



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

NATALINA NUNES VARANDAS

***Fígado gordo não alcoólico e obesidade: o papel das bactérias
intestinais***

ARTIGO DE REVISÃO NARRATIVA

ÁREA CIENTÍFICA DE FISIOPATOLOGIA

Trabalho realizado sob a orientação de:
PROFESSORA DOUTORA ANABELA MOTA PINTO
PROFESSOR DOUTOR RUI VASCO QUINTAIS GRADIZ

ABRIL/2022

Fígado gordo não alcoólico e obesidade: o papel das bactérias intestinais

Natalina Nunes Varandas ¹, Professora Doutora Anabela Mota Pinto ², Professor Doutor Rui
Vasco Quintais Gradiz ^{2*}

¹Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

²Instituto de Patologia Geral, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

*Autor correspondente:

Instituto de patologia Geral, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Rua Larga, 3004-504, Coimbra, Portugal

rgradiz@fmed.uc.pt

Índice

Resumo.....	5
Abstract.....	6
Abreviaturas e Acrónimos	7
1. Introdução.....	9
2. Metodologia	11
3. Perspetiva histórica	12
4. Epidemiologia	13
5. Esteatose hepática e esteato-hepatite não alcoólica	14
5.1 Fatores de risco.....	15
5.2 Manifestações clínicas.....	15
5.3 Diagnóstico.....	16
6. Patogénese	19
7. Fígado gordo não alcoólico e obesidade	21
8. Microbiota intestinal	25
9. Barreira intestinal.....	27
10. Disbiose, fígado gordo não alcoólico e obesidade	29
11. Mecanismos fisiopatológicos na origem do fígado gordo não alcoólico	31
11.1. Disfunção da barreira intestinal	32
11.2. Sobrecrescimento bacteriano no intestino delgado.....	32
11.3. Inflamação.....	34
11.4. Hormonas intestinais	36
11.5. Ácidos gordos de cadeia curta	37
11.6. Colina.....	38
11.7. Ácidos biliares	39
11.8. Etanol.....	40
11.9. Fator 4 semelhante à angiotensinogénese.....	41
12. Terapêutica.....	42
12.1. Modificação do estilo de vida	42
12.2. Tratamento da obesidade.....	43

12.3.	Sensibilizadores de insulina	43
12.4.	Vitamina E	44
12.5.	Probióticos, Prebióticos e Simbióticos.....	44
12.6.	Antibióticos.....	45
12.7.	Transplante fecal.....	45
12.8.	Novas terapêuticas	46
13.	Prognóstico	47
14.	Conclusão	48
15.	Agradecimentos	50
16.	Bibliografia	51

Resumo

O fígado gordo não alcoólico (FGNA) é considerado um distúrbio metabólico e a sua patogênese inclui uma complexa relação entre fatores nutricionais, hormonais e genéticos. Trata-se da doença hepática crónica (DHC) mais comum e relaciona-se com a prevalência elevada de obesidade.

Pensa-se que a disfunção metabólica que ocorre no tecido adiposo (TA), cujo papel é da responsabilidade das adipocinas, esteja relacionada com a desregulação imunológica que acompanha as doenças metabólicas. A barreira intestinal (BI) e a microbiota intestinal (MI) são dois componentes essenciais no eixo intestino-fígado e têm um papel preponderante no desenvolvimento do FGNA. A MI está envolvida na captação de energia e o seu armazenamento no TA. Também tem sido associada ao desenvolvimento de inflamação crónica de baixo grau relacionada com a obesidade. A modulação da MI pela sobrecarga nutricional e obesidade vai promover alterações na permeabilidade intestinal (PI) que permitem aos produtos bacterianos sofrerem translocação para a circulação sanguínea. Adicionalmente, a alteração da MI promove o desenvolvimento de FGNA através da mediação em processos inflamatórios, resistência à insulina (RI), produção de ácidos gordos de cadeia curta (AGCC), interferência nos ácidos biliares (AB) e metabolismo da colina.

Deste modo, pela elucidação do seu papel, a MI torna-se relevante como alvo terapêutico no FGNA. Primariamente, no tratamento está indicada a modificação do estilo de vida. Frequentemente, será necessária a adição de farmacoterapia, porém constata-se a ausência de aprovação de fármacos específicos para o FGNA, sendo que a abordagem terapêutica à obesidade poderá constituir um alvo relevante. Nesse sentido, diversas terapêuticas, como probióticos, prebióticos e transplante fecal, são hoje investigados como recursos potenciais na manipulação da MI. Também a abordagem farmacológica nos processos de inflamação e fibrose subjacentes ao FGNA é atualmente uma área de pesquisa.

A presente revisão da narrativa clarifica os mecanismos que estão na génese do FGNA com interferência da obesidade e MI, assim como intervenções terapêuticas na doença.

Palavras-chave

Fígado gordo não alcoólico, Obesidade, Microbiota Intestinal, Sobrecrescimento Bacteriano no Intestino Delgado, Permeabilidade Intestinal

Abstract

Non-alcoholic fatty liver (NAFLD) is considered a metabolic disorder and its pathogenesis includes a complex relationship between nutritional, hormonal and genetic factors. It is the most common chronic liver disease (CLD) and is related to the high prevalence of obesity.

It is thought that the metabolic dysfunction that occurs in adipose tissue (AT), whose role is the responsibility of adipokines, is related to the immune dysregulation that accompanies metabolic diseases. The intestinal barrier (IB) and the intestinal microbiota (IM) are two essential components of the gut-liver axis and play a role in the development of NAFLD. IM is involved in capturing and storing energy in the AT. Also, it has been linked to the development of obesity-related chronic low-grade inflammation. The modulation of IM by nutritional overload and obesity promotes changes in intestinal permeability (IP) that allow bacterial products to undergo translocation into the bloodstream. Additionally, the alteration of IM promotes the development of NAFLD through mediation in inflammatory processes, insulin resistance (IR), production of short chain fatty acids (SCFA), interference with bile acids (BA) and choline metabolism.

Thus, due its role, IM becomes relevant as a therapeutic target in NAFLD. Primarily, lifestyle modification is indicated for treatment. Often, the addition of pharmacotherapy will be necessary, however, is a lack of approval of specific drugs for NAFLD, whereby the therapeutic approach to obesity may constitute a relevant target. In this sense, several therapies, such as probiotics, prebiotics and fecal transplantation, are being investigated as potential resources for manipulation of IM. Also, the pharmacological approach in the inflammation and fibrosis processes underlying the NAFLD is an area of research currently.

The present narrative review clarifies the mechanisms subjacent the genesis of NAFLD with interference of obesity and IM and therapeutic interventions in the disease.

Keywords

Non-alcoholic fatty liver disease, Obesity, Gut microbiota, Small Intestinal Bacterial Overgrowth, Gut permeability

Abreviaturas e Acrónimos

AB – Ácidos biliares

AGCC – Ácidos gordos de cadeia curta

ANGPTL4 – Fator 4 semelhante à angiopoietina

BI – Barreira intestinal

CCR2 – Recetor de quimiocina tipo 2

CCR5 – Recetor de quimiocina tipo 5

CHC – Carcinoma hepatocelular

ChREBP – Proteína de ligação ao elemento de resposta aos hidratos de carbono

DAMPs – Padrões moleculares associados a danos

DCV – Doença cardiovascular

DHC – Doença hepática crónica

DM – Diabetes *mellitus*

DRC – Doença renal crónica

EH – Esteatose hepática

EHNA – Esteato-hepatite não alcoólica

FGNA – Fígado gordo não alcoólico

FMO3 – Enzima flavina mono-oxigenase 3

FIAF – Fator adipocitário induzido pelo jejum

FXR – Recetor farnesóide X

GLP-1 – Peptídeo-1 semelhante ao glucagon

GLP-2 – Peptídeo-2 semelhante ao glucagon

HTA – Hipertensão arterial

IgA – Imunoglobulina A

IL – Interleucina

IMC – Índice de massa corporal

LPL – Lipoproteína lipase

LPS – Lipopolissacarídeo

MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno

MCP – Proteína de quimiotaxia de aceitação de metil

MyD88 – Fator de diferenciação mielóide 88

MI – Microbiota intestinal

NF-κB – Fator nuclear-κB

NLRs – Recetores intracelulares semelhantes a NOD

NLRP3 – NLR com domínio pirina 3

PAMs – Peptídeos antimicrobianos

PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos

PEMT – Promotor fosfatidiletanolamina N-metiltransferase

PNPLA3 – Proteína 3 contendo o domínio de fosfolipase semelhante a patatina

PI – Permeabilidade intestinal

PPARα – Proliferador do peroxissoma alfa

PPAR δ – Proliferador do peroxissoma gama

PYY – Peptídeo YY

RI – Resistência à insulina

ROS – Espécies reativas de oxigénio

rDNA – DNA ribossomal

SM – Síndrome metabólica

SCBID – Sobrecrecimento bacteriano no intestino delgado

SREBP-1c – Proteína 1c de ligação ao elemento regulador dos esteróides

TA – Tecido adiposo

TG – Triglicéridos

TGI – Trato gastrointestinal

TGR5 – Recetor de ácido biliar acoplado à proteína G

TLRs – Recetores membranares do tipo Toll

TMA – Trimetilamina

TMAO – Trimetilamina-N-óxido

TNF-α – Fator de necrose tumoral α

VCAM – Proteína de adesão de células vasculares

VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade

VP – Veia porta

1. Introdução

Até ao final da década de 90, do século XX, o fígado gordo não alcoólico (FGNA) não despertava atenção clínica, porém este paradigma alterou-se e, atualmente, é considerada uma entidade relevante atendendo à epidemiologia, morbidade e mortalidade associadas. (1) Mundialmente, quase 1 bilhão de pessoas são afetadas por esta patologia, e estima-se que a elevada exposição a fatores de risco metabólicos na população pediátrica e o envelhecimento da população conduza ao aumento da prevalência de formas avançadas da doença. (2)

O FGNA traduz a manifestação hepática da síndrome metabólica (SM) e é considerada a principal causa de doença hepática crônica (DHC) em crianças e adultos que vivem em países industrializados. (3) Nem sempre é possível o diagnóstico precoce, atendendo ao facto de que a maioria dos doentes é assintomática. (4)

