Bile Acid Metabolome in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis. **Dig. Dis. Sci.**, v. 60, n. 11., p. 3318-3328, 2015.

FORSYTH, C.B. et al. Role of snail activation in alcohol-induced iNOS-mediated disruption of intestinal epithelial cell permeability. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 35, n. 9, p. 1635-1643, 2011.

FRANKS, A.H. et al. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridisation with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. **App Environ Microbiol**, v. 64, p. 3336-3345, 1998.

FRIEDEWALD, W.T.; LEVY, R.I.; FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin. Chem.**, v. 18, p. 499-502, 1972.

GAO, X. et al. Dietary trimethylamine N-oxide exacerbates impaired glucose tolerance in mice fed a high fat diet. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 118, n.4, p. 476–481, 2014.

GHOSH, S. et al.: Diets rich in n-6 PUFA induce intestinal microbial dysbiosis in aged mice. **Br. J. Nutr.**, v. 110, n. 3, p. 515–23, 2013.

GMÜR, R.; THURNHEER, T. Direct quantitative differentiation between *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in clinical samples. **Microbiology**, v. 148, p.: 1379-1387.

GUERRERIO, A.L. et al. Choline intake in a large cohort of patients with nonalcoholic fatty liver disease. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 95, n. 4, p. 892–900, 2012.

GUSTOT, T. et al. Differential liver sensitization to toll-like receptor pathways in mice with alcoholic fatty liver. **Hepatology**, v. 43, n. 5, p. 989-1000, 2006.

HARTE, A.L. et al. Elevated endotoxin levels in nonalcoholic fatty liver disease. **J. Inflamm.**, v. 7, n. 15, p. 2-22, 2010.

HENAO-MEJIA, J. et al. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. **Nature**, v. 482, n. 7384, p. 179–185, 2012.

HUNNISETT, A.; HOWARD, J.; DAVIES, S. Gut fermentation (or autobrewery) syndrome. A new clinical test with initial observations and discussion of clinical and biological implications. **J. Nutr. Med.**, v. 1, p. 33–38, 1990.

IMAJO, K. et al. Hyperresponsivity to lowdose endotoxin during progression to nonalcoholic steatohepatitis is regulated by leptin-mediated signaling”, **Cell. Metab.**, v. 16, n. 1, p. 44–54, 2012.

INSTITUTE OF MEDICINE. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. Washington (DC): **National Academy Press**; 2005, 1132p.

JAESCHKE, H., WANG, Y.; ESSANI, N.A. Reactive oxygen species activate the transcription factor NF- κ B in the liver by induction of lipid peroxidation (abstr). **Hepatology**, 24:238A, 1996.

JIA, X. et al. Dysregulated Bile Acid Synthesis, Metabolism and Excretion in a High Fat-Cholesterol Diet-Induced Fibrotic Steatohepatitis in Rats. **Dig. Dis. Sci.**, v. 58, n. 8, p.2212–2222, 2013.

JIN, R, et al. Fructose induced endotoxemia in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. **Inter. J Hepatol.**, v. 2014, n. 560620, p. 1-8, 2014.

JUMPERTZ, R. et al. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 94, n. 1, p. 58-65, 2011.

KALHAN, S. et al. Plasma Metabolomic Profile in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Metabolism.**, v. 60, n. 3, p. 404–413, 2011.

KASHTANOVA, D.A. et al. Association between the gut microbiota and diet: Fetal life, early childhood, and further life. **Nutrition**, v. 32, n. 6, p. 620-627, 2016.

KHO, Z.Y.; LAL, S.K. The human gut microbiome – a potential controller of wellness and disease. *front. microbiol.* 9:1835.doi: 10.3389/fmicb.2018.01835, 2018.

KIM, M.S. et al. Strict vegetarian diet improves the risk factors associated with metabolic diseases by modulating gut microbiota and reducing intestinal inflammation. **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, n. 5, p. 765–775, 2013.

KIRPICHA, I.A. et al. Gut-liver axis, nutrition, and non alcoholic fatty liver disease. **Clin. Biochem.**, v. 48, n. 0, p. 923–930, 2015.

KIRSCH, R. et al. Rodent nutritional model of steatohepatitis: effects of endotoxin (lipopolysaccharide) and tumor necrosis factor alpha deficiency. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 21, n. 1, Pt 1, p.174–82, 2006.

KLEINER, D.E. et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 41, n. 6, p. 1313-1321, 2005.

KLEINSTUBER, S. H., et al. Diversity and in situ quantification of Acidobacteria subdivision 1 in an acidic mining lake. **FMS Microbiol. Ecol.**, v. 63, p. 107-117, 2008.

KOVATCHEVA-DATCHARY; P. et al. Nutrition, the gut microbiome and the metabolic syndrome. **Best Prac. Res. Clin. Gastroenterol.**, v. 27, n. 1, p. 59–72, 2013.

KRAJICEK, E.J. Small Intestinal Bacterial Overgrowth: A Primary Care Review. **Mayo Clin Proc**, v. 9, n. 12, p. 1828-1833, 2016.

KYLE, U.G. et al. Bioelectrical impedance analysis—part I: review of principles and methods. **Clin. Nutr.**, v. 23, n. 5, p. 1226–1243, 2004.

