



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA
E HEPATOLOGIA

Dissertação de Mestrado

**FATORES PREDITORES DA RESPOSTA AO TRATAMENTO COM
PROBIÓTICOS EM PACIENTES COM ESTEATO-HEPATITE NÃO
ALCOÓLICA**

Érica Salvador Fochezatto

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Cremonese Filippi Chiela

Co-orientadora: Prof. Dra. Valesca Dall'Alba

Porto Alegre, 2022

Érica Salvador Fochezatto

**FATORES PREDITORES DA RESPOSTA AO TRATAMENTO COM
PROBIÓTICOS EM PACIENTES COM ESTEATO-HEPATITE NÃO
ALCOÓLICA**

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, do Programa de Pós-Graduação Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof. Dr. Eduardo Cremonese Filippi Chiela

Coorientadora: Prof. Dra. Valesca Dall'Alba

Porto Alegre, 2022

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

Salvador Fochezatto, Érica
FATORES PREDITORES DA RESPOSTA AO TRATAMENTO COM
PROBIÓTICOS EM PACIENTES COM ESTEATO-HEPATITE NÃO
ALCOÓLICA / Érica Salvador Fochezatto. -- 2022.
112 f.
Orientador: Eduardo Cremonese Filippi Chiela.

Coorientadora: Valesca Dall'Alba.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e
Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Esteato-hepatite Não Alcoólica. 2. probióticos.
3. Ensaio Clínico Randomizado. 4. fatores preditores
de resposta. 5. medicina personalizada. I. Cremonese
Filippi Chiela, Eduardo, orient. II. Dall'Alba,
Valesca, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Dedico este trabalho ao Programa de Pós-Graduação
Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia
da UFRGS e a todos os pacientes com
Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica.

AGRADECIMENTOS

Minha profunda gratidão aos meus orientadores Prof. Dr. Eduardo C. Filippi Chiela e Prof. Dra. Valesca Dall’Alba que me acolheram com muito amor e carinho desde a primeira reunião, oportunizando a realização deste projeto com leveza, bom humor, empatia e muito aprendizado. Foram humanos e grandes amigos, me abraçando e me confortando virtualmente nos momentos difíceis que passei.

À doutoranda Amanda S. Silva Sperb e à mestranda Helena Abadie que foram extremamente atenciosas e competentes, fornecendo os dados e todas as informações necessárias para a execução do meu trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia e sua excelente equipe de professores, meu agradecimento por aceitarem o desenvolvimento do projeto e por todo o conhecimento de qualidade transmitido durante as aulas, seminários e eventos.

À UFRGS e ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela oportunidade de ingressar em uma Pós-Graduação extremamente qualificada, oportunizando experiências muito ricas à minha formação.

À minha monitora Joanna Sirianni, por ter encarado o trabalho comigo, auxiliando com competência e muita dedicação em diversas etapas até a sua conclusão. Também agradeço pela amizade construída durante o período, com palavras de apoio, incentivo e conforto.

À incansável doutoranda Carolina B. Beskow, amiga que conquistei durante o mestrado, obrigada pelas noites e finais de semana de trocas de aprendizado e experiências. Sem tua energia e força certamente o processo seria mais difícil.

À minha família agradeço ao incentivo e apoio às minhas escolhas. Além de todo o amparo para que eu me dedicasse ao projeto e consolo nos momentos difíceis.

Aos meus amigos e a todos que de alguma forma estiveram presentes durante este período, agradeço os momentos de descontração, a compreensão durante a minha ausência, as palavras de incentivo e os conselhos que tanto ajudaram.

SUMÁRIO

RESUMO.....	07
ABSTRACT.....	09
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	13
1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA (DHGNA)	15
1.1.1 Definição e Etiologia da DHGNA	15
1.1.2 Diagnóstico e Tratamento da DHGNA	16
1.2 MICROBIOTA	17
1.2.1 Definição	17
1.2.2 Papel Biológico da Microbiota.....	19
1.5 PROBIÓTICOS	23
1.3.1 Definição, Cepas e Evidências clínicas.....	23
1.4. MICROBIOTA E PROBIÓTICOS NA DHGNA	25
1.4.1 Probióticos no tratamento da EHNA.....	30
1.5 FATORES PREDITORES DE RESPOSTA AO TRATAMENTO COM PROBIÓTICOS	31
2. JUSTIFICATIVA	37
3. OBJETIVOS.....	37
3.1 OBJETIVO PRIMÁRIO	37
3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	37
3. QUESTÃO DE PESQUISA	38
4. HIPÓTESES	38
4.1 HIPÓTESE NULA	38
4.2 HIPÓTESE ALTERNATIVA	38
REFERÊNCIAS	39
5. ARTIGO CIENTÍFICO.....	Erro! Indicador não definido.
RESUMO	Erro! Indicador não definido.
6. PERSPECTIVAS	Erro! Indicador não definido.
ANEXOS.....	Erro! Indicador não definido.
ANEXO A.....	Erro! Indicador não definido.
ANEXO B.....	Erro! Indicador não definido.

RESUMO

Introdução: Atualmente nenhuma terapia para a Esteato-hepatite Não Alcoólica (EHNA) está aprovada. Os probióticos estão entre as alternativas potenciais para tratamento, porém nem todos os pacientes respondem da mesma forma. Características biológicas dos pacientes antes da intervenção (baseline) parecem influenciar o efeito da terapia. Assim, este trabalho objetivou investigar potenciais preditores de resposta a intervenção com probióticos em pacientes com EHNA.

Métodos: Realizou-se uma análise secundária do ensaio clínico randomizado PROBILIVER (NCT03467282), explorando os dados do grupo intervenção (n=22 pacientes), suplementado por probióticos durante 24 semanas. Foram analisados sub-bancos de dados (a) antropométricos, (b) metabólicos, (c) hepáticos, (d) cardiovasculares e (e) consumo alimentar no baseline e após as 24 semanas de intervenção. Para identificar os potenciais fatores preditores de resposta aos probióticos foram realizadas três diferentes análises: 1) análise retrospectiva direta, para avaliar potenciais fatores preditores específicos de cada variável de interesse para cada sub-banco específico; 2) análise retrospectiva cruzada, para avaliar quais marcadores de cada sub-banco são possíveis preditores de resposta de variáveis de outros sub-bancos; 3) análise prospectiva direta e cruzada, para verificar a possível influência dos níveis baseline de determinados marcadores na resposta (efeito) dos probióticos para determinados desfechos.

Resultados: Considerando valores de delta individuais, os pacientes do grupo probiótico apresentaram melhora em 45% das variáveis analisadas, piora em 47%, e não alteraram 9% das variáveis. Os marcadores com maior proporção de melhora pelos pacientes após tratamento foram Ck-18, NAFLD *fibrosis score*, albumina, fosfatase alcalina, GGT, HDL-c e kPa. Por outro lado, HbA1c, creatinina sanguínea, plaquetas, homa-IR, bilirrubina total, APRI score e peso apresentaram maior proporção de pacientes com piora. Para Ck-18 não foram encontrados potenciais preditores de melhora. Valores mais altos de CT, HDL-c, glicemia de jejum e GGT, assim como maior ingestão de fibras, AGM, energia, macronutrientes, colesterol, açúcares, sacarose, glicose e frutose foram potenciais preditores para a redução do NAFLD *fibrosis score*. Valores mais altos de NAFLD *fibrosis score* e níveis mais baixos de albumina e kPa foram potenciais preditores para o aumento de albumina. Níveis mais baixos de TLR4 e FLI score no baseline foram possíveis preditores para a redução dos níveis de fosfatase alcalina. Valores mais altos de CC foram potenciais preditores para a redução de GGT, enquanto valores mais altos de peso e IMC foram potenciais preditores para o aumento dos níveis de HDL-c. Valores mais altos de

HbA1c, creatinina urinária e HDL-c no baseline foram potenciais preditores para a redução de kPa, assim como o consumo mais elevado de lipídeos e AGS.

Conclusão: A melhora de parâmetros laboratoriais e clínicos em EHNA, com tratamento de probióticos, pode estar relacionada às características biológicas dos pacientes antes da intervenção, como as encontradas neste estudo. Melhores resultados foram observados em parâmetros hepáticos e a resposta parece ser maior em pacientes com pior estado metabólico. Portanto, acreditamos que a heterogeneidade biológica da população, tanto genética quanto de variáveis clínicas associadas à EHNA, deve ser levada em consideração na tomada de decisão para escolha de terapias com probióticos, de modo a permitir maior assertividade e melhor prognóstico para os pacientes.

Palavras-chave: Esteato-hepatite Não Alcoólica, probióticos, Ensaio Clínico Randomizado, fatores preditores de resposta, medicina personalizada.

ABSTRACT

Introduction: Currently, no therapy for Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH) is approved. Probiotics are the potential alternatives for treatment, but not all patients respond the same way. In addition, patients' baseline biological characteristics seem to influence therapy's effect. This work investigates potential predictors of response to probiotic intervention in patients with NASH.

Methods: A secondary analysis of the PROBILIVER randomized clinical trial (NCT03467282) was performed, exploring data from the intervention group (n=22 patients), supplemented with probiotics for 24 weeks. We analyzed (a) anthropometric, (b) metabolic, (c) hepatic, (d) cardiovascular, and (e) dietary intake sub-databases at baseline and after the 24-week intervention. We performed three different analyses to identify potential predictors of response to probiotics: 1. Direct retrospective analysis, to assess potential predictors specific to each variable of interest for each particular sub-bank; 2. Retrospective crossanalysis, to set which markers from each sub-bank are possible predictors of response to variables from other sub-banks; 3. Direct and cross prospective analysis, to verify the potential influence of baseline levels of specific markers on the probiotics response (effect) for certain outcomes.

Results: Considering individual delta values, the 22 patients of the probiotic group showed improvement in 45% of the variables analyzed, worsened by 47%, and didn't change 9% of the variables. The markers with the highest proportion of improvement by patients after treatment were Ck-18, NAFLD fibrosis score, albumin, alkaline phosphatase, GGT, HDL-c, and kPa. On the other hand, HbA1c, blood creatinine, platelets, homa-IR, total bilirubin, APRI score, and weight showed a higher proportion of patients with worsening. No potential response predictors were found for Ck-18. TC, HDL-c, fasting glucose, and GGT higher values, as well as higher intake of fiber, MUFA, energy, macronutrients, cholesterol, sugars, sucrose, glucose, and fructose, were potential predictors for the NAFLD fibrosis score reduction. Higher NAFLD fibrosis score and albumin and kPa lower levels were potential predictors of increased albumin. TLR4 and FLI score lower levels at baseline were possible predictors for alkaline phosphatase reduced levels. Higher WC values were potential predictors for a GGT reduction, while weight and BMI higher values were potential predictors for an increase in HDL-c levels. Higher HbA1c, urinary creatinine, and HDL-c values at baseline were potential predictors for the kPa reduction, as were higher lipids and SFA intake.

Conclusion: The improvement of laboratory and clinical parameters in NASH with probiotic treatment may be related to the biological characteristics of patients before the intervention, as found in this study. Better results were observed in hepatic parameters, and the response seems to be greater in patients with worse metabolic status. Therefore, we believe that the biological heterogeneity of the population, both genetic and clinical variables associated with NASH, should be considered when choosing therapies with probiotics to allow greater assertiveness and better prognosis for patients.

Keywords: Non-Alcoholic Steatohepatitis, probiotics, Randomized Clinical Trial, response predictors factors, personalized medicine

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aspectos do hospedeiro, microbioma e dieta que interferem na resposta aos probióticos.

Figura 2. Possíveis determinantes da heterogeneidade e medicina de precisão em DHGNA.

Figura 3. Visão geral da análise retrospectiva direta

Figura 4. Visão geral da análise retrospectiva cruzada

Figura 5. Visão geral da análise prospectiva direta e cruzada

Figura 6. Representação do percentual de variáveis indicativas de melhora (IG), piora (WG) e não alteração (NA) de cada paciente.

Figura 7. Radar plot representando a porcentagem comparativa entre pacientes IG, WG e NA para cada variável do estudo.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características principais dos estudos incluídos nas metanálises que avaliaram o efeito da suplementação de probióticos em marcadores DHGNA e comorbidades associadas.

Tabela 2. Características baseline dos pacientes do grupo probióticos.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Dados antropométricos baseline e pós-intervenção de pacientes não respondedores e respondedores ao tratamento com probióticos.

Quadro 2. Dados metabólicos baseline e pós-intervenção de pacientes não respondedores e respondedores ao tratamento com probióticos.

Quadro 3. Dados hepáticos baseline e pós-intervenção de pacientes não respondedores e respondedores ao tratamento com probióticos.

Quadro 4. Dados cardiovasculares baseline e pós-intervenção de pacientes não respondedores e respondedores ao tratamento com probióticos.

Quadro 5. Deltas antropométricos e potenciais preditores de resposta.

Quadro 6. Deltas metabólicos e potenciais preditores de resposta.

Quadro 7. Deltas hepáticos e potenciais preditores de resposta.

Quadro 8. Deltas cardiovasculares e potenciais preditores de resposta.

Quadro 9. Deltas antropométricos e potenciais preditores alimentares.

Quadro 10. Deltas metabólicos e potenciais preditores alimentares.

Quadro 11. Deltas hepáticos e potenciais preditores alimentares.

Quadro 12. Deltas cardiovasculares e potenciais preditores alimentares.

Quadro 13. Potenciais preditores antropométricos e desfechos clínicos.

Quadro 14. Potenciais preditores metabólicos e desfechos clínicos.

Quadro 15. Potenciais preditores hepáticos e desfechos clínicos.