Pensa-se que o FGNA seja uma doença multissistémica com manifestações extra-hepáticas, de que são exemplo complicações metabólicas como a diabetes *mellitus* (DM) tipo 2, disfunção tiroideia, osteoporose, doença renal crônica (DRC), doença cardiovascular (DCV) e neoplasias, responsáveis por taxas elevadas de morbidade e mortalidade. (5)

A patogénese do FGNA é complexa e ainda não compreendida na totalidade, considerando-se que na origem da patologia está a interação de fatores ambientais, principalmente dietéticos, com distúrbios da microbiota intestinal (MI) e fatores individuais. (6)

A obesidade, impulsionada pelo consumo excessivo de alimentos com alto teor calórico aliado ao sedentarismo, é um problema de saúde global. (7) A condição de excesso de peso e a obesidade estão associadas a várias comorbidades, incluindo FGNA, logo com repercussão significativa na saúde individual e impacto económico nos sistemas de saúde. (8) Perspetiva-se que o aumento na prevalência e gravidade do FGNA acompanhará as tendências crescentes da obesidade. (9)

O intestino humano é colonizado por uma microbiota diversificada, onde se salienta uma ampla gama de bactérias, que inclui mais de 1.000 espécies diferentes. (10) A MI é importante na regulação do metabolismo energético do hospedeiro, sendo que alterações na sua composição ou funcionalidade podem repercutir-se no tecido adiposo (TA) e fígado. (11) Por outro lado, existe uma interação próxima entre o fígado e o intestino, baseada na evidência de que o fígado produz substâncias benéficas que são absorvidas pelo intestino e cerca de 70% do suprimento sanguíneo hepático deriva da veia porta (VP) que transporta sangue proveniente do intestino. (12)

A disbiose diz respeito ao desequilíbrio da MI normal. Pode resultar de uma interferência de fatores ambientais, imunológicos ou do hospedeiro. (13) A disbiose está relacionada com a dieta rica em energia e associa-se ao desenvolvimento de obesidade. (14)

Recentemente, a disfunção do eixo intestino-fígado, que se apresenta na forma de disbiose, sobrecrecimento bacteriano, e alterações na permeabilidade intestinal (PI), tem suscitado interesse para elucidar a origem do FGNA. (3) Também os vários metabolitos produzidos pela MI podem afetar o fígado e assim modular a suscetibilidade ao FGNA. (10) As descobertas recentes mostraram que a disbiose perturba o metabolismo hepático dos lípidos e hidratos de carbono, e afeta o equilíbrio entre os fatores pró e anti-inflamatórios no fígado, levando ao aparecimento do FGNA e o avanço para EHNA. (15)

O rastreio precoce, modificação dos fatores de risco metabólicos, monitorização da progressão para doença avançada, e a prevenção de lesão hepática concomitante por outros agentes, constituem os princípios globais na gestão do FGNA. (4)

Ainda que tenham ocorrido progressos no esclarecimento da patogénese do FGNA, na identificação de alvos terapêuticos e no avanço do desenvolvimento de medicamentos, existem ainda desafios consideráveis. Subsiste um conhecimento inadequado da história natural e dos principais fatores patogénicos, bem como se verifica uma escassez de modelos *in vitro* e animais ideais para reproduzir a doença e testar novos agentes. (16) A investigação atual centra-se em estratégias terapêuticas baseadas na MI de forma a alterar, direta e indiretamente, o crescimento e a função das bactérias intestinais, assim como a produção de metabolitos benéficos, sugerindo que no futuro possam ter intervenção no FGNA. (17)

Pretende-se com este artigo uma revisão da literatura baseada no conhecimento e evidências atuais sobre a associação da MI com a obesidade e o FGNA, salientando-se a relevância das bactérias intestinais na patogénese e potenciais opções farmacológicas para o tratamento da patologia. A relevância científica do tema justifica-se pela elevada e crescente prevalência do FGNA, pelo que a elucidação dos diversos mecanismos fisiopatológicos subjacentes permite direcionar a prevenção e terapêutica da doença.

2. Metodologia

Para a presente revisão narrativa foi utilizado como recurso a pesquisa bibliográfica através da consulta das bases de dados eletrônicas Pubmed e Biblioteca do Conhecimento Online (B-On).

Esta recolha de informação foi realizada no período compreendido entre agosto e dezembro de 2021, com utilização das seguintes palavras-chave: “non-alcoholic fatty liver disease”, “non-alcoholic steatohepatitis”, “obesity”, “gut microbiota”, “intestinal bacteria”, “small intestinal bacterial overgrowth” e “gut permeability”.

Foram considerados artigos relacionados com a temática, em língua inglesa, e publicados a partir do ano de 2011. Primariamente, a seleção dos artigos foi realizada com base nos títulos, seguindo-se a leitura dos resumos, tendo sido dada mais relevância a artigos de revisão, revisões sistemáticas e estudos em humanos. Foram excluídos os artigos não relacionados com o objetivo do trabalho.

Decorrente da pesquisa da literatura foram selecionados um total de 110 artigos dirigidos ao tema e com informação científica relevante para a elaboração deste trabalho.

3. Perspetiva histórica

Em 1836, Thomas Addison foi o primeiro a descrever a degenerescência gorda do fígado relacionado com o consumo excessivo de álcool. (18) Carl von Rokitansky, no ano de 1849, propôs a hipótese de que a acumulação de gordura causaria cirrose. Mais tarde, em 1885, Bartholow descreve a possível associação entre obesidade e fígado gordo que, posteriormente, veio a ser corroborada pelos achados histológicos de infiltração gorda no fígado de doentes obesos relatados, em 1958, por Westwater e Feiner. (1, 19) Quatro anos depois, a hepatite do fígado gordo foi descrita por Heribert Thaler.

O termo esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) foi introduzido por Jurgen Ludwig, em 1980, tendo por base um estudo com 20 pacientes, maioritariamente do sexo feminino, com obesidade e diabetes, associadas ao fígado gordo com características de esteato-hepatite alcoólica (hepatite lobular, infiltrados inflamatórios, corpos de Mallory e grau variável de fibrose hepática), mas onde não se verificava o consumo de álcool. Em 1986, Schaffner e Thaler foram os primeiros a usar o nome de "doença hepática gorda não alcoólica", tendo sido depois documentada a progressão para cirrose por Randall Lee. (18, 19)

4. Epidemiologia

Nas últimas duas décadas, o FGNA aumentou de prevalência aproximadamente na mesma proporção da obesidade. (20) Estima-se que o FGNA seja a causa mais comum de DHC. (21) É mais comum no sexo masculino e a prevalência da doença aumenta com a idade, porém há evidência que o FGNA tem emergido em crianças e adolescentes obesos, apresentando estas maiores taxas de progressão para cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC). (4) Atualmente, a EHNA é considerada a segunda indicação mais frequente de transplante hepático nos Estados Unidos da América. (22)

A prevalência global de FGNA, diagnosticado através de ecografia, é de cerca de 25,2% com grande variação geográfica. Apesar de ser frequente em todos os continentes, observam-se taxas mais altas na América do Sul e Médio Oriente onde atinge 30,5% e 31,8% da população, respetivamente, enquanto em África se verifica uma prevalência inferior (13,5%) de FGNA. (23, 24) Na Europa, a prevalência é de cerca de 24%, com gradiente crescente do Norte para o Sul. (20) Na Ásia, foi estimada a prevalência de 27%, contudo há discrepância no valor entre os vários países do continente, atendendo às disparidades acentuadas nos níveis de desenvolvimento económico, político e educacional. (22)

O FGNA pode afetar 58% dos indivíduos com excesso de peso e atingir cerca de 74 - 98% de indivíduos com obesidade mórbida submetidos a cirurgia bariátrica. (8) A estimativa da prevalência da EHNA situa-se entre os 3-6% dos adultos, dos quais cerca de 10 a 15% evoluem para cirrose hepática. (22) No futuro, a população com FGNA irá tendencialmente aumentar em cerca de 18%, até 2030. A projeção para a EHNA indica que esta sofrerá um aumento de 56%. (25)

Em 2015, nos Estados Unidos da América existiam 83,1 milhões de doentes (cerca de 25% da população) e projeta-se que o valor se expanda para os 100 milhões de doentes em 2030. Durante este intervalo de tempo, a proporção de casos com progressão para EHNA elevar-se-á de 20% para 27% dos indivíduos com FGNA. (16)

A incidência da doença não é tão clara quanto a prevalência. As estimativas populacionais variam de 28,01 por 1.000 pessoas/ano, em Israel, a 52,34 por 1.000 pessoas/ano, na Ásia. Em pacientes com FGNA, a incidência anual de CHC foi de 1,8 por 1.000 pessoas/ano e a taxa de mortalidade geral foi de 5,3 por 1.000 pessoas/ano. (21, 24)

As modificações dramáticas que ocorreram no estilo de vida, durante o século XX, explicam os dados epidemiológicos do FGNA, facto que obriga a considerá-lo uma prioridade na saúde em diversas áreas mundiais. (22)

5. Esteatose hepática e esteato-hepatite não alcoólica

O termo FGNA é usado para descrever genericamente um amplo espectro de características histológicas de doença hepática que inclui a esteatose hepática (EH) simples, com deposição de lípidos nos hepatócitos, e a EHNA, em que se verifica que concomitantemente à presença de lípidos ocorre inflamação periportal e lobular associada a balonização. (3, 26, 27) Este último achado histológico define-se como o aumento dos hepatócitos (>30 µm) com citoplasma rarefeito e alterações no citoesqueleto, correspondendo a uma característica-chave no diagnóstico de EHNA. (28)

A EH é considerada uma condição benigna e apenas uma pequena fração progride para EHNA, porém esta não é reversível e, eventualmente, pode progredir para fibrose peri-sinusoidal, cirrose ou CHC, sendo que as duas últimas condições têm indicação crescente para transplante hepático. (6, 8, 27) O surgimento de CHC associado à EHNA é anterior à evolução para cirrose em cerca de 35-50% dos casos, sendo esta percentagem maior comparativamente à associação tumoral precoce nas restantes doenças hepáticas. Assim, tendencialmente os tumores são maiores e menos passíveis de terapêutica curativa, uma vez que o CHC surge precocemente à realização do rastreio. (16)

A definição de FGNA pressupõe a presença de esteatose em > 5% dos hepatócitos, principalmente na forma de triglicerídeos (TG), devido a alteração dos mecanismos reguladores da síntese lipídica a nível hepático. Trata-se de uma condição determinada por elevação das aminotransferases e/ou exame de imagem e, por vezes, biópsia, na exclusão de causas secundárias como alcoolismo, fármacos, infeções, doenças genéticas e metabólicas (Tabela 1). (1, 29, 30)