KYSELKOVA, M. et al. Comparison of rhizobacterial community composition in soil suppressive of conducive to tobacco black root rot disease. **ISME J**, v. 3, p.1127-1138, 2009.

LANGENDIJK, P.S. et al. Quantitative fluorescence in situ hybridisation of bifidobacterium spp., with genus-specific 16S rRNA targeted probes and application in fecal samples. **Appl Enviromen Microbiol**, v. 61, p. 3069-3075, 1995.

LAUGERETTE, F. et al. Oil composition of high-fat diet affects metabolic inflammation differently in connection with endotoxin receptors in mice. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 302, n. 3, p. 374-386, 2012.

LAZO, M. et al. Non-alcoholic fatty liver disease and mortality among US adults: prospective cohort study. **BMJ**, v. 18, n. 343, p. 1-9, 2011.

LE CHATELIER, E. et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. **Nature**, v. 500, n. 7464, p. 541–546, 2013.

LE ROY, T. et al. Intestinal microbiota determines development of nonalcoholic fatty liver disease in mice. **Gut**, v. 62, n. 12, p. 1787–1794, 2013.

LECLERQ, I.A. et al. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. **J. Clin. Invest.**, v. 105, n. 8, p. 1067-1075, 2000.

LEE, K.S. et al. Activation of hepatic stellate cells by TGF alpha and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myc expression. **J. Clin. Invest.**, v. 96, n. 5, p. 2461–2468, 1995.

LEPAGE, P. et al. A metagenomic insight into our gut's microbiome. **Gut**, v. 62, n.1, p. 146–158, 2013.

LEUNG, C. et al. The role of the gut microbiota in NAFLD. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 13, n. 7, p. 412-25, 2016.

LIN X, et al. Comparison of vertical distribution of prokaryotic assemblages in the anoxic Cariaco Basin and Black Sea by use of fluorescence in situ hybridization. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, p. 2679-2690, 2006.

LIU, W. et al. Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. **Cell. Mol. Life. Sci.**, v. 73, n. 10, p. 1969-1987, 2016.

LOPEZ-LEGARREA, P. et al. The influence of Mediterranean, carbohydrate and high protein diets on gut microbiota composition in the treatment of obesity and associated inflammatory state. **Asia Pac. J. Clin. Nutr.**, v. 23, n. 3, p. 360-368, 2014.

LORENZO-ZÚÑIGA, V. et al. Oral bile acids reduce bacterial overgrowth, bacterial translocation, and endotoxemia in cirrhotic rats. **Hepatology**, v. 37, n. 3, p. 551–557, 2003.

LOSEKANN, A. et al. Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH): Risk Factors in Morbidly Obese Patients. **Int. J. Mol. Sci.**, v.16, n. 10, p. 25552-25559, 2015.

LUYENDYK, J.P. et al. Role of hepatic fibrin in idiosyncrasy-like liver injury from lipopolysaccharide-ranitidine coexposure in rats. **Hepatology**, v. 40, n. 6, p. 1342–51, 2004.

LYTE, J.M. et al. Postprandial serum endotoxin in healthy humans is modulated by dietary fat in a randomized, controlled, cross-over study. **Lipids in Health and Disease**, v. 15, n. 186, p. 1-10, 2016.

MALAGUARNERA, M, et al. Bifidobacterium longum with fructo-oligosaccharides in patients with non alcoholic steatohepatitis. **Dig Dis Sci**, v. 57, p. 545–553, 2012.

MANCO; M., PUTIGNANI, L.; BOTTAZZO, G.F. Gut Microbiota, Lipopolysaccharides, and Innate Immunity in the Pathogenesis of Obesity and Cardiovascular Risk. **Endocrine Reviews**, v. 31, n. 6, p. 817–844, 2010.

MANZ, W. et al. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum Cytophaga–Flavobacter–bacteroides in the natural environment. **Microbiology**, v. 142, p. 1097–1106, 1996.

MANZ, W. et al. Phylogenic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 15, p. 593–600, 1992.

MARI, M. et al. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. **Cell. Metab.**, v. 4, n. 3, p. 185-198, 2006.

MARTEAU, P.; SHANAHAN, F. Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 17, p.7257-40, 2003.

MATSUDO, S.M. et al. (2002) Nível de atividade física da população do Estado de São Paulo: análise de acordo com o gênero, idade, nível socioeconômico, distribuição geográfica e de conhecimento. *Rev Bras Ciên e Mov* 10, 41-50.

MATTEONI, C.A. et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. **Gastroenterology**, v. 116, n. 6, p. 1413-1419, 1999.

MATTHEWS, D.R. et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v. 28, n. 7, p. 412-419, 1985.

MCMANUS, I.R.; CONTAG, A.O.; OLSON, R.E. Characterization of endogenous ethanol in the mammal. **Science**, v. 131, p. 102–103, 1960.

MEDEIROS, J.D. et al. Characterization of the microbial community in a lotic environment to assess the effect of pollution on nitrifying and potentially pathogenic bacteria. **Braz. J. Biol.**, v. 74, n. 3, p. 612-622, 2014.

MEIER, H. et al. Specific oligonucleotide probes for in situ detection of a major group of gram-positive bacteria with low DNA G+C content. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 22, p. 186-196, 1999.

MENDEZ-SANCHEZ, N. et al.. Current concepts in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. **Liver Int.** v. 27, p. 423-433, 2007.