Quadro 16. Potenciais preditores cardiovasculares e desfechos clínicos.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB – Ácidos Biliares

AGCC - Ácidos Graxos de Cadeia Curta

AGL - Ácidos Graxos Livres

ALT - Alanina Aminotransferase

AST - Aspartato Aminotransferase

CHC - Carcinoma Hepatocelular

Ck-18 - Citoqueratina-18

CT - Colesterol Total

DC - Doença de Crohn

DCV - Doenças Cardiovasculares

DHGNA - Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica

DII - Doenças Inflamatórias Intestinais

DM2 – *Diabetes Mellitus tipo 2*

ECR – Ensaio Clínico Randomizado

EHNA – Esteato-hepatite Não Alcoólica

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

FLI - *Fatty Liver Index*

FOS – Frutooligossacrídeos

FUT2 - fucosyltransferase 2

GABA - Ácido Gama Amino Butírico

GGT - Gama-glutamil transpeptidase

GLP-1 - *Glucagon-like peptide-1*

GWAS - Estudos de Associação de Todo o Genoma

HbA1C - Hemoglobina Glicada

HDL-c - Lipoproteína de Alta Densidade

Homa-IR - Homoeostasis Model Assessment of Insulin Resistance

IGF-1 - *Insulin-like Growth Factor 1*

IL1 – Interleucina 1

IL6 – Interleucina 6

IL8 – Interleucina 8

IMC - Índice de Massa Corporal

INR - Razão Normalizada Internacional

LDL-c - Lipoproteína de Baixa Densidade
LPS – Lipopolissacarídeo
MAFLD - *Metabolic dysfunction-Associated Fatty Liver Disease*
NASH - *Nonalcoholic Steatohepatitis*
NAS - *NAFLD Activity Score*
NF-kB - Fator Nuclear kappa B
NGPs - *Novel Group of Probiotics*
NK - *Natural Killer*
NKT - *Natural Killer T*
PAMPs - Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PCR - Proteína-C Reativa
PPAR- γ - *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma*
PRR - Receptores de reconhecimento de padrões
RI - Resistência à Insulina
SII - Síndrome do Intestino Irritável
SIBO – Supercrescimento Bacteriano no Intestino Delgado
SREBP-1 - *Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1*
TG – Triglicerídeos
TGI - Trato Gastrointestinal
TLR-4 - *Toll-like Receptor 4*
TMA - Trimetilamina
TMAO - *Trimethylamine-N-Oxide*
TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa
TSH - Hormônio Tiroestimulante
VLDL - *Very Low-Density Lipoprotein*

1. INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA (DHGNA)

1.1.1 Definição e Etiologia da DHGNA

A Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA) é definida como a presença de esteatose no fígado, que pode variar de esteatose simples à esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), do inglês “*nonalcoholic steatohepatitis*” (NASH). Tem apresentado incidência crescente não somente em adultos, mas também em adolescentes e crianças (Schwimmer, Deutsch et al. 2006), sendo atualmente a principal indicação para transplante hepático em países ocidentais (Charlton, Burns et al. 2011).

A esteatose é definida como a presença de pelo menos 5% dos hepatócitos contendo gordura em seu citoplasma, e mínima ou nenhuma balonização (Chalasanani, Younossi et al. 2018). Por outro lado, EHNA é definida como a presença de $\geq 5\%$ de gordura nos hepatócitos associada à balonização, inflamação lobular difusa, com ou sem fibrose. Conforme a doença progride, surgem sinais de fibrose como resposta natural às lesões, podendo evoluir para cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC) ((EASL), (EASD) et al. 2016, Chalasanani, Younossi et al. 2018). O diagnóstico da DHGNA requer a evidência de esteatose hepática por histologia ou imagem e ausência de causas secundárias para o acúmulo de gordura no fígado, como consumo significativo de álcool ($\geq 30\text{g/dia}$ para homens e $\geq 20\text{g/dia}$ para mulheres), uso de medicação esteatogênica ou desordens hereditárias monogênicas (Ratziu, Bellentani et al. 2010, Chalasanani, Younossi et al. 2018).

Younossi et al. (2016) estimaram uma prevalência global de DHGNA em 25,24%. As maiores prevalências foram reportadas no Oriente Médio (31,79%) e América do Sul (30,45%) e a menor prevalência foi atribuída à África (13,48%). A prevalência de EHNA na população geral variou entre 1,5 - 6,45%, dependendo da região, e diferiu entre os pacientes com DHGNA biopsiados sem indicação clínica específica (6,67% - 29,85%) para aqueles com indicação clínica (59,10%) (Younossi, Koenig et al. 2016).

A etiologia e os mecanismos envolvidos com a progressão da DHGNA não são bem estabelecidos. Todavia, a DHGNA resulta de um acúmulo excessivo de lipídeos no fígado, cujas fontes podem ser ácidos graxos liberados pelo tecido adiposo periférico, lipídeos sintetizados através da lipogênese de novo no fígado e ácidos graxos provenientes da dieta

(Donnelly, Smith et al. 2005). Deste modo, fatores nutricionais, ambientais e genéticos parecem contribuir com a manifestação da doença (Mokhtari, Gibson et al. 2017, Sookoian and Pirola 2017). Numerosos estudos descreveram que a dieta de pacientes com DHGNA geralmente apresenta má composição, com consumo excessivo de carboidratos simples, frutose, gorduras totais e saturadas (especialmente oriundas da carne vermelha) e ingestão insuficiente de ácidos graxos ômega-3 e fibra alimentar (Zelber-Sagi, Nitzan-Kaluski et al. 2007, Oddy, Herbison et al. 2013, Berná and Romero-Gomez 2020).

O acúmulo de lipídeos, somado a outros fatores em atividade como citocinas inflamatórias, adipocinas, disfunção mitocondrial, resistência à insulina e estresse oxidativo, pode lesar os hepatócitos a ponto de evoluir até um carcinoma hepatocelular, se não tratado imediatamente e com um agente eficaz (Ferlay, Soerjomataram et al. 2015).

O desenvolvimento da doença também está intimamente relacionado com obesidade, resistência à insulina, diabetes *mellitus* tipo 2 e dislipidemia; logo, é reconhecida como a manifestação hepática da síndrome metabólica (Schwimmer, Deutsch et al. 2006, De Minicis, Day et al. 2013, Ma, Li et al. 2013). Recentemente, um grupo de especialistas de 22 países avaliou a necessidade de modificar a atual nomenclatura, visto que ela dificulta a estratificação dos pacientes e a escolha do tratamento adequado. Então foi proposta a mudança de NAFLD para MAFLD, do inglês “*metabolic dysfunction-associated fatty liver disease*”. O racional da nova definição vem da necessidade de se estabelecer critérios diagnósticos positivos, evitando que a doença tenha seu diagnóstico baseado em critérios de exclusão. Além de aproximar a nomenclatura da fisiopatologia da doença, associada a disfunções ou desregulações metabólicas (Eslam, Sanyal et al. 2020).

Outro problema de saúde envolvido com a DHGNA são as doenças cardiovasculares (DCV). Diversas evidências indicam que pacientes com DHGNA, especialmente aqueles com EHNA, fibrose avançada ou com DM2, correm risco substancial de desenvolver hipertensão, doença coronariana, cardiomiopatia e arritmias cardíacas, que resultam em aumento da morbidade e mortalidade cardiovascular. Detalhes sobre os mecanismos fisiopatológicos que ligam DHGNA e DCV são descritos em revisão recente (Kasper, Martin et al. 2021).

1.1.2 Diagnóstico e Tratamento da DHGNA

Para diferenciar o diagnóstico da DHGNA de outras condições hepáticas como doença hepática alcoólica, hepatite autoimune e hepatite induzida por medicamentos, é

necessário avaliar o consumo de álcool e realizar testes bioquímicos para analisar a função hepática, bem como exame de imagem não invasivo para confirmar a presença de esteatose (Cotrim, Parise et al. 2016, Leoni, Tovoli et al. 2018). Os exames de imagem também são importantes para monitorar a resposta ao tratamento e progressão da doença. Ultrassonografia abdominal, ressonância magnética e elastografia transitória baseada em ultrassonografia são os mais comuns (Leoni, Tovoli et al. 2018).

As enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e gama-glutamil transpeptidase (GGT) nem sempre se encontram em níveis elevados na DHGNA, entretanto ferritina sérica elevada e baixos títulos de anticorpos autoimunes são achados comuns nestes pacientes (Valenti, Fracanzani et al. 2010, Vuppalanchi, Gould et al. 2012). Todavia, as diretrizes mundiais admitem que a biópsia hepática permanece o padrão ouro, mesmo com suas limitações (Kleiner and Brunt 2012). Para auxiliar o diagnóstico podem ser aplicados escores de avaliação clínica da severidade da doença, como o *Fatty Liver Index* (FLI) e o *NAFLD liver fat score* (Leoni, Tovoli et al. 2018). Além disso, os níveis circulantes do fragmento da citoqueratina-18 (Ck-18) têm sido investigados como sinalizadores de inflamação hepática e apoptose de hepatócitos (Feldstein, Wieckowska et al. 2009).

Atualmente não existe nenhum medicamento específico e aprovado para tratar a DHGNA (Leoni, Tovoli et al. 2018). A abordagem terapêutica de primeira escolha é focada em mudanças alimentares, atividade física e perda de peso (Uygun, Kadayifci et al. 2004). Tratamentos farmacológicos que aumentem a sensibilidade à insulina e reduzam os níveis de lipídios e inflamação podem ser adotados, bem como a recomendação de compostos antioxidantes (Rector, Thyfault et al. 2008, Ma, Li et al. 2013). Contudo, tais medicamentos nem sempre são eficazes, além do risco de causar efeitos adversos, que conforme a necessidade de uso a longo prazo, podem eventualmente causar mais danos que a doença em si (Loman, Hernández-Saavedra et al. 2018).

1.2 MICROBIOTA

1.2.1 Definição

A relação simbiótica entre o hospedeiro humano e as bactérias que vivem nele tem despertado extenso interesse pela pesquisa em anos recentes (Day, Harper et al. 2019).

O termo “microbiota” se refere à coleção dos táxons que constituem comunidades microbianas em um hospedeiro, como bactérias, *archae*, micróbios eucariotos, e o material genético da microbiota é chamado de microbioma (Turnbaugh, Ley et al. 2007). As bactérias povoam todas as superfícies corporais expostas ao ambiente externo. Estima-se que o corpo humano seja habitado por cerca de $3,8 \times 10^{13}$ bactérias, semelhante ao número de células humanas ($3,0 \times 10^{13}$). A maior concentração de bactérias é encontrada no intestino, mais especificamente no cólon (correspondendo a mais de 70% de toda a microbiota), seguida pela placa dentária, pele, íleo, saliva, estômago, duodeno e jejuno (Sender, Fuchs et al. 2016). Para se ter uma ideia do impacto da microbiota intestinal sobre a saúde humana, a literatura sugere que o seu conteúdo genético é aproximadamente 150 vezes superior ao genoma humano (3 milhões vs. 23000 genes) (Qin, Li et al. 2010).

A composição da microbiota intestinal varia de um sítio para o outro. Os micróbios que vivem na camada de muco ou anexados na parede intestinal compõem a chamada microbiota parietal, ao passo que os micróbios que habitam o bolo fecal em trânsito compõem a microbiota luminal (Sonnenburg, Chen et al. 2006, Lee, Donaldson et al. 2013, Caballero, Carter et al. 2015).

A colonização bacteriana começa antes do nascimento, ainda no ambiente intrauterino, e continua durante a vida. Por volta dos 2-3 anos de idade a microbiota já é estabelecida e relativamente estável. Os principais filos que colonizam o intestino são Firmicutes (composto pelos gêneros *Lactobacillus*, *Peptoniphilus*, *Ruminococcus*, *Clostridium* e *Eubacteria*) e Bacteroidetes (*Bacteroides*, *Prevotella*), compreendendo aproximadamente 90% do total de bactérias no trato gastrointestinal. Outros filos menos abundantes são Actinobacteria (*Bifidobacterium*), Proteobacteria, e Verrucomicrobia (Tap, Mondot et al. 2009).

Porém, a composição da microbiota varia de indivíduo para indivíduo e sob a influência de fatores endógenos e exógenos como tipo de parto, característica da alimentação na infância (leite materno, fórmula infantil, introdução de alimentos sólidos), sistema imune do hospedeiro, infecções, doenças, estresse, uso de medicamentos (antibióticos, antimicrobianos), exposição a micróbios ambientais, ingestão de probióticos, realização de cirurgia, gestação, dieta, tabagismo, alcoolismo, localização geográfica, estilo de vida rural ou urbano e envelhecimento (Fujimura, Demoor et al. 2014, Thursby and Juge 2017). A genética do hospedeiro também pode influenciar a composição da microbiota. Por exemplo, polimorfismos no gene *fucosyltransferase 2* (FUT2) podem gerar o fenótipo não-secretor (ou seja, sem a expressão de antígenos do grupo histo-sanguíneo

ABH no muco intestinal e outras secreções), que tem sido associado com reduzida abundância, riqueza e diversidade de bifidobactérias no intestino (Wacklin, Mäkivuokko et al. 2011). Tanto a diversidade microbiana quanto a razão do filo *Firmicutes* para *Bacteroidetes*, as populações bacterianas dominantes na microbiota intestinal, são considerados indicadores gerais de saúde da microbiota intestinal (Claesson, Jeffery et al. 2012, Davenport, Mizrahi-Man et al. 2014, Pérez Martínez, Bäuerl et al. 2014).

A energia necessária ao desenvolvimento microbiano é derivada principalmente de carboidratos e fibras dietéticas, incluindo polissacarídeos, oligossacarídeos, açúcares e polióis (BINNS, 2013). As proteínas mucinas do muco intestinal são compostas por diversos *O*-glicanos que também podem ser usados como fonte de carboidratos pela microbiota (Arike and Hansson 2016; Tailford, Owen et al. 2015). Assim, a capacidade de habitar a camada de muco e metabolizar tais fontes energéticas determina a probabilidade de as bactérias sobreviverem e colonizarem o intestino. Além disso, quando as bactérias intestinais conseguem cooperar, como quando produtos da fermentação de certas bactérias servem de substrato energético para outras, é facilitado o estabelecimento de uma colonização diversa (Thursby and Juge 2017). Outro fator que pode ser determinante é explicado pela teoria da ecologia, que defende que a presença na microbiota de cepas filogeneticamente relacionadas aos micro-organismos a serem introduzidos exogenamente (por exemplo através de intervenções com probióticos) pode impedir a colonização devido competição ou característica filogenética (Jain 2020). Um estudo descobriu que a disponibilidade de nicho é um fator limitante para a persistência, uma vez que a colonização de *Bifidobacterium longum subsp. longum* AH1206 na microbiota teve mais sucesso em hospedeiros que ainda não abrigavam cepas nativas de *B. longum*. Além disso AH1206 foi capaz de colonizar em um subconjunto de indivíduos cujo microbioma não possuía certos genes de utilização de carboidratos característicos destas cepas (Maldonado-Gómez, Martínez et al. 2016).