Tabela 1. Causas de esteatose hepática secundária	
Alcoolismo	
Infeções	Hepatite C; Hepatite D
Doenças genéticas	Doença de Wilson; Abetalipoproteinémia; Hemocromatose
Doenças metabólicas	Deficiência da lecitina-colesterol aciltransferase; Doença de armazenamento dos ésteres do colesterol; Defeitos da β-oxidação mitocondrial dos ácidos gordos; Deficiência de lipase ácida lisossomal
Fármacos	Amiodarona; Metotrexato; Tamoxifeno; Corticosteróides; Anti-retrovirais; Valproato; Tetraciclina
Outras	Hepatite auto-imune; Síndrome de Reye; Nutrição parenteral; Síndrome de HELLP

Adaptado de Carr *et al.*, 2016

5.1 Fatores de risco

O FGNA considera-se uma manifestação da SM, pelo que a DM, hipertensão arterial (HTA), obesidade e dislipidemia são consideradas fatores de risco importantes para o desenvolvimento da doença. (31, 32) A associação entre FGNA e a SM é considerada bidirecional, particularmente na DM e HTA, o que significa que a SM aumenta o risco de FGNA e, por outro lado, a presença de FGNA pode aumentar as comorbilidades da SM. (16)

Outros fatores podem influenciar o risco de EH e EHNA: idade avançada (o envelhecimento leva à redistribuição da gordura e perda de massa muscular), dieta (pelo aumento da ingestão de glicose, frutose e gordura saturada) e sedentarismo. (11, 33, 34)

Ainda que se acredite que o FGNA seja impulsionado maioritariamente por estilos de vida pouco saudáveis, a genética pode ter um papel importante. A diferença interétnica na prevalência de FGNA apoia a hipótese de predisposição genética, de que são exemplos os polimorfismos em genes que afetam o metabolismo lipídico, adipocinas, mediadores de fibrose e stresse oxidativo. (5, 11) Vários fatores de risco genético para EHNA foram identificados, sendo que o polimorfismo de nucleótido único (1148M) do gene que codifica a proteína 3 contendo o domínio de fosfolipase semelhante a patatina (PNPLA3), cuja função é regular a lipólise das gotículas lipídicas dos hepatócitos, é a variante genética mais fortemente associada à EHNA. (16)

A MI afeta o metabolismo hepático de hidratos de carbono e lípidos, influenciando o equilíbrio entre os fatores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, o que se repercute diretamente no FGNA e progressão para EHNA. (30)

Em associação à patologia têm emergido as condições clínicas como o hipotireoidismo, síndrome do ovário poliquístico e síndrome de apneia obstrutiva do sono. (21)

Em suma, embora alguns fatores de risco genéticos tenham sido identificados, o excesso de peso e a presença de SM continuam a ser os fatores de risco mais pertinentes no FGNA, tendo especial relevância a resistência à insulina (RI). (31)

5.2 Manifestações clínicas

O FGNA possui taxas de progressão muito distintas entre os indivíduos e diferentes manifestações clínicas. (16) Surge geralmente entre a 4ª e 6ª décadas de vida e, frequentemente, os doentes possuem excesso de peso ou obesidade, sendo relatada uma prevalência de até 80% em obesos, sendo que apenas 16% dos doentes têm IMC normal. (35)

A maioria dos indivíduos com FGNA são assintomáticos. Em alguns casos, estão presentes sintomas inespecíficos como fadiga ou desconforto hepático no quadrante superior direito. Na fase de doença avançada podem ser visíveis sinais de hipertensão portal. (36) Ao exame físico, é frequente verificar-se obesidade central e, por vezes, hepatomegalia. Eventualmente reconhecem-se manifestações clínicas de dislipidemia, como xantelasmas e xantomias, e manifestações de DM, como dermatopatia diabética, que levantam a suspeita da presença de FGNA. (5) A acantose *nigricans*, sugestivo de RI, e estigmas de DHC como icterícia, ascite, aranhas vasculares, eritema palmar e edema, podem estar presentes. (29)

5.3 Diagnóstico

O diagnóstico precoce e preciso de FGNA, principalmente na presença de fibrose, é vital para a gestão da doença. (23) Frequentemente, a deteção desta entidade clínica é incidental ou por suspeita no contexto de comorbilidades metabólicas. (31) O diagnóstico de FGNA requer que haja EH documentada por imagem ou histologia, na ausência de consumo significativo de álcool, etiologias concorrentes para EH e causas coexistentes de DHC. (37)

Maioritariamente, a história clínica associada aos testes laboratoriais e imagiológicos são usados para o diagnóstico. (38) A biópsia hepática é aplicada quando o diagnóstico é incerto ou existe suspeita de doença avançada, apesar de ser o único método que permite obter a histologia confirmatória do diagnóstico. (29, 38)

A avaliação clínica deve incluir uma história detalhada de consumo de álcool, fatores de risco metabólicos pessoais e familiares, e medicação habitual. (29). De forma a diferenciar o FGNA da doença hepática alcoólica, considera-se que o limite de ingestão diária de álcool seja <30 gramas para homens e <20 gramas para mulheres. (36)

Por rotina, a nível bioquímico, são solicitados os valores de aminotransferases, fosfatase alcalina, bilirrubina e gamaglutamil transferase. (39) A deteção de enzimas leve ou moderadamente elevadas é o primeiro achado diagnóstico de FGNA. (5) Porém, atendendo à baixa sensibilidade, os níveis normais enzimáticos não excluem patologia. (19) Aliás, doentes com FGNA podem ter valores séricos de aminotransferases normais e possuem todo o espectro histopatológico do FGNA, desde a EH a cirrose. (34)

Analiticamente, deve ser incluindo um hemograma completo, função renal, glicémia em jejum e/ou hemoglobina glicada (HbA1c), perfil lipídico, ferritina sérica e saturação da transferrina. (39) O teste de sensibilidade à insulina deve ser considerado em todos os doentes. (36) De forma a excluir causas secundárias de DHC, reconhece-se a importância de solicitar função tiroideia, serologia hepática viral para hepatite B e C, autoanticorpos hepáticos

(anticorpos antinucleares, anticorpos antimitocondriais e anticorpos antimusculares), imunoglobulinas (A, G e M), α -1 antitripsina e ceruloplasmina sérica. (39) O diagnóstico de FGNA é desafiador em alguns doentes, uma vez que autoanticorpos séricos elevados, ferritina alta e ceruloplasmina baixa podem ser observados na ausência de DHC concomitante. (29)

A ultrassonografia hepática é o método imagiológico mais amplamente utilizado como rastreio de FGNA, sendo que os achados diagnósticos se traduzem por um fígado hiperecogénico, em comparação com o rim ou baço. Apesar de ser um método preciso e facilmente disponível na prática clínica, a ultrassonografia hepática tem uma sensibilidade baixa para diagnóstico quando o conteúdo de gordura no fígado é inferior a 30%. Tal facto, conduziu à aplicação de modalidades de imagem como a espectroscopia e ressonância magnética para a deteção de FGNA. Contudo, a difusão do seu uso é ainda limitada atendendo ao seu custo e disponibilidade. (33, 40)

A biópsia hepática é o *gold standard* para o diagnóstico de EHNA e estadiamento da fibrose hepática, apesar de possuir algumas limitações, como experiência para interpretação, custo económico e desconforto do paciente, pelo que nem sempre é realizada. (4, 37) As características histológicas de EHNA (Figura 1) incluem esteatose macrovesicular (gotículas lipídicas que ocupam a maior parte do citoplasma e causam desvio do núcleo para a periferia da célula), inflamação dispersa (infiltrados inflamatórios mononucleares e, ocasionalmente, polimorfonucleares), balonização dos hepatócitos, corpos apoptóticos e de Mallory-Denk, estes últimos correspondem a inclusões citoplasmáticas irregulares eosinofílicas constituídas principalmente por filamentos intermediários de queratina 8 e 18. Também podem ser visualizados pequenos lipogranulomas (resultantes da rutura de hepatócitos carregados de lípidos e rodeados de células inflamatórias), agregados de células de Kupffer e, eventualmente, algum grau de fibrose, podendo relacionar-se com o estágio final da cirrose. (28, 41)

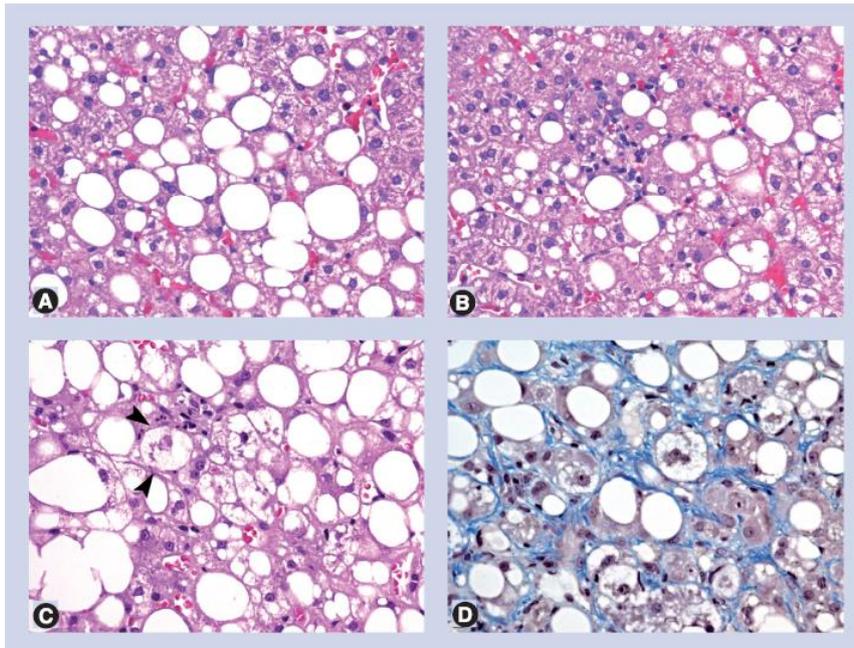


Figura 1. Características histológicas do fígado gordo não alcoólico (FGNA)

A. Esteatose simples de predomínio macrovesicular. Sem infiltrados inflamatórios (hematoxilina e eosina (H&E); 400x). **B.** Hepatócitos com esteatose macrovesicular e presença de células mononucleares (H&E; 400x). **C.** Esteatose e balonização hepatocitária com pequenos corpos de Mallory-Denk (indicados pela seta) e inflamação ligeira que traduz esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) (H&E; 400x). **D.** Deposição de colágeno pericelular e peri-sinusoidal (azul de anilina cromotrópico; 400x).