MIELE, L. et al. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 49, n. 6, p. 1877-1887, 2009.

MILIĆ; S.; LULIĆ, D.; ŠTIMAC, D. Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: Biochemical, metabolic and clinical presentations. **World J. Gastroenterol.**, v. 20, n. 28, p. 9330-9337, 2014.

MILLIGAN, G. Agonism and allosterism: the pharmacology of the free fatty acid receptors FFA2 and FFA3. **Br. J. Pharmacol.**, v. 158, n. 1, p. 146–153, 2009.

MITTENDORFER, B. et al. VLDL triglyceride kinetics in lean, overweight, and obese men and women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 101, n.11, p. 4151–4160, 2016.

MIURA, K. et al. Toll-like receptor 9 promotes steatohepatitis by induction of interleukin-1beta in mice. **Gastroenterology**, v. 139, n. 1, p. 323-334, 2010.

MOUZAKI, M. et al. Bile Acids and Dysbiosis in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, e0151829, 2016.

MOUZAKI, M.; COMELLI, E.M.; ARENDT, B.M. Intestinal microbiota in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 58, n. 1, p. 120-127, 2013.

MUJICO, J.R. et al.: Changes in gut microbiota due to supplemented fatty acids in diet-induced obese mice. **Br. J. Nutr.**, v. 110, n. 4, p. 711–20, 2013.

MURPHY, E.A.; VELAZQUEZ, K.T.; HERBERT, K.M. Influence of high-fat-diet on gut microbiota: a driving force for chronic disease risk. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.**, v. 18, n. 5, p. 515–520, 2015.

NAIR, S. et al. Obesity and female gender increase breath ethanol concentration: potential implications for the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 96, n. 4, p. 1200–1204, 2001.

NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CARE EXCELLENCE. Nonalcoholic fatty liver disease: assessment and management. NICE Guideline NG49, Methods, evidence and recommendations. ISBN: 978-1-4731-1955-0. nice.org.uk/guidance/ng49, 2016.

NEEF, A. Anwendung der in situ Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populationsanalyse in komplexen mikrobiellen Biozonen. **Dissertation**, Technische Universität, München, 1997.

NEEF, A.; AMANN, R. SCHLEIFER, K.H. Detection of microbial cells in aerosol using nucleic acid probes. **Syst Appl Microbiol**, v. 18, p.:113-122, 1995.

NOSOVA, T. et al. Aldehyde dehydrogenase activity and acetate production by aerobic bacteria representing the normal flora of human large intestine. **Alcohol Alcohol**, v. 31, n. 6, p. 555-64, 1996.

OBREGON-TITO, A.J. et al. Subsistence strategies in traditional societies distinguish gut microbiomes. **Nat. Comm.**, v. 25, n. 6, 6505, 2015.

OLIVEIRA, C.P. et al. Nutrition and Physical Activity in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **J Diabetes Res.**, 4597246, 2016.

ORMAN, E.S. et al. Declining liver utilization for transplantation in the United States and the impact of donation after cardiac death. **Liver Transpl.**, v. 19, n. 1, p. 59–68, 2013.

OSEINI, A.M.; SANYAL, A.J. Therapies in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). **Liver International**, v. 37, n. 1, p. 97–103, 2017.

OSMAN, N. et al. Endotoxin- and D-galactosamine-induced liver injury improved by the administration of Lactobacillus, Bifidobacterium and blueberry. **Dig. Liver Dis.**, v. 39, n. 9, p. 849-856, 2007.

OUYANG, X. et al. Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease. **J. Hepatol.**, v. 48, n. 6, p. 993–999, 2008.

PARK, J.S.; SEO, J.H.; YOUN, H-S. Gut microbiota and clinical disease: obesity and nonalcoholic fatty liver disease. **Pediatr. Gastroenterol. Hepatol. Nutr.**, v. 16, n.1, p. 22-27, 2013.

PARLESAK, A. et al. Conjugated primary bile salts reduce permeability of endotoxin through intestinal epithelial cells and synergize with phosphatidylcholine in suppression of inflammatory cytokine production. **Crit. Care Med.**, v. 35, n. 10, p. 2367–2374, 2007.

PAROLA, M. et al. Stimulation of lipid peroxidation or 4-hydroxynonenal treatment increases procollagen alpha 1(I) gene expression in human liver fat-storing cells. **Biochim. Biophys. Res. Commun.**, v. 194, n. 3, p. 1044–1050, 1993.

PELZ, S. et al. A methionine-choline-deficient diet elicits NASH in the immunodeficient mouse featuring a model for hepatic cell transplantation. **Experimental Cell. Research.** v. 318, n. 3, p. 276–287, 2012.

PENDYALA, S.; WALKER, J.M.; HOLT, P.R. A High-Fat Diet Is Associated With Endotoxemia That Originates From the Gut. **Gastroenterology**, v. 142, n. 5, p. 1100–1101, 2012.

PESSAYRE, D. et al. Mitochondria in steatohepatitis. **Semin. Liver Dis.**, v. 21, n. 1, p. 57-69, 2001.

PIMENTEL, M. et al. A 14-day elemental diet is highly effective in normalizing the lactulose breath test. **Dig Dis Sci**, v. 49, p. 73–77, 2004.

POCOCK, S.J. *Clinical Trials: a practical approach*. John Wiley & Sons, Chichester — New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 265 S, 1983.