1.2.2 Papel Biológico da Microbiota

Os micróbios que habitam o intestino podem influenciar diretamente a fisiologia do hospedeiro e são considerados alvos potenciais de novas abordagens terapêuticas (Cani 2018). Os milhões de anos de coevolução do corpo humano com os micróbios proporcionaram uma relação simbiótica benéfica entre eles combinando-os em um “superorganismo” que realiza funções metabólicas e imunológicas sinérgicas (Luckey

1972, Thursby and Juge 2017). Em condições saudáveis, as duas partes se beneficiam das funções uma da outra, vivendo em um equilíbrio homeostático de “eubiose” (Day, Harper et al. 2019).

São diversos os metabólitos produzidos pela microbiota capazes de influenciar o metabolismo corporal. Dentre eles pode-se citar folato, indóis, ácidos biliares secundários, *trimethylamine-N-oxide* (TMAO), neurotransmissores (como a serotonina e ácido gama amino butírico - GABA), e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), sendo estes últimos os mais estudados (Cani 2018).

Os AGCC, principalmente butirato, propionato e acetato (Louis, Hold et al. 2014), são gerados pelo processo de fermentação de carboidratos complexos pelas bactérias (Musso, Gambino et al. 2010). Eles estão envolvidos na regulação de vários processos celulares, como expressão gênica, resposta imunológica e inflamatória, quimiotaxia, metabolismo da glicose e dos lipídios no fígado, permeabilidade intestinal e regulação do apetite (Morrison and Preston 2016).

Além destes processos, a microbiota pode oferecer vários outros benefícios ao hospedeiro, através de amplas funções fisiológicas, tais como fortalecer a integridade intestinal ou moldar o epitélio intestinal (Natividad and Verdu 2013), digerir, metabolizar e sintetizar nutrientes (Thursby and Juge 2017); metabolizar e sintetizar hormônios e neurotransmissores (Lynch and Pedersen 2016) proteger contra patógenos através da competição por fontes energéticas, locais de fixação e produção de substâncias microbianas (Bäumler and Sperandio 2016); regular a imunidade intestinal e sistêmica do hospedeiro (Gensollen, Iyer et al. 2016); influenciar a proliferação celular e vascularização; regular a função endócrina intestinal, a sinalização neurológica, a densidade óssea, e a biogênese energética (5-10% das necessidades energéticas diárias do hospedeiro); e metabolizar sais biliares, medicamentos e xenobióticos (Lynch and Pedersen 2016).

Desequilíbrios qualitativos e/ou quantitativos na composição da microbiota podem levar a alterações benéficas ou patológicas ao organismo. Por exemplo, enquanto a presença ou aumento de gêneros como *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Akkermansia* trazem benefícios à saúde e são incluídos em muitas preparações de probióticos, outras espécies como *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* estão implicadas em resultados de saúde negativos (Hills, Pontefract et al. 2019). De fato, em consequência de uma composição ou função microbiana alterada, processo conhecido como disbiose intestinal, há a possibilidade destas funções serem interrompidas levando à perda da homeostase (Chang

and Lin 2016) e ao aumento do risco de desenvolvimento ou reativação de doenças. Diversos artigos sustentam a relação entre disbiose e doenças, destacando-se doenças inflamatórias intestinais (DII), síndrome do intestino irritável (SII), diabetes, obesidade, hipertensão, doenças cardiovasculares, hepáticas, respiratórias, neuropsiquiátricas, autoimunes e câncer (Shanahan, van Sinderen et al. 2017, Ferreira, Pereira-Marques et al. 2018, Tilg, Adolph et al. 2018).

Que, existe uma relação fisiológica bidirecional entre a microbiota intestinal e o fígado, onde este recebe suprimento sanguíneo do intestino através da veia porta e libera para o intestino os ácidos biliares através do trato biliar (Henao-Mejia, Elinav et al. 2013, Tripathi, Debelius et al. 2018). Algumas revisões recentes abordam a associação entre alterações na composição da microbiota e doenças hepáticas como DHGNA, doença hepática alcoólica, colangite esclerosante primária, hepatite autoimune, hepatites virais, cirrose e CHC (Schwenger, Clermont-Dejean et al. 2019, Manzoor, Ahmed et al. 2022). Para entender como a microbiota pode contribuir com a patogênese e tratamento de doenças hepáticas é preciso esclarecer resumidamente os mecanismos envolvidos:

- Alteração da capacidade de captar energia (biogênese energética): a microbiota pode contribuir com captação adicional de energia. Em comparação a camundongos *wild-type*, camundongos *germ-free* são menos propensos à obesidade quando consomem dieta *high-fat* (Rabot, Membrez et al. 2010). No entanto, após *germ-free* serem transplantados com a microbiota de camundongos *wild-type*, observa-se intenso aumento da gordura corporal e resistência à insulina (Bäckhed, Ding et al. 2004).

- Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC): a fermentação de carboidratos não digeríveis pela microbiota gera AGCC que são metabolizados pelo músculo, fígado e epitélio. Os AGCC, especialmente o butirato, são capazes de afetar o metabolismo como um todo. Um aspecto importante sobre o butirato é que ele é utilizado pelos colonócitos como fonte energética, pode induzir a expressão de mucinas e claudina-1, reforçando a barreira intestinal (Augenlicht, Shi et al. 2003, Willemsen, Koetsier et al. 2003, Gaudier, Rival et al. 2009, Wang, Wang et al. 2012). Ainda no intestino, é capaz de se ligar e ativar o *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR- γ), que antagoniza a transdução do fator nuclear kappa B (NF- κ B), desempenhando ação anti-inflamatória (Kinoshita, Suzuki et al. 2002). No fígado pode induzir a apoptose e inibir a proliferação de células hepáticas por suprimir a expressão de sirtuína 1 e regular positivamente a expressão de miR-22 (Pant, Yadav et al. 2017). Pode aumentar a saciedade, diminuir a ingestão alimentar e retardar o esvaziamento gástrico através da produção indireta dos

hormônios peptídeo YY e *glucagon-like peptide-1* (GLP-1) (Lin, Frassetto et al. 2012). Em situações de disbiose a produção de butirato é comprometida causando efeitos contrários.

- Lipogênese de novo: via metabólica geralmente ativada no fígado e tecido adiposo. Sob condições normais essa via converte o excesso de carboidratos em ácidos graxos. Os AGCC produzidos pela microbiota são ligantes de receptores que inibem a lipólise; finalmente, propionato e acetato são substratos para a gliconeogênese e síntese de colesterol, respectivamente (Ge, Li et al. 2008, Arslan 2014, Sanders and Griffin 2016).

- Metabolismo de ácidos biliares (AB): Os AB são sintetizados no fígado através do colesterol e são armazenados na vesícula biliar para serem secretados no intestino delgado durante a digestão (Long, Gahan et al. 2017). Os AB também atuam como moléculas sinalizadoras regulando o metabolismo da glicose e lipídios e o gasto energético (Copple and Li 2016); além disso, influenciam a integridade intestinal e a síntese de peptídeos antibacterianos (Parséus, Sommer et al. 2017). A microbiota metaboliza AB primários para AB secundários, assim mais de 95% deles são reabsorvidos no íleo terminal e transportados novamente ao fígado. A microbiota também influencia na produção, composição e captação de AB, através da regulação da expressão de enzimas envolvidas, como CYP7A1, CYP7B1 e CYP27A1 e do receptor responsável pela circulação enterohepática dos AB. E, por fim, os AB são capazes de modular a composição da microbiota (Fianchi, Liguori et al. 2021).

- Metabolismo da colina: A deficiência deste nutriente diminui a formação da lipoproteína VLDL e a exportação de triglicérides do fígado, resultando em acúmulo de gordura, assim como pode provocar disfunção mitocondrial e estresse do retículo endoplasmático no fígado (Zeisel 2008, Corbin and Zeisel 2012). A microbiota pode metabolizar a colina de fontes alimentares para trimetilamina (TMA), que alcança a circulação sanguínea e no fígado é metabolizada à N-óxido de trimetilamina (TMAO) podendo causar inflamação e dano hepático, exacerbando assim a DHGNA (Wang, Klipfell et al. 2011). Dessa forma a microbiota intestinal alterada pode contribuir com dano hepático através do metabolismo da colina da dieta.

- Permeabilidade Intestinal: O epitélio intestinal quando íntegro impede que toxinas, antígenos e a flora entérica entrem na circulação. Tanto a disfunção epitelial quanto a disbiose podem aumentar a permeabilidade do epitélio intestinal, esta última através de mecanismos como degradação/inibição da produção de muco e/ou alteração das *tight junctions* (Groschwitz and Hogan 2009). Isto resulta na translocação de fragmentos na circulação portal em direção ao fígado (Arrese, Cabrera et al. 2016).

- Ativação do sistema imune e inflamação: O recrutamento e ativação de células imunes hepáticas podem ser causados por sinais locais ou sinais externos, como os provenientes da microbiota (Arrese, Cabrera et al. 2016). Neste caso, o sistema imunológico reconhece padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como o lipopolissacarídeo (LPS), por meio de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Ainda, a translocação de endotoxinas aumenta a expressão de TLR-4. Células imunes são assim ativadas e recrutadas, como monócitos, macrófagos, células de Kupffer, células estreladas hepáticas, natural killer (NK) e natural killer T (NKT). As células NKT são capazes de se diferenciarem em células T helper 1 (pró-inflamatórias) e T helper 2 (anti-inflamatórias). O resultado é a produção de interferon-gama, citocinas inflamatórias como Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL8) e espécies reativas de oxigênio (EROs) que podem provocar lesão hepática e inflamação sistêmica (Baffy 2009, Bajaj, Heuman et al. 2014).

- Produção de etanol endógeno: o etanol pode ser produzido e metabolizado pela microbiota mesmo na ausência de consumo. Ele é produzido durante a fermentação anaeróbica de carboidratos por bactérias como *Escherichia coli*. O acetaldeído, metabólito do etanol metabolizado pela microbiota e enterócitos, pode enfraquecer as *tight junctions* aumentando a permeabilidade intestinal (Chaudhry, Shukla et al. 2016), permitindo que PAMPs alcancem o fígado, aumentando inflamação e dano. O etanol também contribui com a lipogênese hepática via ativação de *sterol regulatory 23ntra-he-binding protein-1* (SREBP-1) (You and Crabb 2004).

1.5 PROBIÓTICOS

1.3.1 Definição, Cepas e Evidências clínicas

O termo probiótico (do latim *Pro-* que significa ‘para’ e *Bios-* que significa ‘vida’) foi utilizado pela primeira vez em 1954 para designar as substâncias que eram requeridas para uma vida saudável (BINNS, 2013). Em 2001, a Organização Mundial da Saúde definiu os probióticos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios de saúde ao hospedeiro” (FAO/WHO, 2001).

Impulsionadas por novas descobertas, algumas intervenções nutricionais vêm se tornando tendência para manter a homeostase intestinal. Uma delas são os probióticos, um dos suplementos alimentares mais procurados pela população, com mercado crescente

(Neef and Sanz 2013). Iogurte, queijo, barras nutricionais, cereais matinais e fórmulas infantis são exemplos de produtos suplementados com probióticos. Eles também estão em alimentos fermentados como kefir e kombucha e podem ser comercializados como pílulas (Hoffmann, Fraser et al. 2014).

As bactérias mais comumente utilizadas como probióticos em alimentos pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. São capazes de fermentar carboidratos, produzir ácidos (ácido lático), e geralmente não têm potencial de toxicidade (BINNS, 2013). O gênero *Lactobacillus* é composto por mais de 170 espécies e 17 subespécies de bactérias gram-positivas, anaeróbias-facultativas. Constituem o grupo de bactérias comensais (ou autóctones) do trato gastrointestinal (TGI) humano, mas podem ocasionalmente ser patógenos oportunistas. Elas possuem alta tolerância ao pH muito baixo, aderem à camada de muco da parede intestinal e algumas cepas são capazes de produzir antioxidantes. *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. bulgaricus* e *L. rhamnosus* são algumas das espécies empregadas como probióticos (Goldstein, Tyrrell et al. 2015). Similarmente aos *Lactobacillus*, as bactérias do gênero *Bifidobacterium* são gram-positivas, anaeróbias e habitantes fisiológicos do TGI. O gênero consiste de mais de 50 espécies, com apenas 10 delas sendo encontradas em humanos. As propriedades probióticas, de maneira geral, derivam da tolerância ao baixo pH e sais biliares, atividade antimicrobiana e capacidade de degradar mucina (Awasti, Tomar et al. 2016, Esaiassen, Hjerde et al. 2017).

Diante do aprimoramento dos métodos de cultura, desenvolvimento de tecnologias de sequenciamento de última geração e métodos de bioinformática, um novo grupo de probióticos chamado “NGPs (*novel group of probiotics*) está surgindo, incluindo espécies como *Akkermansia muciniphila* (Derrien, Belzer et al. 2017), *Faecalibacterium prausnitzii* (Quévrain, Maubert et al. 2016), e *Bacteroides fragilis* (El Hage, Hernandez-Sanabria et al. 2017).

Os probióticos podem oferecer benefícios à saúde através de vários mecanismos. Alguns dos mais citados são modulação da microbiota desequilibrada, melhora da função de barreira do epitélio intestinal, supressão de patógenos, imunomodulação e proteção contra estresses fisiológicos (Suez, Zmora et al. 2019).

Extensa literatura sobre probióticos encontra-se disponível, entretanto é ainda difícil obter conclusões neste campo por diversas razões, como: variedade de cepas utilizadas em diferentes doses e formulações em amplas condições médicas (encobrendo saúde e doença); a maioria das cepas deriva da indústria alimentícia, e não de humanos; poucos estudos têm sido reproduzidos; extrapolação de estudos *in vitro* em modelos

animais e humanos; e estudos clínicos com qualidade e validade metodológica apresentando resultados contraditórios (Brüssow 2019, Suez, Zmora et al. 2019).