Adaptado de Lackner, 2011

6. Patogénese

Durante a última década, diversas áreas contribuíram para a compreensão mais profunda do FGNA. (42) A patogénese da doença e sua progressão é induzida por múltiplos fenómenos, no modelo considerado “multiple parallel-hit”, onde vários fatores genéticos e ambientais interagem numa base individual, de forma paralela, complexa e dinâmica. (9, 23)

Originalmente, a patogénese do FGNA foi considerada como um processo de dois “hits”. (23, 34) O primeiro “hit” diz respeito à ocorrência de RI e excesso de ácidos gordos, com indução de EH. (43) A acumulação de TG nos hepatócitos ocorre pelo aumento de ácidos gordos livres circulantes, provenientes da dieta ou lipólise no TA, e da lipogénese hepática *de novo*, em que os ácidos gordos são sintetizados nos hepatócitos com recurso a outros substratos, de que são exemplo os hidratos de carbono. O fluxo excessivo de ácidos gordos livres tem um contributo maior comparativamente à ativação da lipogénese *de novo*. (23, 27) Como mecanismos moleculares podem estar ainda associadas a síntese desregulada de lipoproteínas ou diminuição da oxidação de ácidos gordos. (10) Posteriormente ao primeiro “hit”, o fígado fica suscetível a diversos fatores, incluindo stresse oxidativo, e subsequente, peroxidação lipídica, sinalização de citocinas pró-inflamatórias e disfunção mitocondrial, que promovem lesão celular hepática, inflamação e fibrose, constituindo o segundo “hit”. (10, 34) Nos últimos anos tem crescido o interesse pela disfunção do eixo intestino-fígado, sendo esta considerada um “hit” para a progressão da doença. (3)

As descobertas recentes apoiam assim a hipótese de “multiple parallel-hit” para a fisiopatologia do FGNA, em que estão implicadas alterações hepáticas, intestinais e no TA. (43) Vários processos paralelos, como fatores genéticos, sinalização por adipocinas, stresse do retículo endoplasmático, e disfunção da barreira intestinal (BI), podem atuar em conjunto causando a progressão da EH para EHNA. (44) Diversos estímulos, incluindo a morte de hepatócitos, moléculas secretadas pelo TA, e metabolitos com origem na MI, podem promover inflamação e fibrogénese através da ativação de macrófagos hepáticos (células de Kupffer), que recrutam monócitos e leucócitos da circulação. Por fim, esta cadeia de eventos culmina na ativação de células estreladas hepáticas, seguida pela síntese e deposição excessivas de matriz extracelular (Figura 2). (27)

É importante destacar o papel das células inflamatórias e do stresse oxidativo na indução da inflamação, produção excessiva de espécies reativas de oxigénio (ROS) e disfunção mitocondrial hepática, bem como a desregulação e a polarização de macrófagos (macrófagos M1 considerados inflamatórios *versus* macrófagos M2 com ação anti-inflamatória) na patogénese da EHNA. O stresse oxidativo induz ativação do fator nuclear-kB (NF-kB) com aumento da expressão do fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina (IL)-

1 β e IL-6. O stresse do retículo endoplasmático induzido pelo stress oxidativo leva à regulação positiva dos esteróis lipogénicos hepáticos, o que resulta na EH. Adicionalmente, o stresse oxidativo prejudica a cadeia respiratória mitocondrial e peroxidação de cardiolipina, leva ao aumento de ROS e promoção de dano mitocondrial. (43, 45)

Em conclusão, a evolução de EH simples para EHNA resulta de uma interação complexa envolvendo células hepáticas (parenquimatosas e não parenquimatosas) e sinalização por moléculas biológicas que serão abordadas mais à frente. (27)

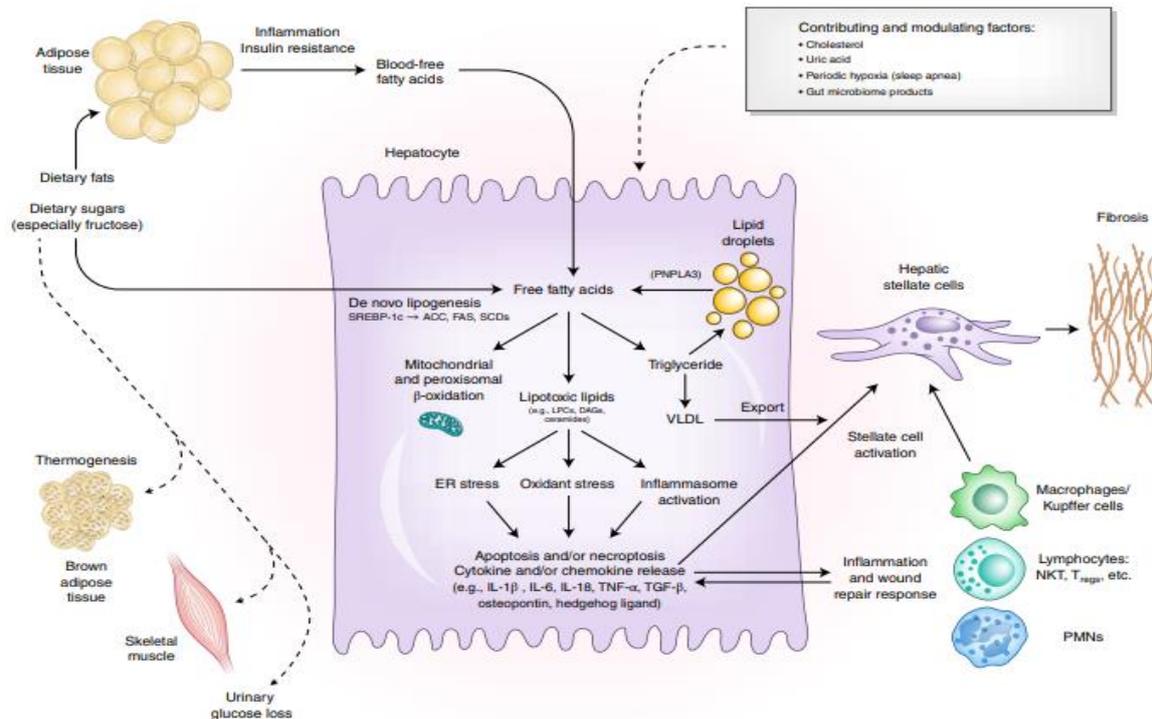


Figura 2. Modelo de lesão hepática na patogénese da esteato-hepatite não alcoólica (EHNA)

Os ácidos gordos livres originam-se a partir da lipólise de triglicéridos (TG) no tecido adiposo (TA) e são transportados até ao fígado. A lipogénese hepática de novo também contribui para o fluxo de ácidos gordos livres a nível hepático. Os destinos principais dos ácidos gordos nos hepatócitos são a beta-oxidação mitocondrial e a re-esterificação para formar TG. Estes podem ser exportados para o sangue como lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) ou armazenados em gotículas lipídicas. Os TG sofrem lipólise e vão repor o *pool* de ácidos gordos livres dos hepatócitos. Quando a eliminação de ácidos gordos livres por beta-oxidação ou formação de TG é sobrecarregada, os ácidos gordos podem contribuir para a formação de espécies lipotóxicas que levam ao stress oxidativo, stress do retículo endoplasmático, e ativação do inflamassoma. Estes processos são responsáveis pelo fenótipo da EHNA com lesão hepatocelular, inflamação, ativação de células estelares e acumulação progressiva de excesso de matriz extracelular. SCD: esteroil-CoA dessaturase; FAS: ácido gordo sintetase; NKT: células T Natural Killer; Tregs: células T reguladoras; PMNs, leucócitos polimorfonucleares. PNPLA3: proteína 3 contendo o domínio de fosfolipase semelhante a patatina.

Adaptado de Friedman *et al.*, 2018

7. Fígado gordo não alcoólico e obesidade

O excesso de peso ou a obesidade ocupam o quinto lugar nos fatores de risco de mortalidade em todo Mundo. Define-se excesso de peso quando o índice de massa corporal (IMC) se situa entre os 25 – 29,9 kg/m² e obesidade quando superior a 30 kg/m². (8) O aumento da ingestão de alimentos excedendo as necessidades, combinado com um estilo de vida sedentário, em indivíduos geneticamente predispostos, leva à expansão do TA como resultado do desequilíbrio nutricional. (11, 46) Trata-se de uma doença crónica multifatorial associada a outras doenças metabólicas e comorbilidades, incluindo DM tipo 2, HTA, dislipidemia, doença coronária, apneia de sono, osteoartrite, depressão e FGNA. Assim, tem associada um grande espectro de consequências médicas e psicossociais. (8, 47)

Considera-se que será a interação entre fatores genéticos e ambientais que estão na origem desta condição, uma vez que o conhecimento atual das variantes genéticas associadas à obesidade permite apenas explicar 5% da variação do IMC. (48) Embora existam condições hereditárias associadas ao excesso de peso corporal, de que são exemplos a deficiência congénita de leptina ou síndrome de *Prader-Willi*, na maioria dos casos é o desequilíbrio energético que constitui a causa primária da obesidade. O défice de gasto de energia que advém do sedentarismo associado a uma ingestão alimentar exagerada de alimentos constitui a causa principal de obesidade, caracterizada por acumulação de massa gorda em excesso concomitantemente com inflamação sistémica crónica. (42)

O excesso de ingestão de energia é geralmente armazenado no TA, induzindo hipertrofia e diferenciação de fibroblastos em pré-adipócitos e adipócitos maduros, conduzindo a hiperplasia. Quando está prejudicada a capacidade de armazenamento do TA, pode ocorrer acumulação de gordura ectópica em diferentes órgãos, incluindo o fígado. (49)