POLIMENI, L.; DEL BEM, M.; BARATTA, F. Oxidative stress: New insights on the association of nonalcoholic fatty liver disease and atherosclerosis. **World J. Hepatol.**, v. 7, n. 10, p. 1325-1336, 2015.

PONZIANI, F.R. et al. Diagnosis and treatment of small intestinal bacterial overgrowth. Expert Review of **Gastroenterology & Hepatology**, 2015.
<http://dx.doi.org/10.1586/17474124.2016.1110017>

PROMRAT, K, et al. Randomized Controlled Trial Testing the Effects of Weight Loss on Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH). **Hepatology**, v. 51, n. 1, p. 121–129, 2010.

RAJILIC-STOJANOVIC, M. Function of the microbiota. **Best Prac. Res. Clin. Gastroenterol.**, v. 27, n. 1, p. 5–16, 2013.

RAUBENHEIMER, P.J.; NYIRENDA, M.J.; WALKER, B.R. A choline-deficient diet exacerbates fatty liver but attenuates insulin resistance and glucose intolerance in mice fed a high-fat diet. **Diabetes**, v. 55, n. 7, p. 2015–2020, 2006.

REZAIE, A. et al. Hydrogen and Methane-Based Breath Testing in Gastrointestinal Disorders: The North American Consensus. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 112, n. 5, p. 775-784, 2017.

REZAIE, A.; PIMENTEL, M.; RAO, S.S. How to test and treat small intestinal bacterial overgrowth: an evidence-based approach. **Curr Gastroenterol Rep**, v.18, n. 2, p. 8, 2016.

RIBEIRO, A.C. et al. Validação de um questionário de frequência de consumo alimentar para população adulta. **Rev Nutr.**, v. 19, n. 5, p. 553-562, 2006.

RIGOTTIER-GOIS, L.; ROCHETT, V; GARREC, N; SUAUA, A; DORE, J. Enumeration of Bacteroides species in human by fluorescent in situ hybridisation combined with flow cytometry using 16 S rRNA probes. **Syst Appl Microbiol**, v. 26, p.: 110-118.

ROUND, J.L.; MAZMANIAN, S.K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 9, p. 313–323, 2009.

- RUIZ, A.G. et al. Lipopolysaccharide-binding protein plasma levels and liver TNF- α gene expression in obese patients: Evidence for the potential role of endotoxin in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. **Obes. Surg.**, v. 17, p. 1374–1380, 2007.
- SAAD, R.J.; CHEY, W.D. Breath Testing for Small Intestinal Bacterial Overgrowth: Maximizing Test Accuracy. **Clin. Gastroenterol. Hepatol.**, v.12, n. 12, p. 1964–1972, 2014.
- SADEGHI, S.; WALLACE, F.A.; CALDER, P.C. Dietary lipids modify the cytokine response to bacterial lipopolysaccharide in mice. **Immunology**, v. 96, n. 3, p. 404-410, 1999.
- SALONEN, A. et al. Impact of diet and individual variation on intestinal microbiota composition and fermentation products in obese men. **ISME Journal**, v. 8, n.11, p. 2218–2230, 2014.
- SANTACRUZ, A. et al. Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. **Obesity**, v. 17, n. 10, p. 1906–1915, 2009.
- SAYIN, S.I. et al. Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of taurobeta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist. **Cell Metab.**, v. 17, n. 2, p. 225–235, 2013.
- SCHAAP, F.G.; TRAUNER, M.; JANSEN, P.L. Bile acid receptors as targets for drug development. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 11, n. 1, p. 55-67, 2013.
- SCHEITHAUER, T.P.M. et al. Causality of small and large intestinal microbiota in weight regulation and insulin resistance. **Molecular Metabolism**, v. 5, n. 9, p. 759-770, 2016.
- SCHWENGER, K.J.P.; ALLARD, J.P. Clinical approaches to nonalcoholic fatty liver disease. **World J. Gastroenterol.**, v. 20, n. 7, p. 1712-1723, 2014.
- SCHWIERTZ, A. et al. Microbiota and SCFA in Lean and Overweight Healthy Subjects. **Obesity**, v. 18, n. 1, p. 190–195, 2009.
- SENDER, R.; FUCHS, S.; MILO, R. Are we really vastly outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans. **Cell**, v. 164, n. 3, p. 337–340, 2016.
- SHANAB, A.A. et al. Small intestinal bacterial overgrowth in nonalcoholic steatohepatitis: association with toll-like receptor 4 expression and plasma levels of interleukin 8. **Dig. Dis. Sci.**, v. 56, n. 5, p.1524-1534, 2011.
- SHIH, D.M. et al. Flavin containing monooxygenase 3 exerts broad effects on glucose and lipid metabolism and atherosclerosis. **J. Lipid. Res.**, v. 56, n. 1, p. 22–37, 2015.

SPENCER, M.D. et al. Association between composition of the human gastrointestinal microbiome and development of fatty liver with choline deficiency. **Gastroenterology**, v. 140, n. 3, p. 976-986, 2011.

SPRUSS, A. et al. Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. **Hepatology**, v. 50, n. 4, p.1094–1104, 2009.

STAHL, D.A.; AMANN R. Development and application of nucleic acid probes. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds) **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. John Wiley & Sons Ltd., New York, p. 205-248, 1991.