Delimitando o efeito dos probióticos para condições patológicas, as diretrizes têm recomendado o seu uso principalmente para distúrbios relacionados a infecções (Abid and Koh 2019). Há evidências clínicas apoiando o uso dos mesmos no tratamento de diarreias (aguda e associada a antibiótico e à infecção por *Clostridioides difficile*), colite ulcerativa e síndrome do intestino irritável (SII), mas não para Doença de Crohn (DC) e pancreatite aguda (Allen, Martinez et al. 2010, Shen, Wong et al. 2014, Shen, Zuo et al. 2014, Goldenberg, Yap et al. 2017, Sánchez, Delgado et al. 2017). Brüssow (2019) revisou ensaios clínicos e metanálises com intervenção de probióticos em indivíduos acometidos por diferentes patologias. Foi encontrado benefício dos probióticos para os sintomas da SII, sepse tardia e enterocolite necrosante em crianças pré-termo. Contudo, as conclusões divergiram nos estudos que avaliaram os probióticos na gastroenterite aguda, nas infecções por *C. difficile* e *H. pylori*, e nas diarreias (nosocomial, do viajante e associada a antibióticos e radiação) (Brüssow 2019).

Sabendo que os fabricantes de probióticos promovem o uso destes produtos para um mercado consumidor amplo, além daquele com condições de saúde específicas, Khalesi et al. (2019) revisaram a literatura sobre os efeitos do consumo de probióticos na saúde de adultos saudáveis. Os trabalhos sugerem que a suplementação pode provocar uma melhora transitória na concentração das bactérias específicas do suplemento na microbiota intestinal. Parece que a suplementação pode melhorar a função e a resposta imune a infecções respiratórias como o resfriado comum, melhorar a consistência das fezes e movimentos intestinais, manter a saúde reprodutiva feminina prevenindo infecções urogenitais, e melhorar sintomas psicológicos incluindo estresse, ansiedade e depressão. Por outro lado, são insuficientes as evidências relativas ao efeito benéfico dos probióticos sobre o perfil lipídico, IMC, glicose de jejum e nível de insulina em adultos saudáveis. De fato, mais pesquisas são necessárias para desenvolver um corpo de evidência mais forte acerca da eficácia dos probióticos em grupos populacionais saudáveis e não-saudáveis, incluindo intervenções com períodos de seguimento para avaliar a sustentabilidade do seu uso, uma vez que tem se observado perda do efeito após cessação do tratamento (Khalesi, Bellissimo et al. 2019).

1.4. MICROBIOTA E PROBIÓTICOS NA DHGNA

Trabalhos recentes têm explorado os mecanismos pelos quais a microbiota pode impactar no desencadeamento, progressão e atenuação da DHGNA. Isto porque o fígado recebe continuamente sangue venoso oriundo do intestino através da circulação portal, e existe uma conexão entre os metabólitos produzidos pelos micróbios intestinais e as funções de processamento de nutrientes e toxinas do fígado (Loman, Hernández-Saavedra et al. 2018). Assim, quando há qualquer alteração na homeostase intestinal é esperado que o fígado também seja afetado (Lavekar, Raje et al. 2017).

Os micróbios intestinais podem contribuir com o desenvolvimento da doença através de distintos mecanismos, como alteração da função de barreira do epitélio intestinal, aumento da permeabilidade intestinal, promoção da inflamação hepática através da liberação de endotoxinas (como o LPS) e citocinas inflamatórias, aumento do efluxo de ácidos graxos livres (AGL), lipogênese de novo no fígado, e indução de resistência à insulina (RI) (Scorletti and Byrne 2016).

Diante disso, tem sido proposto a utilização de probióticos para a terapia da DHGNA, levando à redução da lesão hepática e à melhora do funcionamento do fígado (Loguercio, Federico et al. 2005, Ma, Li et al. 2013). Alguns dos mecanismos associados a estes desfechos são inibição da proliferação de bactérias patogênicas, redução do supercrescimento bacteriano no intestino delgado (SIBO), restabelecimento da função de barreira intestinal, alteração do metabolismo de lipídios e da inflamação e modulação do sistema imune (Madsen, Cornish et al. 2001, Leung, Rivera et al. 2016).

Em revisão sistemática e metanálise, Loman et al. (2018) reuniram 10 publicações relacionadas com a suplementação de probióticos na DHGNA, 8 com prebióticos e 7 com simbióticos. Os autores encontraram redução significativa no IMC e nas enzimas ALT e AST após a suplementação com probióticos. Todavia, não houve diferenças na concentração de GGT, colesterol total (CT), triglicerídeos (TG) e nos marcadores de inflamação, TNF- α e proteína-C reativa (PCR) (Loman, Hernández-Saavedra et al. 2018). Contrariamente, Ma et al. (2013) constataram que os probióticos, além de reduzirem as transaminases hepáticas, também reduziram CT, lipoproteína de alta densidade (HDL-c), TNF- α e *Homoeostasis Model Assessment of Insulin Resistance* (Homa-IR).

Em outra metanálise de estudos com intervenção de probióticos por um período de 2 a 7 meses, Lavekar et al. (2017) verificaram redução do IMC, ALT e AST, bem como do índice HOMA-IR, sem alteração nos níveis séricos de TG. Ademais houve diminuição

significativa no grau de gordura hepática avaliada por ultrassonografia (Lavekar, Raje et al. 2017).

Mais recentemente, duas metanálises foram publicadas. No estudo de Tang et al. (2019) probióticos reduziram IMC, AST, ALT, fosfatase alcalina, GGT, CT, lipoproteína de baixa densidade (LDL-c), TG, TNF- α , leptina, glicose, insulina e infiltração de gordura hepática. Porém não houve diferenças para circunferência da cintura, razão cintura-quadril, massa de gordura, albumina, HDL-c, homa-IR, PCR, IL-6 e adiponectina (Tang, Huang et al. 2019). Xiao et al. (2019) demonstraram que o uso de probióticos reduziu IMC, AST, ALT, GGT, insulina, CT, além de homa-IR. Por outro lado, não apresentou efeito sobre a glicose de jejum, TNF- α e outros marcadores lipídicos (Xiao, Lin et al. 2019).

Porém existem fatores que precisam ser ponderados nestes estudos: a heterogeneidade com relação à variação das cepas utilizadas, dose e tempo de tratamento; os desfechos avaliados a nível populacional (média), o que não leva em consideração variáveis individuais tão importantes dada a heterogeneidade intrínseca do ser humano, especialmente em contextos patológicos; e, por fim, a interpretação dos resultados pode ser prejudicada porque alguns estudos não foram conduzidos apenas com probióticos, e sim associados com prebióticos ou medicamentos.

As características e principais achados dos artigos citados nestas revisões sistemáticas e metanálises foram reunidas na **Tabela 1**. Artigos que avaliaram o consumo de alimentos contendo probióticos e não de probióticos propriamente ditos não foram incluídos na tabela. Assim como não foram aqueles com desfechos diferentes ao NAFLD, ou com intervenção concomitante de prebióticos ou medicamentos.

Tabela 1. Características principais dos estudos incluídos nas metanálises que avaliaram o efeito da suplementação de probióticos em marcadores DHGNA e comorbidades associadas.

Ref.	País	Idade	Sexo (M/F)	N Amostral (Prob/Pla)	Desenho do Estudo	Intervenção	Duração	Marcadores (efeito)
Ahn, Jun et al. 2019	Coréia do Sul	43,32 ± 12,9	48% / 51,5%	65 (30/35)	Estudo randomizado, duplo-cego, controlado por placebo	Mix de <i>L. acidophilus</i> CBT LA1, <i>L. rhamnosus</i> CBT LR5, <i>L. paracasei</i> CBT LPC5, <i>P. pentosaceus</i> CBT SL4, <i>B. lactis</i> CBT BL3, e <i>B. breve</i> CBT BR3 10 ⁹ UFC/1,4 g vs placebo	12 semanas	Peso(↓), IMC(↓), gordura corporal total (↓), grau de gordura visceral por bioimpedância(↓), TG (↓), fração 28ntra-hepática de gordura quantificada por MRI-PDF (-). Área de gordura abdominal(-), área de gordura visceral(-), rigidez hepática medida com Fibroscan (-), CT(-), HDL-c(-), TNFα(-), ALT(-), AST(-), glicose(-), insulina(-), homa-IR(-), IL-6(-), LPS(-)
Aller, De Luis et al. 2011	Espanha	46,8 ± 13,4	71% / 29%	28 (14/14)	Estudo randomizado, duplo cego	1 comprimido/d de um mix de probióticos <i>L. bulgaricus</i> + <i>S. thermophilus</i> (500 milhões UFC/d) vs placebo (amido)	3 meses	AST(↓), ALT(↓), GGT(↓), HDL-c(-), TG(-), IMC(-), TNFα(-), CT(-), LDL-c(-), IL-6(-), glicose(-), insulina(-), homa(-)
Alisi, Bedogni et al. 2014	Itália	10,7 ± 1,3	35% / 65%	44 (22/22)	Estudo controlado, randomizado, duplo cego	1 sachê/d de VSL#3 (<i>S. thermophilus</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. longum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. paracasei</i> , e <i>L. delbrueckii</i> spp. <i>Bulgaricus</i>) se os participantes tinham <10 anos, ou 2 sachês de VSL#3 se tinham >10 anos, vs placebo	4 meses	IMC(↓), ALT(-), TG(-), homa(-), GLP-1(↑) e aGLP1(↑) Melhorou grau de esteatose baseado sobre US
Famouri, Shariat et al. 2017	Irã	12,6 ± 1,9	50% / 50%	64 (32/32)	ECR, triplo-cego	1 cápsula/d (<i>L. acidophilus</i> , 3x10 ⁹ UFC; <i>B. lactis</i> , 6x10 ⁹ UFC; <i>B. bifidum</i> , 2x10 ⁹ UFC; <i>L. rhamnosus</i> , 2x10 ⁹ UFC), vs placebo	12 semanas	AST(↓), ALT(↓), CT(↓), LDL-c(↓), TG(↓), CC(↓), HDL-c(-), IMC(-) Melhorou grau de esteatose baseado sobre US
Kobyliak, Abenavoli et al. 2018	Ucrânia	Prob: 53,4±9,55 Pla: 57,29 ± 10,45	-	58 (30/28)	ECR, duplo cego, centro único *Pacientes Diabetes tipo 2 e DHGNA	1 sachê/d de “Symbiter” (contendo 14 cepas dos gêneros <i>Lactobacillus</i> + <i>Lactococcus</i> (6x10 ¹⁰ UFC/g), <i>Bifidobacterium</i> (1x10 ¹⁰ /g), <i>Propionibacterium</i> (3x10 ¹⁰ /g), <i>Acetobacter</i> (1x10 ⁶ /g)	8 semanas	<i>FLI score</i> (↓), AST(↓), GGT(↓), TNFα(↓), IL-6(↓) Esteatose hepática por US(-), ALT(-), CT(-), LDL-c(-), VLDL(-), HDL-c(-), TG(-), IL-1β(-), IL-8(-), IFN-γ(-).
Javadi et al. 2017	Irã	42,0 ± 8,9	G1 – 85% / 15% G2 – 84% / 16% G3 – 83% / 17% G4 – 68% / 32%	75 (20 prob/ 19 preb/ 17 prob + preb/ 19 pla)	Ensaio clínico duplo-cego controlado por placebo	Grupo 1: 2 cápsulas de 250mg/d de <i>Bifidobacterium longum</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i> 2 × 10 ⁹ UFC/d vs placebo Grupo 2: sachê de prebiótico inulina (10g/d) vs placebo Grupo 3: probiótico + prebiótico vs placebo Grupo 4: placebo de probiótico e prebiótico	12 semanas	AST(↓), ALT(↓) – G1, G2 e G3 FA(-), GGT(-), albumina(-), bilirrubina(-)

Miccheli, Capuani et al. 2015	Itália	10,7 ± 1,3	90% / 10%	31 (15/16)	ECR, triplo cego	1 sachê de VSL#3 se o participante tinha <10 anos, ou 2 sachês de VSL#3 se >10 anos, vs placebo	4 meses	IMC(↓), AST(↓), GLP-1(↓), aGLP-1(↓), ALT(-), CT(-), LDL-c(-), HDL-c(-), TG(-), glicose(-), insulina(-) Melhorou grau de esteatose baseado em US
Mobini, Tremaroli et al. 2017	Suécia	65,0 ± 6,0	23% / 77%	44 (15/14/15)	Estudo controlado por placebo, randomizado, duplo cego *Pacientes Diabetes tipo 2 e DHGNA	3 grupos paralelos de participantes receberam 10 ⁸ ou 10 ¹⁰ UFC de <i>L. reuteri</i> (BioGaia) vs placebo	12 semanas	AST(-), ALT(-), CT(-), LDL-c(-), HDL-c(-), TG(-), PCR(-), CC(-), glicose(-), índice de sensibilidade à insulina(-), esteatose hepática(-), IMC(↑ baixa dose)
Sepideh, Karim et al. 2016	Irã	44.71 ± 1.64	67% / 33%	42 (21/21)	Estudo controlado, randomizado, duplo cego	1g/d de Lactocare (<i>Lactobacillus casei</i> 3 x 10 ⁹ UFC/g, <i>Lactobacillus acidophilus</i> 3 x 10 ⁹ UFC/g, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 7 x 10 ⁹ UFC/g, <i>Lactobacillus bulgaricus</i> 5 x 10 ⁸ UFC/g, <i>Bifidobacterium breve</i> 2 x 10 ¹⁰ UFC/g, <i>Bifidobacterium longum</i> 1 x 10 ⁹ UFC/g, e <i>Streptococcus thermophilus</i> 3 x 10 ⁸ UFC/g vs placebo	8 semanas	Glicose(↓), insulina(↓), homa-IR(↓), IL-6(↓) Peso(-), IMC, CC(-), razão cintura-quadril(-), HbA1C(-), TNF-α(-).
Vajro, Mandato et al. 2011	Itália	10,7 ± 2,1	100% / 0%	20 (10/10)	Estudo piloto, duplo cego, controlado por placebo	<i>Lactobacillus</i> GG (12 bilhões UFC/d) ou placebo	8 semanas	ALT(↓), Anticorpos anti-peptidoglicano-polissacarídeo(↓), IMC(-), gordura visceral por US(-), TNFα(-)