O TA é reconhecido como um tecido endócrino altamente dinâmico com diversas funções fisiológicas. É considerado um órgão ativo que regula a massa gorda e a homeostase nutricional através da libertação de adipocinas, com efeitos pleiotrópicos, que modulam o metabolismo dos lípidos e glicose, inflamação, angiogénese e aterosclerose. (50, 51) Deste modo, o TA não é um local passivo de armazenamento de energia, tendo funções que vão para além de armazenar e libertar energia na forma de TG durante o consumo excessivo de alimentos e períodos de jejum, respetivamente. (52)

O TA visceral e subcutâneo são os depósitos de gordura mais abundantes com perfis distintos de adipocinas. (53) São produzidas pelos adipócitos: adiponectina, leptina, resistina, visfatina, TNF- α , IL-6, proteína de quimioatração de monócitos-1, proteína de ligação ao retinol-4, inibidor do ativador de plasminogénio, angiotensinogénio, amilóide A sérico, entre outros. A leptina e a adiponectina são produzidas exclusivamente pelos adipócitos, enquanto

as restantes substâncias podem ser encontradas também em macrófagos ativados e outras células. (50)

As adipocinas encontram-se em equilíbrio nos indivíduos saudáveis, de peso normal, mas esse equilíbrio é interrompido na obesidade. Durante o aumento do TA, as adipocinas secretadas mudam de perfil, tornam-se esteatogénicas, inflamatórias e fibrogénicas. (9) A vascularização insuficiente do TA quando aumentado, associado ao incremento da infiltração de macrófagos, pode induzir lesão dos adipócitos, que promove a produção de várias adipocinas e citocinas pró-inflamatórias, levando a manifestações hepáticas e extra-hepáticas. (49) Tal suposição está na base da conceção de que o desequilíbrio das adipocinas promove a suscetibilidade para doenças metabólicas e vasculares na obesidade. Deste modo, a maioria das adipocinas são reguladas positivamente na obesidade e promovem respostas inflamatórias (por exemplo, leptina, TNF- α , IL-6) e outras adipocinas podem ser moduladores anti-inflamatórios (por exemplo, adiponectina). (53)

A leptina, cuja atuação é maioritariamente central, permite diminuir a ingestão de alimentos e aumentar o dispêndio de energia, porém apresenta níveis elevados em doentes com FGNA, sugerindo que há resistência à sua ação. (29) Nos estádios iniciais do FGNA, a leptina parece ser benéfica, mas com a progressão da doença pode promover inflamação hepática e fibrose, apresentando desta forma um efeito desfavorável. (9) Os níveis aumentados de leptina induzem suscetibilidade para hepatotoxicidade pela produção de citocinas e ativação de células T. Portanto, os níveis mais elevados de leptina circulante estão associados ao aumento da gravidade do FGNA. (51)

Por outro lado, a adiponectina, que aumenta a sensibilidade à insulina hepática e permite a redução da gordura corporal, exhibe baixos níveis quando existe FGNA, sendo que constitui um preditor do risco de EHNA em doentes obesos. (29) Esta redução na adiponectina resulta na diminuição da beta-oxidação dos ácidos gordos e gluconeogénese hepática. (8) A adiponectina inibe as citocinas pró-inflamatórias (incluindo TNF- α) e estimula as citocinas anti-inflamatórias (por exemplo, IL-10), permitindo a inibição funcional dos macrófagos, redução do stresse oxidativo e fibrogénese, contudo verifica-se a diminuição paradoxal de adiponectina com o aumento de gordura visceral. (9)

A obesidade está associada a hiperinsulinemia e a RI, achados frequentes na patogénese do FGNA. A RI induz aumento da lipólise do TA e tal traduz-se no aumento dos ácidos gordos livres que são transportados até ao fígado, em quantidade superior ao habitual excedendo assim a capacidade da beta-oxidação mitocondrial. (8) A RI é prejudicial pela lipólise em todo TA, sendo que o TA visceral tem um papel particularmente significativo para o fornecimento de ácidos gordos hepáticos, atendendo à sua via de drenagem através da

circulação esplâncnica. A elevação dos ácidos gordos hepáticos resulta no aumento da síntese de TG e contribui para o agravamento da RI através de intermediários lipídicos. (54)

A hiperinsulinemia reduz a secreção de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), e deste modo diminui a exportação de ácidos gordos livres do fígado. (8) A hiperinsulinemia leva ainda à ativação da proteína 1c de ligação ao elemento regulador dos esteróides (SREBP-1c), fator de transcrição com papel chave na regulação da síntese de TG, cuja expressão aumentada está associada à lipogénese hepática *de novo*. A ativação de SREBP-1c, juntamente com a maior disponibilidade de ácidos gordos, promove esteatose (Figura 3). (54) A lipogénese hepática *de novo* é ainda controlada pela proteína de ligação ao elemento de resposta aos hidratos de carbono (ChREBP), recetor X do fígado e recetor γ ativado pelo proliferador de peroxissoma. (55)

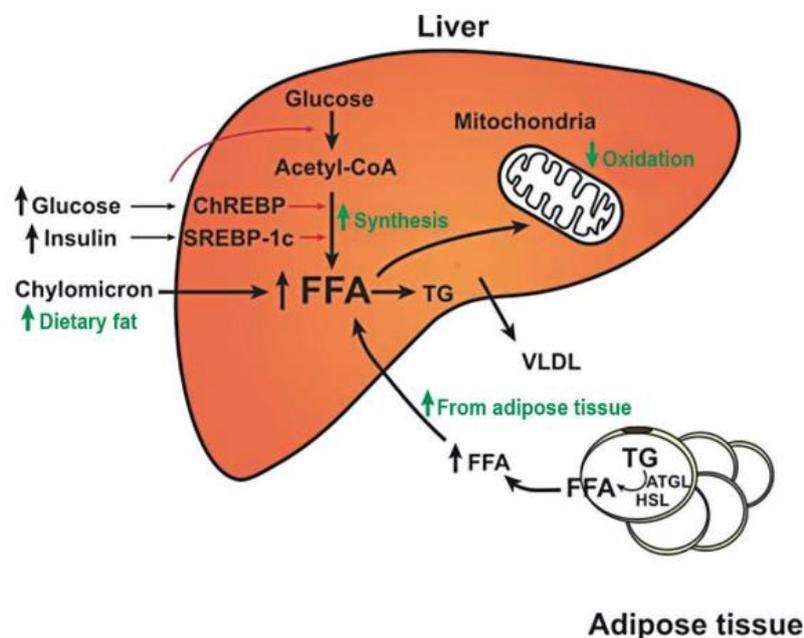


Figura 3. Alterações metabólicas na esteatose hepática (EH) na presença de resistência à insulina (RI) e hiperinsulinemia

Os ácidos gordos hepáticos provêm da dieta, lipogénese hepática *de novo* e tecido adiposo periférico. Na RI, as lipases nos adipócitos não são inibidas pela insulina, sendo os ácidos gordos livres libertados continuamente e absorvidos pelos hepatócitos. A nível hepático, a hiperinsulinemia induz a atividade da proteína 1c de ligação ao elemento regulador dos esteróides (SREBP-1c), que aumenta a lipogénese hepática *de novo*. A oxidação de ácidos gordos nas mitocôndrias diminui pela carnitina palmitoil transferase-1 pela malonil-coenzima A (CoA). Como resultado, os ácidos gordos livres no fígado são preferencialmente esterificados a triglicerídeos (TG). ChREBP: proteína de ligação ao elemento de resposta aos hidratos de carbono; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade; ATGL: lipase de triglicerídeos de tecido adiposo; HSL: lipase sensível a hormonas.

Adaptado de Moon, 2017

Como já referimos, a maioria dos doentes com FGNA possui obesidade, constituindo esta o principal fator de risco para FGNA. O IMC e o perímetro da cintura correlacionam-se positivamente com a presença de FGNA e a progressão da doença. (30, 56) A inflamação do TA tem impacto demonstrável no FGNA pela regulação da gordura hepática e fibrose. (53) A obesidade parece desempenhar um papel importante quer no processo inicial de EH quer na progressão da doença para EHNA. (9) Existem níveis mais elevados de aminotransferases, maior grau de EH, risco superior de fibrose hepática e complicações metabólicas no FGNA em doentes obesos do que não obesos, pelo que a obesidade se associa a pior prognóstico a longo prazo. (56) A EHNA acompanhada de obesidade tem uma probabilidade mais elevada de progredir para doença hepática em estágio terminal, associando desta forma a obesidade com maior taxa de mortalidade em doentes com FGNA. (9)

Deste modo, tem sido atribuída ao hepatócito uma função semelhante ao adipócito, quando a capacidade funcional do TA está diminuída, por exemplo, na obesidade. Os hepatócitos armazenam os lípidos em excesso, principalmente na forma de TG, levando à esteatose simples. Quando a obesidade não é controlada com sucesso no estágio de esteatose simples, inicia-se um processo inflamatório intra-hepático que se assemelha à inflamação de baixo grau que ocorre no TA de indivíduos obesos. (9)

8. Microbiota intestinal

O trato gastrointestinal (TGI) dos mamíferos é o principal local de colonização das bactérias comensais. (57) Possui um epitélio, com superfície de absorção equivalente a 300-400 m², colonizado por diversos microrganismos que vivem em sinergia com o hospedeiro. (58, 59)

Podemos encontrar cerca de 1.014 espécies de bactérias de vários filos diferentes desde o estômago até ao reto. (8) A MI humana difere quantitativa e qualitativamente entre os indivíduos, e inclui principalmente bactérias, arqueas, vírus e fungos. No adulto predominam seis filos principais de bactérias: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* e *Verrucomicrobia*. (60, 61) Porém, destacam-se nas bactérias intestinais predominantemente Gram-positivos do filo *Firmicutes* (60-80%) e Gram-negativos do filo *Bacteroidetes* (20- 40%). (11) A composição da MI é regulada por diversos fatores como, por exemplo, tipo de parto, amamentação, antibióticos, pré/probióticos, dieta e hábitos higiénicos, genética. (61, 62)

O intestino delgado possui uma menor densidade de microrganismos relativamente ao cego e colón, com <10⁷ unidades formadoras de colónias/grama de conteúdo *versus* 10¹² unidades formadoras de colónias/grama de conteúdo, respetivamente. (7) O tipo de bactérias é ainda diferente: o intestino delgado proximal possui principalmente bactérias aeróbias e Gram positivas; ao invés, o colón é colonizado caracteristicamente por bactérias anaeróbias e Gram negativas. (11, 63) A distribuição heterogénea da MI justifica-se pelo facto do colón possuir condições favoráveis à proliferação de microrganismos, atendendo ao peristaltismo lento e ausência de secreções intestinais. (58) Pensa-se que esta diferença surja também devido aos efeitos antibacterianos do ácido gástrico. (63)