STEFAN, N.; HÄRING, H-U, CUSI, K. Non-alcoholic fatty liver disease: causes, diagnosis, cardiometabolic consequences, and treatment strategies. [http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587\(18\)30154-2](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587(18)30154-2), 2018.

SU, G.L. Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 283, n.2, p. 256–265, 2002.

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

SZABO, G.; CSAK, T. Inflammasomes in liver diseases. **J. Hepatol.**, v. 57, n. 3, p. 642-54, 2012.

TAKAKI, A.; KAWAI, D.; YAMAMOTO, K. Multiple Hits, Including Oxidative Stress, as Pathogenesis and Treatment Target in Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH). **Int. J. Mol. Sci.**, v. 14, n. 10, p. 20704-20728, 2013.

TERPEND, K. et al. Arabinogalactan and fructo-oligosaccharides have a different fermentation profile in the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME (R)). **Environ. Microbiol. Rep.**, v. 5, n.4, p. 595-603, 2013.

THIELMAN, N.M.; GUERRANT, R.L. Clinical practice: acute infectious diarrhea. **N. Engl. J. Med.**, v. 350, n. 1, p. 38–47, 2004.

THURNHEER, T.; GMÜR, R.; GUGGENHEIM, B. Multiplex FISH analysis of a six-species bacterial biofilm. **J Microbiol Methods**, v. 56, p. 37-47, 2004.

THUY, S. et al. Nonalcoholic fatty liver disease in humans is associated with increased plasma endotoxin and plasminogen activator inhibitor 1 concentrations and with fructose intake. **J. Nutr.**, v. 138, n. 8, p. 1452-5, 2008.

TIJERA, F.H.; SERVÍN-CAAMAÑO, A.I. Pathophysiological mechanisms involved in nonalcoholic steatohepatitis and novel potential therapeutic targets. **World J. Hepatol.**, v. 7, n. 10, p. 1297-1301, 2015.

TILG, H.; MOSCHEN, A.R. Evolution of Inflammation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The Multiple Parallel Hits Hypothesis. **Hepatology**, v. 52, n. 5, p. 1836-1846, 2010.

TITTERUD, S.P. et al. Fluorescent in situ hybridisation (FISH) for direct visualization of bacteria in periapical lesions of asymptomatic root-filled teeth. **Microbiology**, v. 149, p.:1095-1102.

TREBESIUS, K. et al. Rapid and specific detection of *Helicobacter pylori* macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent in situ hybridisation. **Gut**, v. 46, n. 5, p.: 608-614, 2000.

TURNBAUGH, P.J. et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. **Nature**, v. 457, n. 7228, p. 480–484, 2009.

TURNBAUGH, P.J. et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, v. 444, n. 7122, p. 1027-1031, 2006.

UEYAMA, J. et al. Endotoxin from various gram-negative bacteria has differential effects on function of hepatic cytochrome P450 and drug transporters. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 510, p. 127-134, 2005.

ULVEN, T. Short-chain free fatty acid receptors FFA2/ GPR43 and FFA3/GPR41 as new potential therapeutic targets. **Front. Endocrinol. (Lausanne)**, v. 3, n. 111, p.1-9, 2012.

VAMANU, E.; PELINESCU, D.; SARBU, I. Comparative Fingerprinting of the Human Microbiota in Diabetes and Cardiovascular Disease. **J. Med. Food.**, v. 19, n. 12, p. 1188-1195, 2016.

VILAR-GOMEZ, E. et al. Weight Loss via lifestyle modification significantly reduces features of nonalcoholic steatohepatitis. **Gastroenterology**, 2015. doi: 10.1053/j.gastro.2015.04.005.

VOLYNETS, V. et al. Nutrition, Intestinal Permeability, and Blood Ethanol Levels Are Altered in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). **Dig. Dis. Sci.**, v. 57, n. 7, p. 1932–1941, 2012.

WAGNERBERGER, S. et al. Toll-like receptors 1–9 are elevated in livers with fructose-induced hepatic steatosis. **Br. J. Nutr.**, v. 107, n. 12, p. 1727–1738, 2012.

- WALSH, C.J. et al. Beneficial modulation of the gut microbiota. **FEBS Lett.** v.17, n. 588, p. 4120-4130, 2014.
- WALTON, G.E. et al. A randomised, double-blind, placebo controlled cross-over study to determine the gastrointestinal effects of consumption of arabinoxylan-oligosaccharides enriched bread in healthy volunteers. **Nutr. J.**, v. 11, n. 36, p. 1-30, 2012.
- WANG, B. et al. Altered fecal microbiota correlates with liver biochemistry in nonobese patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Sci. Rep.**, v. 6, n. 32002, p. 1-11, 2016.
- WANLESS, I.R.; LENTZ, J.S. Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. **Hepatology**, v. 12, n. 5, p. 1106–1110, 1990.
- WHITE, D.L.; KANWAL, F.; EL-SERAG, H.B. Association between nonalcoholic fatty liver disease and risk for hepatocellular cancer, based on systematic review. **Clin. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 10, n. 12, p. 1342–1359, 2012.
- WIGG, A.J. et al. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor α in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. **Gut**, v.48, n. 2, p. 206–211, 2001.
- WOLEVER, T.M. et al. Effect of rectal infusion of short chain fatty acids in human subjects. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 84, n. 9, p. 1027–1033, 1989.
- WONG, R.J. et al. Nonalcoholic steatohepatitis is the second leading etiology of liver disease among adults awaiting liver transplantation in the United States. **Gastroenterology**, v. 148, n. 3, p. 547-555, 2015.
- WONG, VW-S. et al. Molecular characterization of the fecal microbiota in patients with nonalcoholic steatohepatitis—a longitudinal study. **PLoS One**, v. 8, n. 4, e62885, 2013.
- WU, G.D. et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. **Science**, v. 334, n. 6052, p. 105–108, 2011.
- XIA, Y. et al. In situ identification of keratin-hydrolyzing organisms in swine manure inoculated anaerobic digesters. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 78, n.3, p. 451-462, 2011.
- XIAO, G et al. Eicosapentaenoic acid enhances heatstroke-impaired intestinal epithelial barrier function in rats. **SHOCK**, v. 44, n. 4, p. 348–356, 2015
- XIE, G. et al. Distinctly altered gut microbiota in the progression of liver Disease. **Oncotarget**, v. 7, n. 15, p. 19355-19366, 2016.