Abreviaturas: ALT, alanina aminotransferase; AST, aspartato aminotransferase; CT, colesterol total; DHGNA, doença hepática gordurosa não-alcoólica; F, feminino; FA, fosfatase alcalina; GLP-1, *glucagon-like peptide-1*; aGLP-1, *activated glucagon-like peptide-1*; FA, fosfatase alcalina; GGT, gama glutamil-transferase; HDL-c, lipoproteína de alta densidade; HbA1C, hemoglobina glicada; homa-IR, *homoeostasis model assessment of insulin resistance*; IFN-γ, interferon gama; IL-1β, interleucina 1 beta; IL-6, interleucina 6; IL-8, interleucina 8; IMC, índice de massa corporal; LDL-c, lipoproteína de baixa densidade; M, masculino; N/A, não aplicável; PCR, proteína C-reativa; Pla, placebo; Prob, probiótico; TG, triglicerídeos; TNFα, fator de necrose tumoral alfa; UFC, unidades formadoras de colônia; US, ultrassonografia; VLDL, *very low-density lipoprotein*

1.4.1 Probióticos no tratamento da EHNA

Trazendo a abordagem dos probióticos mais especificamente para o tratamento de EHNA, depara-se com a dificuldade de encontrar trabalhos que especifiquem a população estudada como portadora de EHNA. A maior parte dos estudos generaliza a DHGNA como população de estudo. Recente revisão conduzida por Xie; Haleboua-DeMarzio (2019) sumariza os principais ECRs que utilizaram probióticos ou simbióticos como intervenção para o tratamento de DHGNA e EHNA. Foram retratados 26 ECRs em indivíduos com DHGNA e 7 ECRs com EHNA. Os estudos com EHNA variaram em termos de população de estudo (número amostral e idade), cepas probióticas utilizadas e duração da intervenção (de um mês a um ano). Além disso, algumas das populações estudadas apresentavam comorbidades associadas (como sobrepeso/obesidade e diabetes) ou foram submetidas a alguma outra intervenção em associação aos probióticos/simbióticos, como metformina e dieta baixa em caloria e gordura. Conforme os resultados, pode-se notar maior efeito dos probióticos associado à utilização concomitante de prebióticos, à presença de outra intervenção (medicamento ou dieta), ou à maior duração do tratamento. O principal efeito notado foi a capacidade de diminuir os níveis de transaminases (ALT e/ou AST). Em alguns dos estudos também se percebeu melhora de marcadores inflamatórios hepáticos, perfil lipídico, parâmetros antropométricos, esteatose hepática e atividade da EHNA (Xie and Haleboua-DeMarzio 2019).

Wong et al. (2013) comparou o tratamento com probióticos ao cuidado usual de pacientes com EHNA, com idade entre 18-70 anos. O grupo intervenção recebeu uma mistura de 5 culturas probióticas, frutooligosacrídeos (FOS), celulose, estearato de magnésio, sílica e leite, para ingerir 2 vezes ao dia durante 6 meses. O grupo probiótico teve redução significativa do conteúdo de triglicérido intra-hepático ($p=0,034$), o qual permaneceu estável no grupo de cuidado usual ($p=0,55$). O grupo probiótico também apresentou redução no nível de AST em comparação ao grupo de cuidado usual ($p=0,008$) (Wong, Won et al. 2013).

Outro ECR (entretanto sem cegamento e diagnóstico de EHNA sem biópsia) conduzido com 75 pacientes EHNA sob dieta de baixa caloria e gordura, demonstrou que a intervenção com probióticos e FOS por 12 semanas foi capaz de melhorar a rigidez hepática, medida por elastografia, e diminuir ALT, AST, CT e IMC em relação ao grupo

controle. Ainda, observou-se mudança da composição da microbiota fecal para padrões normais nos pacientes tratados com probióticos (Manzhalii, Virchenko et al. 2017).

Pacientes indianos com EHNA diagnosticado através de biópsia foram randomizados para receber diariamente em um período de 12 meses um mix de probióticos (*Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve* e *Streptococcus thermophilus*) ou placebo, além de orientações sobre exercício físico e redução de peso quando excesso de peso. Em comparação ao placebo, *NAS score* (*NAFLD Activity Score*), balonização dos hepatócitos e fibrose hepática melhoraram no grupo probiótico, com indivíduos deixando de apresentar EHNA definitiva passando a ser classificados como *borderline* ou sem EHNA. Houve melhora também em ALT, bilirrubina, fosfatase alcalina, leptina, TNF- α , interleucina 1 *beta* (IL-1 β), IL-6 e endotoxinas. Por outro lado, não houve mudança no peso corporal, em componentes da síndrome metabólica e na resistência à insulina (homa-IR) (Duseja, Acharya et al. 2019).

Estudo observacional chinês, recentemente publicado, acompanhou durante 3 meses sujeitos com EHNA, diagnosticada por biópsia (Cai, Su et al. 2020). O grupo controle recebeu terapia comportamental (dieta e exercício físico) e o grupo intervenção recebeu, além da terapia comportamental, probióticos (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Enterococcus*). Em ambos os grupos houve redução dos níveis das enzimas hepáticas (ALT, AST e GGT), mas foi mais pronunciada no grupo intervenção. Após o tratamento, CT, TG, LDL-C e HDL-c também melhoraram nos dois grupos, mas os níveis de CT e TG foram inferiores no grupo intervenção em comparação ao grupo controle. As condições da microbiota fecal, índice homa-IR e *NAS score* foram melhores no grupo intervenção do que no grupo controle. Não houve diferença nos níveis de bilirrubinas totais (Cai, Su et al. 2020).

1.5 FATORES PREDITORES DE RESPOSTA AO TRATAMENTO COM PROBIÓTICOS

Atualmente é possível ter acesso a diversos estudos acerca do efeito dos probióticos em diferentes condições clínicas. Em contrapartida, há um número quase equivalente de trabalhos que mostraram falta de eficácia, mesmo ECRs em fase avançada

(III ou IV) (Abid and Koh 2019). Como mencionado anteriormente, são vários os fatores que podem explicar essa variabilidade e ambiguidade nos resultados, especialmente de ordem metodológica. Entretanto deve-se também considerar a magnitude de complexidade da doença bem como sua origem multifatorial, que ajudam a explicar a variabilidade individual do curso clínico da DHGNA e dos resultados alcançados com os tratamentos, permeando entre uma doença de manifestações hepáticas a extra-hepáticas, e de doença benigna a doença progressiva e mortal (Lonardo, Arab et al. 2021).

Somado a isso, tem se observado que cepas dentro do mesmo gênero ou espécie podem provocar efeitos distintos no hospedeiro, diferindo na sua capacidade de crescer e sobreviver no TGI, aderir às células epiteliais intestinais e competir com microrganismos patogênicos (Campana, van Hemert et al. 2017, Wang, Hu et al. 2017). Estes aspectos sugerem que possam existir fatores específicos de cada indivíduo e da sua microbiota interferindo significativamente na ação dos probióticos.

De fato, diferentemente dos modelos animais, humanos são altamente heterogêneos em relação à faixa etária, dieta, genética, configuração da microbiota intestinal e estado clínico, podendo assim, responder de formas diferentes à mesma intervenção (Suez, Zmora et al. 2019). Ainda, o histórico de uso de medicamentos, principalmente antibióticos, e o uso de suplementos alimentares podem impactar o efeito dos probióticos (Zmora, Zilberman-Schapira et al. 2018). Em adição a estas variáveis, outro assunto ainda controverso e que demanda melhor entendimento diz respeito à capacidade das bactérias administradas de colonizar de forma estável ou transitória a mucosa gastrointestinal do hospedeiro, e se esta colonização é necessária para os benefícios do probiótico (Suez, Zmora et al. 2019).

Amostras do TGI de ratos e humanos saudáveis demonstraram que os probióticos encontraram resistência à colonização ao longo do TGI de ratos e humanos. Em roedores, esta resistência foi mediada pela microbiota. Já em seres humanos, houve padrões de colonização dos probióticos específicos para cada indivíduo, cepa ou região intestinal. Alguns indivíduos apresentam maior associação dos probióticos à mucosa intestinal em comparação a outros, sendo a partir deste critério discriminados em indivíduos permissivos ou resistentes à colonização. Este estudo foi o pioneiro em introduzir estes conceitos. Interessantemente, o transplante da microbiota fecal dos indivíduos permissivos ou resistentes para o TGI de ratos livres de germes e, conseqüente suplementação com os mesmos probióticos, recapitulou a característica da microbiota do

doador à colonização dos probióticos (Zmora, Zilberman-Schapira et al. 2018), negando a noção convencional de benefício global destes micro-organismos comerciais.

Ainda neste estudo, os autores Zmora et al. (2018) identificaram fatores do hospedeiro e do seu microbioma que poderiam justificar as diferenças de colonização observadas. Foi notado que as espécies probióticas encontradas no TGI em baixos níveis antes da intervenção foram mais propensas a expandir após à intervenção do que àquelas já em altos níveis. Indivíduos permissivos e resistentes também diferiam na composição e função do seu microbioma de base, e apresentavam diferentes perfis de expressão gênica no estômago e íleo. No estômago, vias relacionadas à resposta imune, inflamação e células T foram significativamente enriquecidas nos indivíduos resistentes, comparado aos permissivos. Por outro lado, no íleo os indivíduos permissivos continham mais vias relacionadas ao sistema imune, e resistentes mais vias relacionadas à digestão, metabolismo, e processamento de xenobióticos (Zmora, Zilberman-Schapira et al. 2018).

O padrão personalizado de colonização impactou significativamente o efeito dos probióticos sobre a composição e função da microbiota e o transcriptoma do hospedeiro. Indivíduos permissivos obtiveram mais benefícios do consumo de probióticos, sofrendo mudanças mais evidentes na composição e função da microbiota, assim como mantiveram a maior carga bacteriana total mesmo após um mês da cessação do tratamento, a qual retornou à linha de base nos resistentes. O transcriptoma de permissivos e resistentes diferiu na região cecal após a suplementação. O ceco de permissivos foi enriquecido com vias relacionadas às células dendríticas, apresentação de antígenos e transporte de íons, ao passo que o ceco dos resistentes apresentou mais vias associadas com a resposta à estímulos exógenos, ativação imune inata e defesa antibacteriana. Adicionalmente, o cólon descendente de indivíduos permissivos enriqueceu-se de vias associadas com resposta imune e sinalização mediada por citocinas (Zmora, Zilberman-Schapira et al. 2018).

Suez et al. (2019) também sugerem que características do hospedeiro e do ambiente em que o mesmo foi exposto previamente à suplementação podem gerar os resultados díspares observados em diferentes indivíduos suplementados com o mesmo probiótico (**Figura 1**). Foi visto que os mecanismos de adesão, hidrofobicidade, autoagregação e imunomodulação podem variar conforme nascimento, faixa etária e condições clínicas específicas. Microbioma permissivo à colonização pelas bactérias probióticas é associado com melhora da SII em mulheres, e da colite e depressão em modelos animais. Ainda sobre estes perfis microbianos pré-suplementação, os níveis

iniciais de butirato nas fezes foram associados com efeitos diferentes do probiótico *Lactobacillus paracasei* DG sobre a microbiota e sobre a produção de butirato em adultos saudáveis. Características da dieta como alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados e uso de fórmula infantil em bebês prematuros podem, respectivamente, prejudicar a adesão dos probióticos à mucosa e seu efeito sobre a sepse tardia.

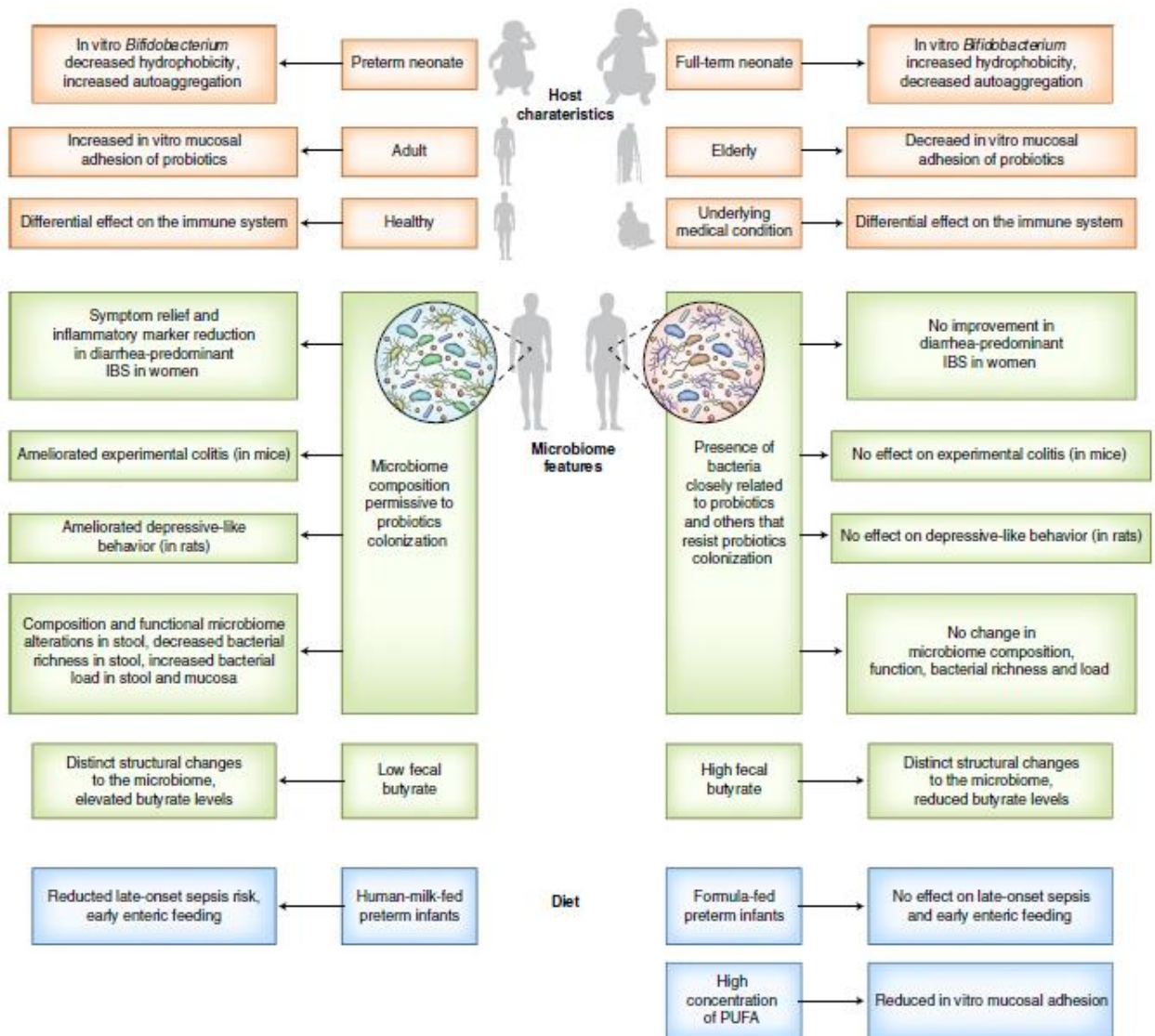


Figura 1. Aspectos do hospedeiro, microbioma e dieta que interferem na resposta aos probióticos (Suez, Zmora et al. 2019).