O TGI é estéril até ao nascimento, sendo a colonização pela MI essencial para o desenvolvimento normal da homeostase intestinal e maturação do sistema imunológico. No parto vaginal, ocorre contacto com os microrganismos presentes na flora vaginal materna; também a ingestão do colostro e leite maternos, e o ambiente, contribuem para a colonização pela microbiota intestinal que se mantém relativamente estável ao longo do primeiro ano de vida. (64, 65)

As principais funções da MI estão associadas com atividades metabólica e imunológica. A colonização pela MI modula as células intraepiteliais e os tecidos linfóides associados à mucosa intestinal para manter o equilíbrio intestinal, realizar defesa contra patógenos, e induzir tolerância imunológica. (47) As células intraepiteliais do intestino participam em processos imunológicos, sendo que as vias de sinalização celular são altamente reguladas para evitar respostas inflamatórias descontroladas. (58) A função

metabólica corresponde à fermentação de componentes não digeríveis da dieta, síntese de vitamina K e do grupo B, e síntese de ácidos gordos de cadeia curta (AGCC), sendo uma fonte de energia relevante para o hospedeiro. (59) As bactérias intestinais contribuem para a absorção de polifenóis presentes na dieta, e participam no metabolismo de xenobióticos e drogas. (66) Podem ainda inibir o crescimento de microrganismos exógenos através da síntese de substâncias antimicrobianas ou da competição por nutrientes. (58, 60, 67) Por fim, as bactérias têm efeitos na desativação de compostos N-nitrosos pró-carcinogénicos. (8) O equilíbrio e a homeostase da MI é assim fundamental para a manutenção da saúde e proteção contra doenças no hospedeiro. (68)

A MI interage com o hospedeiro através de múltiplas maneiras, na presença de ligações entre o intestino e outros órgãos, como cérebro, rim e fígado. (69) O conceito “eixo intestino-fígado” decorre da forte interação anatómica e funcional entre o TGI e o fígado, associação revelada pela embriogénese comum na endoderme ventral anterior. (70) O fígado possui suprimento sanguíneo a partir da artéria hepática e VP. O sangue que provém do trato intestinal drena para as veias mesentéricas que, por sua vez, transportam o sangue até à VP, sendo esta responsável por cerca de 70% do suprimento sanguíneo do fígado. Deste modo, os nutrientes e fatores derivados do lúmen intestinal chegam ao fígado através da circulação portal. Os ácidos biliares (AB) produzidos pelos hepatócitos são libertados no intestino delgado através do trato biliar. (69)

Assim, a comunicação entre o intestino e o fígado é bidirecional, acometendo o trato biliar, VP e circulação sistémica. Os produtos oriundos do fígado, como AB, influenciam a composição e função da MI, e os produtos derivados do intestino, provenientes da dieta e das bactérias intestinais, regulam a síntese de AB e ainda o metabolismo de glicose e lípidos no fígado. (6)

9. Barreira intestinal

O corpo humano possui múltiplos epitélios nas superfícies mucosas que formam barreiras diretas entre o ambiente externo e o meio interno do hospedeiro, sendo que o TGI abarca uma das maiores áreas de interação entre o lúmen e o tecido epitelial com papel fundamental na regulação do sistema imunológico. (71) A barreira intestinal (BI) é um sistema complexo onde estão envolvidos a MI, camada de células epiteliais e vasos sanguíneos (Figura 4). (72)

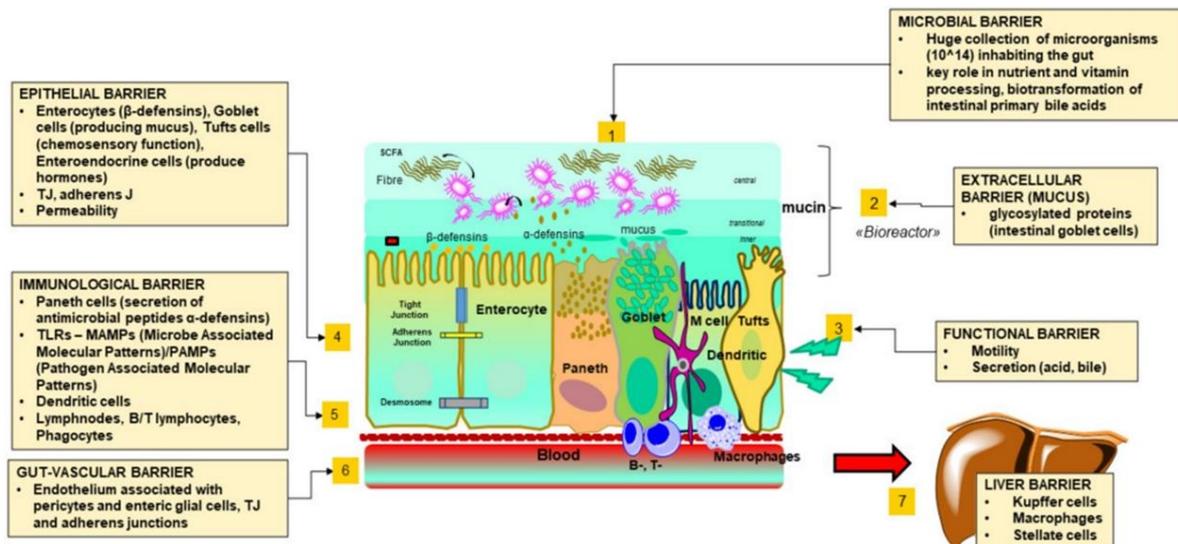


Figura 4. Componentes da barreira intestinal (BI) em condições fisiológicas

1. A presença da microbiota intestinal (MI) constitui a barreira microbiana; 2. O muco intestinal acumula-se na interface entre o lúmen intestinal e a bordadura em escova dos enterócitos; 3. A barreira funcional está relacionada com a motilidade gastrointestinal e secreções do trato gastrointestinal (TGI); 4. Na barreira epitelial salientam-se as *tight junctions*; 5. As células imunes fazem parte da barreira imunológica; 6. A interface entre o intestino e a corrente sanguínea deve impedir a translocação bacteriana; 7. O fígado funciona como filtro para os microrganismos que entram na corrente sanguínea.

Adaptado de Portincasa *et al.*, 2021

A BI deve ser semipermeável de forma a absorver nutrientes e deter substâncias nocivas (toxinas, micróbios e metabolitos bacterianos), promovendo o ambiente habitual do trato intestinal. (52)

O primeiro nível da BI diz respeito à MI, sendo que o hospedeiro desenvolve imunidade natural e tolerância à MI. (72) A barreira de muco separa fisicamente a MI do revestimento epitelial, proporcionando proteção contra uma resposta inflamatória exagerada. (73) A camada de muco é a primeira linha de defesa física que as moléculas externas encontram quando chegam ao lúmen intestinal e impede que as bactérias entrem em contato direto com as células epiteliais. (71)

A separar o lúmen intestinal e o meio interno podemos encontrar uma barreira física constituída por uma camada de células epiteliais colunares, entre as quais existem complexos juncionais intercelulares, incluindo *tight junctions*, junções aderentes, desmossomas e junções comunicantes. Atendendo a estas estruturas, a PI será dinâmica, evitando que substâncias potencialmente nocivas ou patogénicas invadam o organismo enquanto é permitida a entrada de nutrientes, iões e água, fundamentais para o funcionamento fisiológico. (74, 75)

Abaixo do epitélio encontramos a lâmina própria, um tecido conjuntivo laxo que contém as placas de Peyer e as células do sistema imunológico, incluindo células T (CD4 + e CD8 +), células B, e várias células envolvidas na imunidade inata, como por exemplo macrófagos, células dendríticas e eosinófilos. A secreção de peptídeos antimicrobianos (PAMs) pelas células de Paneth, e de imunoglobulina A (IgA), pelas placas de Peyer, também funcionam como forma de proteção, uma vez que previnem a translocação de bactérias comensais através da barreira epitelial. (75) Estes reguladores imunológicos são libertados no muco para reforçar a separação física entre MI e epitélio intestinal, sendo que existem em maiores concentrações no intestino delgado atendendo ao facto da camada de muco ser menos densa relativamente ao colón. (71)

10. Disbiose, fígado gordo não alcoólico e obesidade

A disbiose é definida como um desequilíbrio entre microrganismos saudáveis e promotores de doença e traduz-se em mudanças da diversidade e variação na abundância relativa de certos microrganismos. (68) Ainda não está claro se a disbiose é uma causa direta do FGNA ou se simplesmente reflete as alterações associadas à doença. Os metabolitos (benéficos ou prejudiciais) produzidos a nível intestinal são transportados até ao fígado para produção de energia, desintoxicação e síntese metabólica. Quando o fígado se encontra sobrecarregado com moléculas nocivas, tóxicas ou pró-inflamatórias, derivadas da disbiose e/ou aumento da PI, os metabolitos vão afetar negativamente a fisiologia hepática. Assim, o fígado disfuncional pode não ser capaz de controlar a MI através dos AB e outros fatores de regulação da MI, resultando em disbiose e disfunção da barreira intestinal. (6, 76)

A disbiose no FGNA está associada com a patogénese da obesidade. (6, 61) Vários estudos em humanos mostraram que a obesidade está associada a baixa abundância de *Bacteroidetes* intestinais e alta abundância de *Firmicutes*. (52) Estes últimos possuem mais genes associados ao metabolismo dos lípidos e hidratos de carbono, bem como relacionados com a quebra de polissacarídeos não digeríveis. (5) Por este motivo, são mais eficientes na recolha de energia a partir da alimentação e mais hábeis na fermentação de substratos metabólicos, pelo que a capacidade metabólica aumentada constitui uma desvantagem em situações com maior aporte calórico, como é a obesidade. (11)

O aumento da captação e armazenamento de energia é dos mecanismos que contribuem para a obesidade e patogénese do FGNA. A dieta rica em gordura e altamente energética altera a MI. (8) Por outro lado, a MI alterada também afeta o metabolismo do hospedeiro, causa inflamação e aumento da deposição lipídica no corpo. Diversos estudos mostram que a microbiota intestinal pode modular a homeostase energética e a adiposidade do hospedeiro, sendo que existem proteínas e fatores do hospedeiro envolvidas, cuja expressão alterada pela MI desempenham papel-chave no desenvolvimento da obesidade e, conseqüentemente, no FGNA (Tabela 2).