XING, H.C. et al. Protective role of supplement with foreign Bifidobacterium and Lactobacillus in experimental hepatic ischemia-reperfusion injury. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 21, p. 647-656, 2006.

XU, Z.; KNIGHT, R. Dietary effects on human gut microbiome diversity. **Br. J. Nutr.**, v. 113, p. 1-5, 2015.

XUE, L. et al. Probiotics may delay the progression of nonalcoholic fatty liver disease by restoring the gut microbiota structure and improving intestinal endotoxemia. **Scientific Reports**, v. 7, n. 45176, p. 1-13, 2017.

YAMAGUCHI, K. et al. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, v. 45, n. 6, p. 1366-74, 2007.

YANG, M. et al. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Children: Focus on Nutritional Interventions. **Nutrients**, v. 6, n. 11, p. 4691-4705, 2014.

YANG, S.Q. et al. Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 94, p. 2557-2562, 1997.

YATSUNENKO, T. et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 222-227, 2012.

YE, D. et al. Toll-like receptor-4 mediates obesity-induced nonalcoholic steatohepatitis through activation of X-box binding protein-1 in mice. **Gut**, v. 61, n. 7, p. 1058-1067, 2012.

YKI-JÄRVINEN, H. Nutritional modulation of non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance. **Nutrients**, v. 7, n. 11, p. 9127-9138, 2015.

ZELBER-SAGI, S.; RATZIU, V.; OREN, R. Nutrition and physical activity in NAFLD: an overview of the epidemiological evidence. **World J Gastroenterol**, v. 17, p. 3377-3389, 2011.

ZHANG, C. et al. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. **ISME J**, v. 4, n. 2, p. 232-241, 2010.

ZHANG, C. et al. Structural modulation of gut microbiota in life-long calorie-restricted mice. **Nat. Commun.**, v. 4, n. 2163, p. 1-10, 2013.

ZHERNAKOVA, A. et al. Population-based metagenomics analysis reveals markers for gut microbiome composition and diversity. **Science**, v. 352, n. 6285, p. 565-569, 2016.

ZHU, L. et al. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH. **Hepatology**, v. 57, n. 2, p. 601–609, 2013.

ZOETENDAL, E.G. et al. The human small intestinal microbiota is driven by rapid uptake and conversion of simple carbohydrates. **The ISME Journal**, v. 6, n. 7, p. 1415–1426, 2012.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS - CEP/UFJF

36036-900 JUIZ DE FORA - MG – BRASIL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Biorrepositório)

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa “Efeitos da intervenção nutricional sobre o perfil nutricional, inflamação e saúde intestinal de pacientes ambulatoriais com doença hepática”. Para tanto, pedimos a sua autorização para a coleta, o depósito, o armazenamento, a utilização e descarte do material biológico humano (sangue, urina e fezes), cuja utilização está expressamente vinculada somente a esse projeto de pesquisa. Nesta pesquisa pretendemos fazer uma avaliação sobre como está a sua alimentação, suas medidas corporais, seus exames de sangue e saúde do seu intestino. Para esta pesquisa adotaremos os seguintes procedimentos: aplicação de questionários, avaliação das medidas corporais, exames de sangue, gás expirado, coleta de urina e fezes. Todas as avaliações serão realizadas em dois dias diferentes no Hospital Universitário da UFJF – HU, Unidade Dom Bosco. A partir dessas avaliações será elaborado um plano alimentar individualizado com devidas orientações nutricionais. Para os indivíduos portadores de doenças hepáticas haverá um acompanhamento nutricional mensal durante três meses, sendo que todas as avaliações iniciais serão repetidas para sabermos os efeitos da dieta sobre todos os procedimentos realizados. Sangue, urina e fezes serão armazenados em freezers apropriados e após análise serão descartados. Os riscos envolvidos na pesquisa consistem em mínimos, pois todos os procedimentos serão realizados por pessoas treinadas. A coleta de sangue será realizada por um profissional habilitado, utilizando apenas materiais descartáveis. A pesquisa contribuirá para compreensão do impacto da intervenção dietética no estado nutricional, nos parâmetros bioquímicos, metabólicos e intestinais de indivíduos com doenças hepáticas. Para participar deste estudo o Sr. (a) não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, o Sr.(a) tem assegurado o direito à indenização. O Sr. (a) terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar e a qualquer tempo e sem quaisquer prejuízos, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado no Biorrepositório, valendo a desistência a partir da data de formalização desta. A sua participação é voluntária, e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que o Sr. (a) é atendido (a) pelo pesquisador, que tratará a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição

quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão.