A identificação de fatores potencialmente preditores de resposta de terapias para a DHGNA/EHNA é fundamental para verificar os pacientes candidatos ao tratamento escolhido e melhorar seus resultados. Recente estudo *post-hoc* propôs-se a identificar os potenciais preditores de resposta histológica, através de um modelo de regressão logística

multivariável, em pacientes com NASH não cirróticos tratados com ácido obeticólico e placebo. O tratamento com ácido obeticólico, NAS >5, triglicerídeos ≤ 154 mg/dL, razão normalizada internacional (INR) ≤ 1 e AST ≤ 49 U/L basais, e diminuição na ALT na 24^a semana ≥ 17 U/L foram preditores associados à resposta histológica (Loomba, Sanyal et al. 2019).

Essas novas descobertas indicam que o sucesso da terapia probiótica na prática clínica pode requerer a mudança de um esquema *one-size-fits-all* (esquema único para todos os indivíduos) para uma abordagem personalizada ao indivíduo, considerando-se tanto aspectos alimentares, faixa etária, moradia, condição clínica/fisiológica/metabólica quanto a filogenética, metagenômica bacteriana, microbiota indígena/nativa/autóctone (Suez, Zmora et al. 2019, Jain 2020). Faz-se necessário também uma melhor compreensão dos fatores que determinam a colonização ou a resistência à colonização pelas bactérias probióticas; da avaliação do potencial de colonização de um indivíduo; e do desenvolvimento de meios para se combater/neutralizar a resistência à colonização, possibilitando reproduzir os efeitos dos probióticos em pacientes resistentes (Suez, Zmora et al. 2019).

Revisão recente aponta algumas perspectivas, em termos de medicina personalizada (**Figura 2**), a serem consideradas em pesquisas futuras com DHGNA (Lonardo, Arab et al. 2021). Coloca que os pacientes incluídos em ensaios clínicos devem ser avaliados profundamente, com o objetivo de tentar definir subgrupos mais homogêneos de pacientes que possam responder melhor às novas terapias em investigação. A abordagem terapêutica deve, portanto, ser personalizada e baseada nas características individuais da doença e nos resultados esperados (Lonardo, Arab et al. 2021).

Cita ainda que os aspectos a seguir são clinicamente relevantes e devem ser considerados para estudos de terapia:

- Sexo e estado reprodutivo: DHGNA tem características dimórficas sexuais definidas (Ballestri, Nascimbeni et al. 2017). Metanálise recente descobriu que as mulheres tem menor risco de desenvolver esteatose branda do que homens, enquanto apresentam um risco aumentado de progressão da fibrose comparado aos homens (Balakrishnan, Patel et al. 2021). A DHGNA na pós-menopausa tende a imitar características epidemiológicas observadas em homens (Venetsanaki and Polyzos 2019).

- **Genética:** Os estudos de associação de todo o genoma (GWAS) mostraram associações consistentes entre um conjunto de variantes genéticas e o desenvolvimento e gravidade da DHGNA (Trépo and Valenti 2020). Os principais genes descobertos são PNPLA3, TM6SF2, MBOAT7, GCKR e HSD17B13, sendo a variante PNLA3 I148 (rs738409) a mais extensivamente caracterizada (Krawczyk, Liebe et al. 2020).
- **Microbiota intestinal:** por todas as razões já citadas, seria extremamente válido avaliar a microbiota antes de uma intervenção, tanto a nível de pesquisa quanto clínico. Mas espera-se que em um futuro próximo, avaliações simplificadas e financeiramente viáveis da composição da microbiota possam ajudar a caracterizar os pacientes e o tratamento que se ajusta a cada indivíduo (Lonardo, Arab et al. 2021).
- **Avaliação endócrina:** o rastreamento de alterações no hormônio tireoestimulante (TSH) parece importante, dada a ocorrência comum de DHGNA induzida por hipotireoidismo. A síndrome de ovários policísticos também é considerada fortemente associada a formas progressivas de DHGNA (Lonardo, Arab et al. 2021).
- **Avaliação cardiometabólica e atividade física** (Lonardo, Arab et al. 2021).

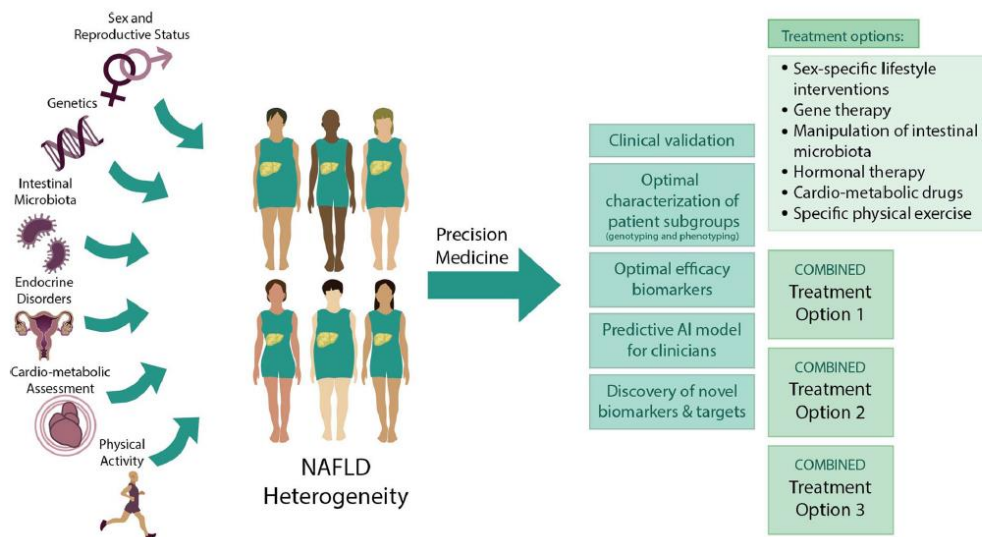


Figura 2. Possíveis determinantes da heterogeneidade e medicina de precisão em DHGNA (Lonardo, Arab et al. 2021).

2. JUSTIFICATIVA

As últimas décadas de pesquisas têm salientado a eficácia dos probióticos na prevenção e tratamento de doenças. Porém, para muitos desfechos clínicos os resultados ainda são divergentes. Isso, em grande parte, é atribuído à complexidade/heterogeneidade dos seres humanos, os quais podem responder de maneira diferente à mesma intervenção. Características da microbiota intestinal e outras variáveis clínicas específicas de cada indivíduo pré-suplementação são sugeridas como fortes determinantes da resposta ao tratamento com probióticos (Suez, Zmora et al. 2019). Dessa maneira, espera-se contribuir para o conhecimento de marcadores preditores de resposta a probióticos em pacientes com EHNA, o que permitiria ajustes do tratamento com base nas características dos pacientes e a utilização de terapias probióticas personalizadas com melhores resultados clínicos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Investigar os potenciais fatores preditores da resposta ao tratamento com probióticos em pacientes com Esteato-hepatite Não Alcoólica.

3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

Levando em consideração os seguintes marcadores pré-intervenção e desfechos pós-intervenção:

- Consumo alimentar e atividade física/Alteração no consumo alimentar, e atividade física.
- Dados antropométricos/Alteração em dados antropométricos
- Marcadores metabólicos/Resposta metabólica;
- Marcadores hepáticos/Resposta hepática;
- Marcadores cardiovasculares/Redução do risco cardiovascular

Os objetivos secundários deste projeto são:

- Avaliar os possíveis fatores preditores específicos de cada desfecho;

- Avaliar quais marcadores biológicos tem potencial preditor para cada um dos desfechos de interesse;
- Avaliar a possível influência dos níveis baseline dos marcadores na resposta dos probióticos aos desfechos de interesse.

3. QUESTÃO DE PESQUISA

Existem preditores antropométricos, metabólicos, hepáticos, cardiovasculares e/ou dietéticos, de resposta ao tratamento com probióticos em pacientes com Esteato-hepatite Não Alcoólica?

4. HIPÓTESES

4.1 HIPÓTESE NULA

Não existem preditores antropométricos, metabólicos, hepáticos, cardiovasculares e/ou dietéticos, de resposta ao tratamento com probióticos em pacientes com Esteato-hepatite Não Alcoólica.

4.2 HIPÓTESE ALTERNATIVA

Existem preditores antropométricos, metabólicos, hepáticos, cardiovasculares e/ou dietéticos, de resposta ao tratamento com probióticos em pacientes com Esteato-hepatite Não Alcoólica, e a integração destes fatores poderá criar perfis de indivíduos respondedores e não respondedores.

REFERÊNCIAS

(EASL), E. A. F. T. S. O. T. L.; (EASD), E. A. F. T. S. O. D.; (EASO), E. A. F. T. S. O. O. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. **J Hepatol**, 64, n. 6, p. 1388-1402, 06 2016.

ABID, M. B.; KOH, C. J. Probiotics in health and disease: fooling Mother Nature? **Infection**, 47, n. 6, p. 911-917, Dec 2019.

AHN, S. B.; JUN, D. W.; KANG, B. K.; LIM, J. H. *et al.* Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Study of a Multispecies Probiotic Mixture in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Sci Rep**, 9, n. 1, p. 1-9, 04 05 2019.

ALISI, A.; BEDOGNI, G.; BAVIERA, G.; GIORGIO, V. *et al.* Randomised clinical trial: The beneficial effects of VSL#3 in obese children with non-alcoholic steatohepatitis. **Aliment Pharmacol Ther**, 39, n. 11, p. 1276-1285, Jun 2014.

ALLEN, S. J.; MARTINEZ, E. G.; GREGORIO, G. V.; DANS, L. F. Probiotics for treating acute infectious diarrhoea. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 11, p. CD003048, Nov 10 2010.

ALLER, R.; DE LUIS, D. A.; IZAOLA, O.; CONDE, R. *et al.* Effect of a probiotic on liver aminotransferases in nonalcoholic fatty liver disease patients: a double blind randomized clinical trial. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, 15, n. 9, p. 1090-1095, Sep 2011.

ARIKE, L.; HANSSON, G. C. The Densely O-Glycosylated MUC2 Mucin Protects the Intestine and Provides Food for the Commensal Bacteria. **J Mol Biol**, 428, n. 16, p. 3221-3229, 08 2016.

ARRESE, M.; CABRERA, D.; KALERGIS, A. M.; FELDSTEIN, A. E. Innate Immunity and Inflammation in NAFLD/NASH. **Dig Dis Sci**, 61, n. 5, p. 1294-1303, May 2016.

ARSLAN, N. Obesity, fatty liver disease and intestinal microbiota. **World J Gastroenterol**, 20, n. 44, p. 16452-16463, Nov 28 2014.

AUGENLICHT, L.; SHI, L.; MARIADASON, J.; LABOISSE, C. *et al.* Repression of MUC2 gene expression by butyrate, a physiological regulator of intestinal cell maturation. **Oncogene**, 22, n. 32, p. 4983-4992, Aug 07 2003.

AWASTI, N.; TOMAR, S. K.; POPHALY, S. D.; POONAM *et al.* Probiotic and functional characterization of bifidobacteria of Indian human origin. **J Appl Microbiol**, 120, n. 4, p. 1021-1032, Apr 2016.

BAFFY, G. Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: the emerging view. **J Hepatol**, 51, n. 1, p. 212-223, Jul 2009.

BAJAJ, J. S.; HEUMAN, D. M.; HYLEMON, P. B.; SANYAL, A. J. *et al.* Altered profile of human gut microbiome is associated with cirrhosis and its complications. **J Hepatol**, 60, n. 5, p. 940-947, May 2014.

BALAKRISHNAN, M.; PATEL, P.; DUNN-VALADEZ, S.; DAO, C. *et al.* Women Have a Lower Risk of Nonalcoholic Fatty Liver Disease but a Higher Risk of Progression vs Men: A Systematic Review and Meta-analysis. **Clin Gastroenterol Hepatol**, 19, n. 1, p. 61-71.e15, 01 2021.

BALLESTRI, S.; NASCIMBENI, F.; BALDELLI, E.; MARRAZZO, A. *et al.* NAFLD as a Sexual Dimorphic Disease: Role of Gender and Reproductive Status in the Development and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Inherent Cardiovascular Risk. **Adv Ther**, 34, n. 6, p. 1291-1326, 06 2017.

BERNÁ, G.; ROMERO-GOMEZ, M. The role of nutrition in non-alcoholic fatty liver disease: Pathophysiology and management. **Liver Int**, 40 Suppl 1, p. 102-108, 02 2020.

BRÜSSOW, H. Probiotics and prebiotics in clinical tests: an update. **F1000Res**, 8, 2019.