A MI é um regulador crucial da recolha de energia dos alimentos ingeridos o que pode resultar no aumento da deposição de gordura recorrendo, por exemplo, ao desenvolvimento do epitélio intestinal através do aumento da densidade de vilosidades do intestino delgado, e interferência na fisiologia e motilidade intestinais pela produção de AGCC que interagem com recetores G acoplados à proteína G. (10) Outros mecanismos através dos quais a MI promove a obesidade são: aumento no fluxo sanguíneo da mucosa (associado ao incremento a absorção de nutrientes), inibição da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) no fígado e músculo (com inibição da oxidação de ácidos gordos periféricos). (61)

Tabela 2. Proteínas e fatores do hospedeiro alteradas na obesidade pela MI	
Proteína/ Fator do hospedeiro	Função
FIAF	Proteína que inibe a atividade da LPL
ChREBP	Fator de transcrição que reconhece monossacarídeos e desempenha um papel fundamental no metabolismo hepático de hidratos de carbono
SREBP-1c	Fator de transcrição que controla a síntese de lipídios no fígado
Recetores acoplados à proteína G (GPR43 e GPR41)	Proteínas expressas em células enteroendócrinas que reconhecem AGCC luminais e mediam a libertação de GLP-1 Nos adipócitos promovem a adipogénese e inibição da lipólise Estimulam a produção de leptina em resposta a AGCC
TLR	Moléculas transmembranares para reconhecimento dos produtos de degradação bacteriana
GLP-1	Proteína produzida pelas células enteroendócrinas que estimula a secreção de insulina, inibe a motilidade gastrointestinal, regula o apetite e a ingestão alimentar
PYY	Hormona peptídica produzida pelas células enteroendócrinas que inibe a motilidade intestinal
FXR	Recetor expresso no fígado e intestino que regula os AB

MI: Microbiota intestinal; FIAF: Fator adipocitário induzido pelo jejum; ChREBP: Proteína de ligação ao elemento de resposta aos hidratos de carbono; SREBP-1c: Proteína 1c de ligação ao elemento regulador dos esteróides; TLR: Recetores tipo Toll; GLP-1: Peptídeo-1 semelhante ao glucagon; PYY: Peptídeo Y; FXR: Recetor farnesóide X; LPL: Lipoproteína lípase; AGCC: Ácidos gordos de cadeia curta; AB: ácidos biliares

Adaptado de Arlan, 2014

11. Mecanismos fisiopatológicos na origem do fígado gordo não alcoólico

A microbiota disbiótica pode ter influência nos sistemas imunológico e metabólico do hospedeiro, bem como na integridade da mucosa. (6, 61) A obesidade e a MI estão envolvidos no FGNA por vários mecanismos, incluindo alteração da PI, recuperação de energia obtida pela dieta, alteração da expressão de genes na lipogénese hepática *de novo* e vias de sinalização metabólica da colina e ácidos biliares (AB), produção de etanol no intestino e interação com a imunidade inata (Figura 5). (10)

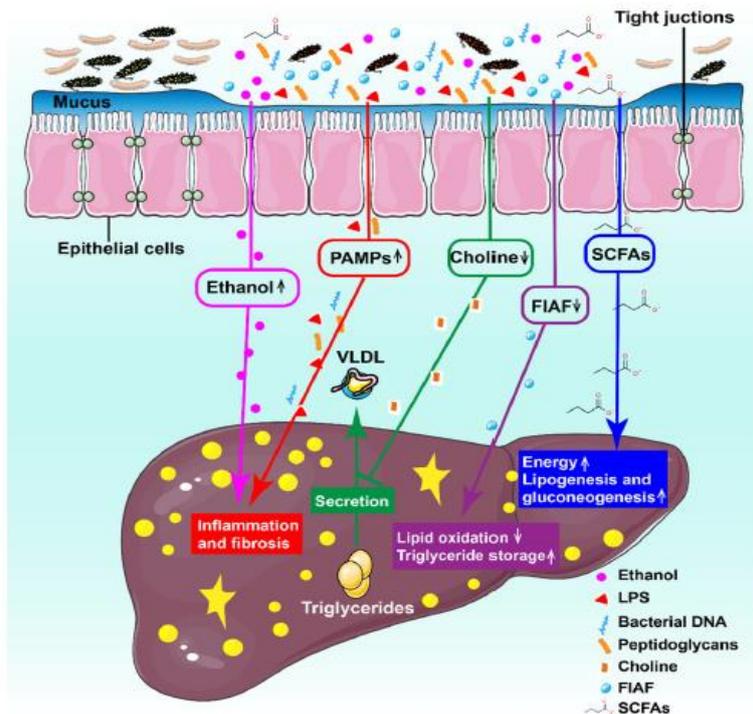


Figura 5. Disbiose da microbiota intestinal (MI) na patogénese do fígado gordo não alcoólico (FGNA) A disbiose leva ao aumento da produção de etanol intestinal, tóxico para o fígado e altera a permeabilidade intestinal (PI) ao destruir as *tight junctions*. Os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) derivados do intestino, como por exemplo o lipopolissacádeo (LPS), podem ligar-se a receptor do tipo Toll (TLRs) específicos no fígado e ativar as vias pró-inflamatórias que culminam na inflamação e fibrose hepáticas. A MI hidrolisa a colina para formar trimetilamina (TMA). O aumento do metabolismo da colina pode causar deficiência de colina, o que impede a excreção da lipoproteína de muito baixa densidade muito baixa (VLDL) e inicia-se a acumulação de triglicerídeos (TG) no fígado. A MI alterada pode inibir a secreção do fator adipocitário induzido pelo jejum (FIAF) que constitui um inibidor específico da lipoproteína lipase (LPL) endotelial, que liberta TG das partículas de VLDL no fígado. Como resultado ocorre inibição da beta-oxidação lipídica e o aumento do armazenamento de TG hepáticos; excesso de ácidos gordos de cadeia curta (AGCC), substratos para gliconeogénese e síntese de gordura no fígado.

Adaptado de Hu *et al.*, 2020

11.1. Disfunção da barreira intestinal

A MI pode contribuir para o aumento da PI e os doentes com FGNA, particularmente na EHNA, são mais propensos a possuírem aumento da PI por comparação com indivíduos saudáveis. (77) É associada a disfunção das *tight junctions* pela ação da MI. (8)

A falência da PI possibilita a translocação de endotoxinas bacterianas para a corrente sanguínea. Este processo pode desencadear inflamação sistémica pela ativação de citocinas inflamatórias. (8) Deste modo ocorre libertação de metabolitos na corrente sanguínea e no fígado através do sistema portal, estimulando as células de Kupffer e a libertação de moléculas inflamatórias, como TNF- α e IL-6. (78) Provavelmente, o principal produto bacteriano envolvido na patogénese do FGNA é o lipopolissacarídeo (LPS), componente ativo da endotoxina que corresponde ao elemento da parede celular das bactérias Gram negativas. O LPS está associado à RI, EH, inflamação e fibrogénese. (79)

A dieta rica em gordura pode levar à translocação de produtos bacterianos e de bactérias vivas completas do lúmen intestinal para os tecidos, como por exemplo o TA. A acumulação de bactérias translocadas nos tecidos metabolicamente ativos pode contribuir para a exacerbação da inflamação hepática e da fibrose. (11) A obesidade aumenta a PI ao danificar indiretamente a BI, uma vez que a dieta rica em gordura reduz as bifidobactérias, sendo estas importantes na função de barreira da mucosa e na diminuição dos níveis intestinais de LPS. (3)

O estudo em doentes obesos revelou que, na presença de EH, a PI está aumentada relativamente aos doentes obesos sem a condição patológica. Adicionalmente, constata-se que a PI retorna à normalidade após a redução de peso. (80) A PI em mulheres obesas está positivamente correlacionada com medidas antropométricas como, por exemplo, circunferência abdominal, e variáveis metabólicas como, por exemplo, glicemia em jejum e insulinémia. (81) A quantidade de DNA ribossomal (rDNA) bacteriano, obtido através de biópsias hepáticas, mostrou-se mais elevada em indivíduos obesos relativamente a indivíduos magros. Deste modo, o aumento da carga de rDNA bacteriano no fígado de indivíduos obesos pode constituir um fator de risco precoce para a progressão da FGNA. (14)

11.2. Sobrecrescimento bacteriano no intestino delgado

O sobrecrescimento bacteriano no intestino delgado (SCBID) corresponde à presença de bactérias típicas do colón em elevada quantidade no intestino delgado. A presença de SCBID pode afetar as *tight junctions*, facilitando o fluxo de produtos bacterianos e a sua absorção pelo fígado, onde podem ter papel tóxico. (49)

Existem diversos mecanismos fisiológicos que impedem a colonização bacteriana aberrante do intestino delgado, como o pH ácido do estômago, enzimas pancreáticas, sistema imunológico intestinal, peristaltismo do intestino delgado, válvula ileocecal e BI íntegra, sendo que o SCBID pode desenvolver-se se ocorrer perturbação nestes mecanismos. (3)

As manifestações clínicas do SCBID incluem distensão e/ou desconforto abdominal, diarreia aquosa, dispepsia, perda de peso, EH e anemia macrocítica, devido à acumulação de bactérias, como *E. coli* e *Bacteroides*, no intestino delgado. (82) Ainda não existe uma técnica *gold standard* para o diagnóstico de SCBID, sendo o teste respiratório o método de diagnóstico atualmente usado. (59)

O SCBID pode afetar a absorção e o metabolismo de hidratos de carbono, proteínas, gorduras e vitaminas. A ocorrência de lesões nas vilosidades intestinais, deficiência na produção de enzimas digestivas e disfunção da barreira intestinal levam à má absorção e aumento da perda de nutrientes. (66) É, ainda, desconhecido o mecanismo exato para a associação entre o FGNA e o SCBID, sendo provavelmente multifatorial com produção de subprodutos bacterianos de que é exemplo o LPS, e alteração no metabolismo da colina, o que acarreta aumento dos níveis de N-óxido-trimetilamina (TMAO). (83)