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

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

Eu, _____, portador do documento de Identidade _____ fui informado (a) dos objetivos da pesquisa “Efeitos da intervenção nutricional sobre o perfil nutricional, inflamação e saúde intestinal de pacientes ambulatoriais com doença hepática”, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

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

Juiz de Fora, _____ de _____ de 20 .

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

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

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

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humano-UFJF

Campus Universitário da UFJF

Pró-Reitoria de Pesquisa

CEP: 36036-900

Fone: (32) 2102- 3788 / E-mail: cep.propesq@ufjf.edu.br

Nome do Pesquisador Responsável:

Ana Paula Boroni Moreira

Endereço: Departamento de Nutrição/Instituto de Ciências Biológicas/Universidade Federal de Juiz de Fora, Bairro Martelos – Juiz de Fora/MG

CEP: 36036-330

Fone: (32) 2102-3234 Ramal 22

E-mail: ana.boroni@ufjf.edu.br

APÊNDICE B – Orientações para realização do teste respiratório

**ORIENTAÇÕES PARA REALIZAÇÃO DO TESTE RESPIRATÓRIO
COM HIDROGÊNIO E METANO EXALADOS****Paciente:** _____**Data:** _____ **Horário: 7 : 30 h****4 SEMANAS ANTES DO TESTE:**

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

1 SEMANA ANTES DO TESTE:

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

1 DIA ANTES DO TESTE:

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

10 HORAS ANTES DO TESTE:

- Não comer ou beber nada, inclusive água.

NO DIA DO TESTE:

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

APÓS O TESTE:

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

PARA PACIENTES DIABÉTICOS:

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

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

APÊNDICE C – Orientações Nutricionais

ORIENTAÇÕES NUTRICIONAIS

- ⇒ Ingerir, no mínimo, um copo de água no intervalo entre cada refeição;
- ⇒ Aumente a ingestão de fibras alimentares (alimentos integrais, aveia, frutas, verduras e legumes);
- ⇒ Procure temperar os alimentos com alho, cebola, louro, manjerona, orégano, pimenta. Evite ao máximo os temperos industrializados.
- ⇒ Utilize o mínimo de óleo possível nas preparações: **1 embalagem p/ 4 pessoas em 1 mês;**
- ⇒ Retire a pele do frango antes de prepará-lo;
- ⇒ Retire toda a gordura visível das carnes, antes e após o preparo;
- ⇒ Nunca aproveite a gordura já usada numa fritura, pois ela torna-se prejudicial para sua saúde;
- ⇒ Tempere as saladas com limão, azeite e/ou vinagre, mas evite o sal;
- ⇒ Dê preferência para preparações assadas, cozidas, grelhadas, EVITANDO as frituras;
- ⇒ Evite embutidos (presunto, salame, linguiça, salsicha, mortadela, patê com maionese, etc);
- ⇒ Evite a ingestão de miúdos (fígado, coração, rim) e de frutos do mar (camarão e lula), pelo alto teor de colesterol;
- ⇒ Evite o consumo de carnes gordurosas, banha, bacon, pele de frango, embutidos, manteiga, creme de leite, nata, óleo de dendê;
- ⇒ Limite a ingestão de leite integral, queijos amarelos, biscoitos, tortas, bolos, doces de padaria, pães caseiros, pães recheados, bolacha recheada, etc.
- ⇒ Evite alimentos processados e prefira alimentos na sua forma mais natural.
- ⇒ Evite refeições realizadas fora de casa e dedique mais tempo ao planejamento e preparo das refeições em casa.
- ⇒ Procure fazer refeições em ambiente calmo e tranquilo, comendo devagar e mastigando bem os alimentos. Evite comer em frente à TV.
- ⇒ Realize 5 a 6 refeições por dia, em horários regulares e em pequenas quantidades;
- ⇒ Não pule refeições, mesmo que não tenha fome.
- ⇒ Mastigue bem e coma devagar;
- ⇒ Evite excesso de líquidos junto com as refeições.