BÄCKHED, F.; DING, H.; WANG, T.; HOOPER, L. V. *et al.* The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 101, n. 44, p. 15718-15723, Nov 02 2004.

BÄUMLER, A. J.; SPERANDIO, V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. **Nature**, 535, n. 7610, p. 85-93, 07 2016.

BINNS, N. **Probiotics, Prebiotics and The Gut Microbiota** ILSI Europe Concise Monograph Series Brussels International Life Sciences Institute (ILSI Europe), 2013. Disponível em: <<http://fst.sagepub.com/content/3/4/306.2.full.pdf>>

CABALLERO, S.; CARTER, R.; KE, X.; SUŠAC, B. *et al.* Distinct but Spatially Overlapping Intestinal Niches for Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* and Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. **PLoS Pathog**, 11, n. 9, p. e1005132, Sep 2015.

CAI, G. S.; SU, H.; ZHANG, J. Protective effect of probiotics in patients with non-alcoholic fatty liver disease. **Medicine (Baltimore)**, 99, n. 32, p. e21464, Aug 07 2020.

CAMPANA, R.; VAN HEMERT, S.; BAFFONE, W. Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. **Gut Pathog**, 9, p. 12, 2017.

CANI, P. D. Human gut microbiome: hopes, threats and promises. **Gut**, 67, n. 9, p. 1716-1725, 09 2018.

CHALASANI, N.; YOUNOSSI, Z.; LAVINE, J. E.; CHARLTON, M. *et al.* The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. **Hepatology**, 67, n. 1, p. 328-357, 01 2018.

CHANG, C.; LIN, H. Dysbiosis in gastrointestinal disorders. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, 30, n. 1, p. 3-15, Feb 2016.

CHARLTON, M. R.; BURNS, J. M.; PEDERSEN, R. A.; WATT, K. D. *et al.* Frequency and outcomes of liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis in the United States. **Gastroenterology**, 141, n. 4, p. 1249-1253, Oct 2011.

CHAUDHRY, K. K.; SHUKLA, P. K.; MIR, H.; MANDA, B. *et al.* Glutamine supplementation attenuates ethanol-induced disruption of apical junctional complexes in colonic epithelium and ameliorates gut barrier dysfunction and fatty liver in mice. **J Nutr Biochem**, 27, p. 16-26, Jan 2016.

CLAESSON, M. J.; JEFFERY, I. B.; CONDE, S.; POWER, S. E. *et al.* Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. **Nature**, 488, n. 7410, p. 178-184, Aug 2012.

COPPLE, B. L.; LI, T. Pharmacology of bile acid receptors: Evolution of bile acids from simple detergents to complex signaling molecules. **Pharmacol Res**, 104, p. 9-21, Feb 2016.

CORBIN, K. D.; ZEISEL, S. H. Choline metabolism provides novel insights into nonalcoholic fatty liver disease and its progression. **Curr Opin Gastroenterol**, 28, n. 2, p. 159-165, Mar 2012.

COTRIM, H. P.; PARISE, E. R.; FIGUEIREDO-MENDES, C.; GALIZZI-FILHO, J. *et al.* NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE BRAZILIAN SOCIETY OF HEPATOLOGY CONSENSUS. **Arq Gastroenterol**, 53, n. 2, p. 118-122, 2016 Apr-Jun 2016.

DAVENPORT, E. R.; MIZRAHI-MAN, O.; MICHELINI, K.; BARREIRO, L. B. *et al.* Seasonal variation in human gut microbiome composition. **PLoS One**, 9, n. 3, p. e90731, 2014.

DAY, R. L.; HARPER, A. J.; WOODS, R. M.; DAVIES, O. G. *et al.* Probiotics: current landscape and future horizons. **Future Sci OA**, 5, n. 4, p. FSO391, May 03 2019.

DE MINICIS, S.; DAY, C.; SVEGLIATI-BARONI, G. From NAFLD to NASH and HCC: pathogenetic mechanisms and therapeutic insights. **Curr Pharm Des**, 19, n. 29, p. 5239-5249, 2013.

DERRIEN, M.; BELZER, C.; DE VOS, W. M. Akkermansia muciniphila and its role in regulating host functions. **Microb Pathog**, 106, p. 171-181, May 2017.

DONNELLY, K. L.; SMITH, C. I.; SCHWARZENBERG, S. J.; JESSURUN, J. *et al.* Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **J Clin Invest**, 115, n. 5, p. 1343-1351, May 2005.

DUSEJA, A.; ACHARYA, S. K.; MEHTA, M.; CHHABRA, S. *et al.* High potency multistrain probiotic improves liver histology in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a randomised, double-blind, proof of concept study. **BMJ Open Gastroenterol**, 6, n. 1, p. e000315, 2019.

EL HAGE, R.; HERNANDEZ-SANABRIA, E.; VAN DE WIELE, T. Emerging Trends in "Smart Probiotics": Functional Consideration for the Development of Novel Health and Industrial Applications. **Front Microbiol**, 8, p. 1889, 2017.

ESAIASSEN, E.; HJERDE, E.; CAVANAGH, J. P.; SIMONSEN, G. S. *et al.* Bifidobacterium Bacteremia: Clinical Characteristics and a Genomic Approach To Assess Pathogenicity. **J Clin Microbiol**, 55, n. 7, p. 2234-2248, 07 2017.

ESLAM, M.; SANYAL, A. J.; GEORGE, J.; PANEL, I. C. MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease. **Gastroenterology**, 158, n. 7, p. 1999-2014.e1991, 05 2020.

FAMOURI, F.; SHARIAT, Z.; HASHEMIPOUR, M.; KEIKHA, M. *et al.* Effects of Probiotics on Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Obese Children and Adolescents. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, 64, n. 3, p. 413-417, 03 2017.

FAO/WHO. **Health and Nutrition Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria** Cordoba Joint FAO/WHO Expert Consultation, 2001. Disponible em: <<http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf>>

FELDSTEIN, A. E.; WIECKOWSKA, A.; LOPEZ, A. R.; LIU, Y. C. *et al.* Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: a multicenter validation study. **Hepatology**, 50, n. 4, p. 1072-1078, Oct 2009.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, 136, n. 5, p. E359-386, Mar 01 2015.

FERREIRA, R. M.; PEREIRA-MARQUES, J.; PINTO-RIBEIRO, I.; COSTA, J. L. *et al.* Gastric microbial community profiling reveals a dysbiotic cancer-associated microbiota. **Gut**, 67, n. 2, p. 226-236, 02 2018.

FIANCHI, F.; LIGUORI, A.; GASBARRINI, A.; GRIECO, A. *et al.* Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) as Model of Gut-Liver Axis Interaction: From Pathophysiology to Potential Target of Treatment for Personalized Therapy. **Int J Mol Sci**, 22, n. 12, Jun 17 2021.

FUJIMURA, K. E.; DEMOOR, T.; RAUCH, M.; FARUQI, A. A. *et al.* House dust exposure mediates gut microbiome Lactobacillus enrichment and airway immune defense against allergens and virus infection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 111, n. 2, p. 805-810, Jan 14 2014.

GAUDIER, E.; RIVAL, M.; BUISINE, M. P.; ROBINEAU, I. *et al.* Butyrate enemas upregulate Muc genes expression but decrease adherent mucus thickness in mice colon. **Physiol Res**, 58, n. 1, p. 111-119, 2009.

GE, H.; LI, X.; WEISZMANN, J.; WANG, P. *et al.* Activation of G protein-coupled receptor 43 in adipocytes leads to inhibition of lipolysis and suppression of plasma free fatty acids. **Endocrinology**, 149, n. 9, p. 4519-4526, Sep 2008.

GENSOLLEN, T.; IYER, S. S.; KASPER, D. L.; BLUMBERG, R. S. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. **Science**, 352, n. 6285, p. 539-544, Apr 2016.

GOLABI, P.; PAIK, J.; REDDY, R.; BUGIANESI, E. *et al.* Prevalence and long-term outcomes of non-alcoholic fatty liver disease among elderly individuals from the United States. **BMC Gastroenterol**, 19, n. 1, p. 56, Apr 16 2019.

GOLDENBERG, J. Z.; YAP, C.; LYTVYN, L.; LO, C. K. *et al.* Probiotics for the prevention of Clostridium difficile-associated diarrhea in adults and children. **Cochrane Database Syst Rev**, 12, p. CD006095, 12 19 2017.

GOLDSTEIN, E. J.; TYRRELL, K. L.; CITRON, D. M. Lactobacillus species: taxonomic complexity and controversial susceptibilities. **Clin Infect Dis**, 60 Suppl 2, p. S98-107, May 2015.

GROSCHWITZ, K. R.; HOGAN, S. P. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. **J Allergy Clin Immunol**, 124, n. 1, p. 3-20; quiz 21-22, Jul 2009.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J.-R. Gut flora in health and disease. **The Lancet**, v. 361, n. 9356, p. 512–519, 2003.

HENAO-MEJIA, J.; ELINAV, E.; THAISS, C. A.; FLAVELL, R. A. The intestinal microbiota in chronic liver disease. **Adv Immunol**, 117, p. 73-97, 2013.

HILLS, R. D.; PONTEFRACT, B. A.; MISHCON, H. R.; BLACK, C. A. *et al.* Gut Microbiome: Profound Implications for Diet and Disease. **Nutrients**, 11, n. 7, 16 July 2019.

HOFFMANN, D. E.; FRASER, C. M.; PALUMBO, F.; RAVEL, J. *et al.* Probiotics: achieving a better regulatory fit. **Food Drug Law J**, 69, n. 2, p. 237-272, ii, 2014.

JAIN, N. The Need for Personalized Approaches to Microbiome Modulation. **Front Public Health**, 8, p. 144, 2020.

JAVADI L, GHAVAMI M, KHOSHBATEN M, *et al.* The effect of probiotic and/or prebiotic on liver function tests in patients with nonalcoholic fatty liver disease: a double blind randomized clinical trial. **Iran Red Crescent Med J**, mar 2017.

KASPER, P.; MARTIN, A.; LANG, S.; KÜTTING, F. *et al.* NAFLD and cardiovascular diseases: a clinical review. **Clin Res Cardiol**, 110, n. 7, p. 921-937, Jul 2021.

KHALESI, S.; BELLISSIMO, N.; VANDELANOTTE, C.; WILLIAMS, S. *et al.* A review of probiotic supplementation in healthy adults: helpful or hype? **Eur J Clin Nutr**, 73, n. 1, p. 24-37, 01 2019.

KINOSHITA, M.; SUZUKI, Y.; SAITO, Y. Butyrate reduces colonic paracellular permeability by enhancing PPARgamma activation. **Biochem Biophys Res Commun**, 293, n. 2, p. 827-831, May 03 2002.

KLEINER, D. E.; BRUNT, E. M. Nonalcoholic fatty liver disease: pathologic patterns and biopsy evaluation in clinical research. **Semin Liver Dis**, 32, n. 1, p. 3-13, Feb 2012.

KRAWCZYK, M.; LIEBE, R.; LAMMERT, F. Toward Genetic Prediction of Nonalcoholic Fatty Liver Disease Trajectories: PNPLA3 and Beyond. **Gastroenterology**, 158, n. 7, p. 1865-1880.e1861, 05 2020.

LAVEKAR, A. S.; RAJE, D. V.; MANOHAR, T.; LAVEKAR, A. A. Role of Probiotics in the Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Meta-analysis. **Euroasian J Hepatogastroenterol**, 7, n. 2, p. 130-137, 2017 Jul-Dec 2017.

LEE, S. M.; DONALDSON, G. P.; MIKULSKI, Z.; BOYAJIAN, S. *et al.* Bacterial colonization factors control specificity and stability of the gut microbiota. **Nature**, 501, n. 7467, p. 426-429, Sep 19 2013.

LEONI, S.; TOVOLI, F.; NAPOLI, L.; SERIO, I. *et al.* Current guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review with comparative analysis. **World J Gastroenterol**, 24, n. 30, p. 3361-3373, Aug 14 2018.

LEUNG, C.; RIVERA, L.; FURNESS, J. B.; ANGUS, P. W. The role of the gut microbiota in NAFLD. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, 13, n. 7, p. 412-425, 07 2016.

LIN, H. V.; FRASSETTO, A.; KOWALIK, E. J.; NAWROCKI, A. R. *et al.* Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms. **PLoS One**, 7, n. 4, p. e35240, 2012.

LOGUERCIO, C.; FEDERICO, A.; TUCCILLO, C.; TERRACCIANO, F. *et al.* Beneficial effects of a probiotic VSL#3 on parameters of liver dysfunction in chronic liver diseases. **J Clin Gastroenterol**, 39, n. 6, p. 540-543, Jul 2005.

LOMAN, B. R.; HERNÁNDEZ-SAAVEDRA, D.; AN, R.; RECTOR, R. S. Prebiotic and probiotic treatment of nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. **Nutr Rev**, 76, n. 11, p. 822-839, 11 01 2018.

LONARDO, A.; ARAB, J. P.; ARRESE, M. Perspectives on Precision Medicine Approaches to NAFLD Diagnosis and Management. **Adv Ther**, 38, n. 5, p. 2130-2158, 05 2021.

LONG, S. L.; GAHAN, C. G. M.; JOYCE, S. A. Interactions between gut bacteria and bile in health and disease. **Mol Aspects Med**, 56, p. 54-65, 08 2017.

LOOMBA, R.; SANYAL, A. J.; KOWDLEY, K. V.; TERRAULT, N. *et al.* Factors Associated With Histologic Response in Adult Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis. **Gastroenterology**, 156, n. 1, p. 88-95.e85, 01 2019.

LOUIS, P.; HOLD, G. L.; FLINT, H. J. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. **Nat Rev Microbiol**, 12, n. 10, p. 661-672, Oct 2014.

LUCKEY, T. D. Introduction to intestinal microecology. **Am J Clin Nutr**, 25, n. 12, p. 1292-1294, Dec 1972.

LYNCH, S. V.; PEDERSEN, O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. **N Engl J Med**, 375, n. 24, p. 2369-2379, Dec 15 2016.

MA, Y. Y.; LI, L.; YU, C. H.; SHEN, Z. *et al.* Effects of probiotics on nonalcoholic fatty liver disease: a meta-analysis. **World J Gastroenterol**, 19, n. 40, p. 6911-6918, Oct 28 2013.

MADSEN, K.; CORNISH, A.; SOPER, P.; MCKAIGNEY, C. *et al.* Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. **Gastroenterology**, 121, n. 3, p. 580-591, Sep 2001.

MALDONADO-GÓMEZ, M. X.; MARTÍNEZ, I.; BOTTACINI, F.; O'CALLAGHAN, A. *et al.* Stable Engraftment of *Bifidobacterium longum* AH1206 in the Human Gut Depends on Individualized Features of the Resident Microbiome. **Cell Host Microbe**, 20, n. 4, p. 515-526, Oct 12 2016.

MANZHALII, E.; VIRCHENKO, O.; FALALYEYEVA, T.; BEREGOVA, T. *et al.* Treatment efficacy of a probiotic preparation for non-alcoholic steatohepatitis: A pilot trial. **J Dig Dis**, 18, n. 12, p. 698-703, Dec 2017.

MANZOOR, R.; AHMED, W.; AFIFY, N.; MEMON, M. *et al.* Trust Your Gut: The Association of Gut Microbiota and Liver Disease. **Microorganisms**, 10, n. 5, May 18 2022.

MICCHELI, A.; CAPUANI, G.; MARINI, F.; TOMASSINI, A. *et al.* Urinary (1)H-NMR-based metabolic profiling of children with NAFLD undergoing VSL#3 treatment. **Int J Obes (Lond)**, 39, n. 7, p. 1118-1125, Jul 2015.

MOBINI, R.; TREMAROLI, V.; STÅHLMAN, M.; KARLSSON, F. *et al.* Metabolic effects of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 in people with type 2 diabetes: A randomized controlled trial. **Diabetes Obes Metab**, 19, n. 4, p. 579-589, 04 2017.

MOKHTARI, Z.; GIBSON, D. L.; HEKMATDOOST, A. Nonalcoholic Fatty Liver Disease, the Gut Microbiome, and Diet. **Adv Nutr**, 8, n. 2, p. 240-252, Mar 2017.

MORRISON, D. J.; PRESTON, T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. **Gut Microbes**, 7, n. 3, p. 189-200, 05 2016.

MUSSO, G.; GAMBINO, R.; CASSADER, M. Obesity, diabetes, and gut microbiota: the hygiene hypothesis expanded? **Diabetes Care**, 33, n. 10, p. 2277-2284, Oct 2010.

NATIVIDAD, J. M.; VERDU, E. F. Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: pathological and therapeutic implications. **Pharmacol Res**, 69, n. 1, p. 42-51, Mar 2013.

NEEF, A.; SANZ, Y. Future for probiotic science in functional food and dietary supplement development. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, 16, n. 6, p. 679-687, Nov 2013.

ODDY, W. H.; HERBISON, C. E.; JACOBY, P.; AMBROSINI, G. L. *et al.* The Western dietary pattern is prospectively associated with nonalcoholic fatty liver disease in adolescence. **Am J Gastroenterol**, 108, n. 5, p. 778-785, May 2013.

PANT, K.; YADAV, A. K.; GUPTA, P.; ISLAM, R. *et al.* Butyrate induces ROS-mediated apoptosis by modulating miR-22/SIRT-1 pathway in hepatic cancer cells. **Redox Biol**, 12, p. 340-349, 08 2017.

PARSÉUS, A.; SOMMER, N.; SOMMER, F.; CAESAR, R. *et al.* Microbiota-induced obesity requires farnesoid X receptor. **Gut**, 66, n. 3, p. 429-437, 03 2017.

PÉREZ MARTÍNEZ, G.; BÄUERL, C.; COLLADO, M. C. Understanding gut microbiota in elderly's health will enable intervention through probiotics. **Benef Microbes**, 5, n. 3, p. 235-246, Sep 2014.

QIN, J.; LI, R.; RAES, J.; ARUMUGAM, M. *et al.* A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, 464, n. 7285, p. 59-65, Mar 2010.

QUÉVRAIN, E.; MAUBERT, M. A.; MICHON, C.; CHAIN, F. *et al.* Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. **Gut**, 65, n. 3, p. 415-425, Mar 2016.

RABOT, S.; MEMBREZ, M.; BRUNEAU, A.; GÉRARD, P. *et al.* Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism. **FASEB J**, 24, n. 12, p. 4948-4959, Dec 2010.

RATZIU, V.; BELLENTANI, S.; CORTEZ-PINTO, H.; DAY, C. *et al.* A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. **J Hepatol**, 53, n. 2, p. 372-384, Aug 2010.

RECTOR, R. S.; THYFAULT, J. P.; WEI, Y.; IBDAH, J. A. Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: an update. **World J Gastroenterol**, 14, n. 2, p. 185-192, Jan 14 2008.

SANDERS, F. W.; GRIFFIN, J. L. De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose : hepatic de novo lipogenesis and metabolic disease. **Biol Rev Camb Philos Soc**, 91, n. 2, p. 452-468, May 2016.

SCHWENGER, K. J.; CLERMONT-DEJEAN, N.; ALLARD, J. P. The role of the gut microbiome in chronic liver disease: the clinical evidence revised. **JHEP Rep**, 1, n. 3, p. 214-226, Sep 2019.

SCHWIMMER, J. B.; DEUTSCH, R.; KAHEN, T.; LAVINE, J. E. *et al.* Prevalence of fatty liver in children and adolescents. **Pediatrics**, 118, n. 4, p. 1388-1393, Oct 2006.

SCORLETTI, E.; BYRNE, C. D. Extrahepatic Diseases and NAFLD: The Triangular Relationship between NAFLD, Type 2-Diabetes and Dysbiosis. **Dig Dis**, 34 Suppl 1, p. 11-18, 2016 2016.

SENDER, R.; FUCHS, S.; MILO, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. **PLoS Biol**, 14, n. 8, p. e1002533, 08 2016.

SEPIDEH, A.; KARIM, P.; HOSSEIN, A.; LEILA, R. *et al.* Effects of Multistrain Probiotic Supplementation on Glycemic and Inflammatory Indices in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Double-Blind Randomized Clinical Trial. **J Am Coll Nutr**, 35, n. 6, p. 500-505, 08 2016.

SHANAHAN, F.; VAN SINDEREN, D.; O'TOOLE, P. W.; STANTON, C. Feeding the microbiota: transducer of nutrient signals for the host. **Gut**, 66, n. 9, p. 1709-1717, 09 2017.

SHEN, J.; WONG, G. L.; CHAN, H. L.; CHAN, H. Y. *et al.* PNPLA3 gene polymorphism accounts for fatty liver in community subjects without metabolic syndrome. **Aliment Pharmacol Ther**, 39, n. 5, p. 532-539, Mar 2014.

SHEN, J.; ZUO, Z. X.; MAO, A. P. Effect of probiotics on inducing remission and maintaining therapy in ulcerative colitis, Crohn's disease, and pouchitis: meta-analysis of randomized controlled trials. **Inflamm Bowel Dis**, 20, n. 1, p. 21-35, Jan 2014.

SONNENBURG, J. L.; CHEN, C. T.; GORDON, J. I. Genomic and metabolic studies of the impact of probiotics on a model gut symbiont and host. **PLoS Biol**, 4, n. 12, p. e413, Nov 2006.

SOOKOIAN, S.; PIROLA, C. J. Genetic predisposition in nonalcoholic fatty liver disease. **Clin Mol Hepatol**, 23, n. 1, p. 1-12, Mar 2017.

SUEZ, J.; ZMORA, N.; SEGAL, E.; ELINAV, E. The pros, cons, and many unknowns of probiotics. **Nat Med**, 25, n. 5, p. 716-729, 05 2019.

SÁNCHEZ, B.; DELGADO, S.; BLANCO-MÍGUEZ, A.; LOURENÇO, A. *et al.* Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. **Mol Nutr Food Res**, 61, n. 1, 01 2017.

TAILFORD, L. E.; OWEN, C. D.; WALSHAW, J.; CROST, E. H. *et al.* Discovery of intramolecular trans-sialidases in human gut microbiota suggests novel mechanisms of mucosal adaptation. **Nat Commun**, 6, p. 7624, Jul 2015.

TANG, Y.; HUANG, J.; ZHANG, W. Y.; QIN, S. *et al.* Effects of probiotics on nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. **Therap Adv Gastroenterol**, 12, p. 1-23, 2019.

TAP, J.; MONDOT, S.; LEVENEZ, F.; PELLETIER, E. *et al.* Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. **Environ Microbiol**, 11, n. 10, p. 2574-2584, Oct 2009.

THURSBY, E.; JUGE, N. Introduction to the human gut microbiota. **Biochem J**, 474, n. 11, p. 1823-1836, 05 2017.

TILG, H.; ADOLPH, T. E.; GERNER, R. R.; MOSCHEN, A. R. The Intestinal Microbiota in Colorectal Cancer. **Cancer Cell**, 33, n. 6, p. 954-964, 06 2018.

TRIPATHI, A.; DEBELIUS, J.; BRENNER, D. A.; KARIN, M. *et al.* The gut-liver axis and the intersection with the microbiome. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, 15, n. 7, p. 397-411, 07 2018.

TRÉPO, E.; VALENTI, L. Update on NAFLD genetics: From new variants to the clinic. **J Hepatol**, 72, n. 6, p. 1196-1209, 06 2020.

TURNBAUGH, P. J.; LEY, R. E.; HAMADY, M.; FRASER-LIGGETT, C. M. *et al.* The human microbiome project. **Nature**, 449, n. 7164, p. 804-810, Oct 18 2007.

UYGUN, A.; KADAYIFCI, A.; ISIK, A. T.; OZGURTAS, T. *et al.* Metformin in the treatment of patients with non-alcoholic steatohepatitis. **Aliment Pharmacol Ther**, 19, n. 5, p. 537-544, Mar 01 2004.

VAJRO, P.; MANDATO, C.; LICENZIATI, M. R.; FRANZESE, A. *et al.* Effects of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in pediatric obesity-related liver disease. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, 52, n. 6, p. 740-743, Jun 2011.

VALENTI, L.; FRACANZANI, A. L.; BUGIANESI, E.; DONGIOVANNI, P. *et al.* HFE genotype, parenchymal iron accumulation, and liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **Gastroenterology**, 138, n. 3, p. 905-912, Mar 2010.

VENETSANAKI, V.; POLYZOS, S. A. Menopause and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Review Focusing on Therapeutic Perspectives. **Curr Vasc Pharmacol**, 17, n. 6, p. 546-555, 2019.

VUPPALANCHI, R.; GOULD, R. J.; WILSON, L. A.; UNALP-ARIDA, A. *et al.* Clinical significance of serum autoantibodies in patients with NAFLD: results from the nonalcoholic steatohepatitis clinical research network. **Hepatol Int**, 6, n. 1, p. 379-385, Jan 2012.

WACKLIN, P.; MÄKIVUOKKO, H.; ALAKULPPI, N.; NIKKILÄ, J. *et al.* Secretor genotype (FUT2 gene) is strongly associated with the composition of Bifidobacteria in the human intestine. **PLoS One**, 6, n. 5, p. e20113, 2011.

WANG, H. B.; WANG, P. Y.; WANG, X.; WAN, Y. L. *et al.* Butyrate enhances intestinal epithelial barrier function via up-regulation of tight junction protein Claudin-1 transcription. **Dig Dis Sci**, 57, n. 12, p. 3126-3135, Dec 2012.

WANG, L.; HU, L.; XU, Q.; YIN, B. *et al.* Bifidobacterium adolescentis Exerts Strain-Specific Effects on Constipation Induced by Loperamide in BALB/c Mice. **Int J Mol Sci**, 18, n. 2, Feb 2017.

WANG, Z.; KLIPFELL, E.; BENNETT, B. J.; KOETH, R. *et al.* Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. **Nature**, 472, n. 7341, p. 57-63, Apr 07 2011.

WILLEMSSEN, L. E.; KOETSIER, M. A.; VAN DEVENTER, S. J.; VAN TOL, E. A. Short chain fatty acids stimulate epithelial mucin 2 expression through differential effects on prostaglandin E(1) and E(2) production by intestinal myofibroblasts. **Gut**, 52, n. 10, p. 1442-1447, Oct 2003.

WONG, V. W.; WON, G. L.; CHIM, A. M.; CHU, W. C. *et al.* Treatment of nonalcoholic steatohepatitis with probiotics. A proof-of-concept study. **Ann Hepatol**, 12, n. 2, p. 256-262, 2013 Mar-Apr 2013.

XIAO, M. W.; LIN, S. X.; SHEN, Z. H.; LUO, W. W. *et al.* Systematic Review with Meta-Analysis: The Effects of Probiotics in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Gastroenterol Res Pract**, 2019, p. 19, 2019.

XIE, C.; HALEGOUA-DEMARZIO, D. Role of Probiotics in Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Does Gut Microbiota Matter? **Nutrients**, 11, n. 11, Nov 19 2019.

YOU, M.; CRABB, D. W. Molecular mechanisms of alcoholic fatty liver: role of sterol regulatory element-binding proteins. **Alcohol**, 34, n. 1, p. 39-43, Aug 2004.

YOUNOSSI, Z. M.; KOENIG, A. B.; ABDELATIF, D.; FAZEL, Y. *et al.* Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. **Hepatology**, 64, n. 1, p. 73-84, 07 2016.

ZEISEL, S. H. Genetic polymorphisms in methyl-group metabolism and epigenetics: lessons from humans and mouse models. **Brain Res**, 1237, p. 5-11, Oct 27 2008.

ZELBER-SAGI, S.; NITZAN-KALUSKI, D.; GOLDSMITH, R.; WEBB, M. *et al.* Long term nutritional intake and the risk for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a population based study. **J Hepatol**, 47, n. 5, p. 711-717, Nov 2007.

ZMORA, N.; ZILBERMAN-SCHAPIRA, G.; SUEZ, J.; MOR, U. *et al.* Personalized Gut Mucosal Colonization Resistance to Empiric Probiotics Is Associated with Unique Host and Microbiome Features. **Cell**, 174, n. 6, p. 1388-1405.e1321, 09 2018.