GRUPO DE ALIMENTOS	PREFERIR	EVITAR
Leite e Derivados	Leite desnatado, iogurte desnatado ou 0% gordura, ricota, cottage, queijo minas frescal	Leite e iogurte integral, nata, creme de leite, leite condensado, doce de leite, manteiga Queijos: minas curado, minas padrão, mussarela, queijo prato, gorgonzola, parmesão, cheddar, mussarela de búfala, etc.
Ovos	Ovo cozido, pochê, omelete	Ovo frito
Carnes	Frango: sem pele Boi: sem gordura aparente, principalmente músculo, patinho, chã, lagarto, filé mignon. Porco: Lombrinho e lombo sem capa de gordura Peixes: todos (mas não empanados)	Frango: pele de frango, moela, coração, fígado Boi: gordura aparente, principalmente contra-filé, picanha, peito, costela, rim, coração, fígado, miolo Porco: pernil, costelinha, barriga, torresmo Frutos do mar: camarão Embutidos: salsicha, linguiça, presunto, peito de peru, bacon, mortadela, carne seca, patês, hambúrguer
Vegetais	Todos	Refogados com muito óleo, adicionados de creme de leite e queijos amarelos, enlatados (milho, palmito, azeitona, ervilha, picles, etc)
Frutas	Todas	Adicionadas de creme de leite e leite condensado, compotas, frutas em calda, sucos industrializados.
Pães, Massas, Cereais, Raízes, Tubérculos	Arroz, aveia, granola, massas com molho de tomate caseiro, massas integrais, pães integrais, pipoca caseira com pouco óleo e pouco sal, milho verde espiga, tapioca	Pães recheados e com creme, bolo confeitado, massas com molho de creme de leite e queijos amarelos, biscoitos recheados e amanteigados, pastelaria (salgadinhos, pizza, croissant, pães de queijo, empadas, etc.)
Leguminosas e Oleaginosas	Feijão, lentilha, ervilha, grão-de-bico, soja, castanha do pará, castanha de caju sem sal, amêndoas, amendoim, nozes, pistache, macadâmia, avelãs	Adicionados de embutidos, como feijoada e tutu
Bebidas	Chás e café com pouco açúcar ou sem adoçar, água de coco natural, suco de fruta natural	Refrigerantes, bebidas alcoólicas, sucos industrializados
Doces	Chocolate mínimo 70% cacau	Achocolatados, chocolate ao leite e branco, compotas com açúcar, sorvete, picolé, balas, chicletes e outras guloseimas
Temperos e condimentos	Alho, sal, ervas aromáticas (orégano, alecrim, manjeriço, tomilho, etc.), colorau, curry, açafrão, vinagre, limão, azeite	Caldo de carne e similares (tipo Knorr, Sazon), molho inglês, shoyo, catchup, maionese, molho de mostarda

ANEXOS

ANEXO I – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Humana



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeitos da intervenção nutricional sobre o perfil nutricional, inflamação e saúde intestinal de pacientes ambulatoriais com doença hepática

Pesquisador: Ana Paula Boroni Moreira

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 42359215.8.0000.5147

Instituição Proponente: Departamento de Nutrição

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.129.516

Data da Relatoria: 23/06/2015

Apresentação do Projeto:

Apresentação do projeto esta clara e detalhada de forma objetiva. Descreve as bases científicas que justificam o estudo.

Objetivo da Pesquisa:

Apresenta clareza e compatibilidade com a proposta de estudo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O risco que o projeto apresenta é caracterizado como risco mínimo, considerando que os indivíduos não sofrerão qualquer dano ou sofrerão prejuízo pela participação ou pela negação de participação na pesquisa. Os benefícios esperados estão adequadamente descritos.

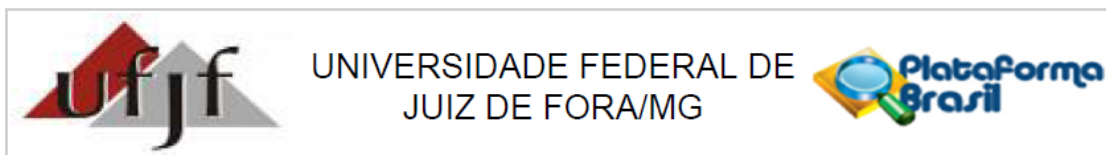
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está bem estruturado, delineado e fundamentado, sustenta os objetivos do estudo em sua metodologia de forma clara e objetiva, e se apresenta em consonância com os princípios éticos norteadores da ética na pesquisa científica envolvendo seres humanos elencados na resolução 466/12 do CNS e com a Norma Operacional Nº 001/2013 CNS.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto está em configuração adequada e há apresentação de declaração de infraestrutura e de concordância com a realização da pesquisa, assinada pelo responsável da instituição onde será

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N
Bairro: SAO PEDRO **CEP:** 36.036-900
UF: MG **Município:** JUIZ DE FORA
Telefone: (32)2102-3788 **Fax:** (32)1102-3788 **E-mail:** cep.propesq@ufjf.edu.br



Continuação do Parecer: 1.129.516

realizada a pesquisa. Apresentou de forma adequada o termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O Pesquisador apresenta titulação e experiência compatível com o projeto de pesquisa.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, o projeto está aprovado, pois está de acordo com os princípios éticos norteadores da ética em pesquisa estabelecido na Res. 466/12 CNS e com a Norma Operacional Nº 001/2013 CNS. Data prevista para o término da pesquisa: Dezembro de 2017.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa CEP/UFJF, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 466/12 e com a Norma Operacional Nº001/2013 CNS, manifesta-se pela APROVAÇÃO do protocolo de pesquisa proposto. Vale lembrar ao pesquisador responsável pelo projeto, o compromisso de envio ao CEP de relatórios parciais e/ou total de sua pesquisa informando o andamento da mesma, comunicando também eventos adversos e eventuais modificações no protocolo.

JUIZ DE FORA, 29 de Junho de 2015

Assinado por:
Francis Ricardo dos Reis Justi
(Coordenador)

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N
Bairro: SAO PEDRO **CEP:** 36.036-900
UF: MG **Município:** JUIZ DE FORA
Telefone: (32)2102-3788 **Fax:** (32)1102-3788 **E-mail:** cep.propesq@ufjf.edu.br