O TMAO é um metabólito derivado da microbiota. A trimetilamina (TMA) é um subproduto da fermentação microbiana a partir dos componentes da dieta, como colina, fosfatidilcolina e l-carnitina. A TMA é oxidada a TMAO pela enzima flavina mono-oxigenase 3 (FMO3) presente no fígado. Os estudos clínicos revelaram uma associação entre níveis elevados de TMAO circulante e FGNA, nomeadamente com EHNA. Pensa-se que o TMAO possa estar subjacente a diferentes mecanismos que afetam o curso da doença, de que é exemplo a inibição da conversão de colesterol em AB, promovendo a esteatose e agravando o FGNA. (84)

O SCBID está também relacionado com produção endógena de etanol, o que contribui para a ocorrência de alterações funcionais e morfológicas no intestino delgado, aumentando sua permeabilidade às endotoxinas derivadas do lúmen intestinal. (85)

Grande parte dos estudos com aplicação do teste respiratório revelaram uma prevalência maior de SCBID em pacientes com FGNA relativamente a indivíduos saudáveis. (86) A investigação da MI revela que o SCBID tem maior prevalência na EHNA quando comparado com indivíduos sem a patologia. (87) O SCBID tem sido associado a EH grave em doentes com obesidade mórbida. (82)

11.3. Inflamação

No FGNA verifica-se o aumento dos parâmetros inflamatórios circulantes, onde estão incluídas citocinas, proteínas de fase aguda e moléculas de adesão, principalmente em pacientes com EHNA. (88) Vários estudos demonstraram que a MI alterada é responsável pela inflamação de baixo grau, tendo um papel fundamental para o desenvolvimento da obesidade e suas complicações, incluindo FGNA. (85)

Os microrganismos intestinais possuem moléculas microbianas altamente conservadas, chamadas de “padrões moleculares associados a patógenos” (PAMPs) e produtos endógenos chamados “padrões moleculares associados a danos” (DAMPs), que são reconhecidos por recetores de reconhecimento de padrões. Nestes incluem-se recetores membranares do tipo Toll (TLRs) e recetores intracelulares semelhantes a NOD (NLRs). (52)

A MI é considerada como fonte de ligantes para os TLRs nos indivíduos obesos. Também os ácidos gordos e os ácidos nucleicos são potenciais ligantes dos TLRs. (89) A translocação de componentes bacterianos para a circulação sanguínea pode desencadear uma resposta inflamatória ao ativar o TLR4, sendo este responsável por ativar citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6. (8)

As alterações na MI podem induzir inflamação crónica na obesidade com ativação de TLRs por endotoxinas bacterianas (por exemplo, o LPS), com ativação do sistema imune inato. (90)

Os TLRs, especialmente o TLR4, são necessários para o reconhecimento de LPS, sendo expressos em macrófagos do TA, bem como em adipócitos. A estimulação de macrófagos do TA, através do LPS, induz fibrose pela indução do fator de transformação do crescimento beta 1 (TGF- β 1). (74) Os dados mostram que ocorre circulação de níveis elevados de LPS quer em roedores quer em humanos obesos. À primeira vista pode parecer um paradoxo, uma vez que na obesidade ocorre maior percentagem de *Firmicutes* (bactérias Gram positivas que não produzem LPS), tendo sido demonstrado que o aumento do LPS está diretamente relacionado com o aumento da PI. (91)

O LPS é produzido de forma contínua no intestino, sendo a sua translocação pelos capilares intestinais dependente do TLR4. Posteriormente, o transporte do LPS para os tecidos-alvo é facilitado por lipoproteínas (quilomicrons), sintetizadas pelos enterócitos. Deste modo, a absorção de LPS ocorre simultaneamente com os lípidos. No hepatócito vai desencadear uma cascata intracelular de que resulta a expressão de vários genes envolvidos na via inflamatória. (79) A ligação do LPS ao TLR4 recruta o fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88) (proteína adaptadora) que, por sua vez, leva à ativação das vias de sinalização

do fator nuclear kappa B (NF- κ B) e da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). Uma vez que o NF- κ B é um fator de transcrição, vai regular positivamente a transcrição de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1, 2, 6 e 8. (92) Pensa-se que a ativação da MAPK a nível hepático prejudique a ação da insulina e o metabolismo lipídico. Em pacientes com EHNA, foi documentada a ativação da isoforma p38 MAPK, reguladora da resposta inflamatória. (93)

A ligação do LPS ao TLR4 nas células estreladas leva ao aumento da produção de moléculas de adesão e quimiocinas como, por exemplo, a proteína de adesão de células vasculares (VCAM) e proteína de quimiotaxia de aceitação de metil (MCP), sendo estas moléculas responsáveis pela atração das células de Kupffer, que secretam de pró-fibrinogénios. (92)

A MI origina outras moléculas pró-inflamatórias, como peptidoglicanos e flagelinas, igualmente capazes de ativar vias inflamatórias. (90) A flagelina bacteriana participa no desenvolvimento de FGNA por ligação com TLR5. (17) O TLR5 pode ser associado a alterações metabólicas do hospedeiro, factos revelados quando murganhos, que possuem deficiência em TLR5, exibem hiperfagia e desenvolvem características essenciais da síndrome metabólica, incluindo hiperlipidemia, HTA, RI e aumento da adiposidade. (94) O TLR9 reconhece o DNA contendo citosina fosfato guanina (CpG) não metilada, derivado principalmente de bactérias. Foi encontrada a elevação de DNA bacteriano no sangue e a expressão hepática de TLR9 em humanos e roedores com lesões hepáticas ou EHNA. (17) O TLR-2 identifica componentes da parede celular de bactérias Gram-positivas, como peptidoglicano e ácido lipoteicóico. Pensa-se que possivelmente, a deficiência de TLR-2 exacerbe a EHNA, uma vez que murganhos com carência deste recetor demonstraram inflamação e necrose significativamente mais altas. (94)

Outros PAMPs e DAMPs, como o inflamassoma, parecem estar associados à integridade epitelial intestinal. O inflamassoma é um complexo de proteínas que reconhece uma ampla gama de sinais de stresse e infeções bacterianas. (91) São expressos principalmente em hepatócitos e células mielóides (ou seja, células de Kupffer) que detetam sinais pró-inflamatórios através de NLRs e ativam a caspase-1, sendo esta responsável pela clivagem de pró-interleucinas (IL-1 β , IL-18 e IL-23), o que resulta em inflamação e morte celular de hepatocitária. Em modelos de roedores de FGNA/EHNA, os mRNAs que codificam o complexo inflamassoma NLR com domínio pirina 3 (NLRP3) estão elevados e estão associados a maiores graus de lesão. (95)

Como já foi referido, pensa-se que os indivíduos obesos possuam aumento da PI e disfunção das *tight junctions*, o que potencia o aumento da carga de endotoxina na VP, com consequente sobrecarga das células de Kupffer, resultando em lesão hepática pela libertação

de citocinas. Contudo, a ativação constante de TLRs nas células de Kupffer leva à diminuição da tolerância destes TLRs, o que induz doença hepática crônica. (90)

A obesidade e a RI induzida estão associadas a inflamação de baixo grau no intestino, acompanhada pelo aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-12, que induzem o desenvolvimento das células efectoras CD4+ Th1 e Th17. Adicionalmente, há diminuição das células T reguladoras e aumento de células T produtoras de IL-17, células Th1 produtoras de interferon- γ e células T CD8+. (75)

A inflamação de baixo grau secundária à endotoxemia pode estar ligada à obesidade através do sistema endocanabinóide, responsável pelo controlo da PI e fisiologia do TA. (11) A obesidade está associada à hiperatividade do sistema endocanabinóide, desregulação que leva ao desequilíbrio de ingestão de energia, contribuição para o excesso de acumulação de gordura e desenvolvimento de alterações metabólicas associadas à obesidade. (94) A MI modula o tônus do sistema endocanabinóide, que por sua vez regula a PI e os níveis plasmáticos de LPS. O aumento do tônus e o LPS contribuem para a desregulação da adipogénese e o nível de endotoxinas está diretamente relacionado com o estado de inflamação sistémico. (81)

11.4. Hormonas intestinais

A MI regula as células enteroendócrinas e promove a liberação de várias hormonas intestinais. (52) A ingestão alimentar é regulada por hormonas intestinais que controlam o apetite, principalmente a peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1) e a hormona intestinal do peptídeo (PYY). Estas hormonas, secretadas em resposta aos nutrientes luminiais, regulam a ingestão de energia, a deposição do excesso de energia na forma lipídica, e a saciedade. (63) Depois de serem transportados para a circulação sistémica, as hormonas intestinais agem nos seus órgãos-alvo, como fígado, TA e trato intestinal, regulando os índices metabólicos relacionados com o FGNA, incluindo o metabolismo da glicose, a RI e a inflamação metabólica. (60)

O GLP-1 é uma incretina produzida a partir das células enteroendócrinas no intestino delgado distal e cólon. A secreção de GLP-1 é principalmente induzida por hidratos de carbono, lipídios e proteínas, sendo também induzido por produtos bacterianos intestinais como por exemplo os AGCC, e afetada por fatores hormonais, como por exemplo a leptina. (96) A disbiose intestinal está associada à diminuição da expressão intestinal do GLP-1. Adicionalmente, verifica-se aumento do PYY, o que acarreta um atraso no trânsito intestinal, permitindo uma maior absorção de nutrientes e aumento da leptina. (79)

11.5. Ácidos gordos de cadeia curta

A MI desempenha um papel crítico no desenvolvimento de obesidade e restantes comorbilidades metabólicas associadas, devido à produção de metabolitos como AGCC. (57) As bactérias são capazes de absorver monossacarídeos e extrair energia de polissacarídeos indigeríveis por meio da fermentação, tornando-os nas formas absorvíveis com o auxílio de hidrolases de glicosídeo e liases de polissacarídeos, enzimas que estão ausentes em humanos. (11)

Os AGCC são absorvidos na circulação portal, atingem o fígado, onde são oxidados para obtenção de energia celular e/ou servem de substrato para vias metabólicas, incluindo produção de corpos cetónicos, lipogénese e gliconeogénese. Contudo, a eficiência metabólica pode tornar-se prejudicial para a saúde quando o ambiente é abundante de alimentos. (97)

A fermentação diferencial de polissacarídeos indigeríveis pela microbiota cólica resulta em AGCC, de que são exemplos o butirato (15%), propionato (25%), acetato (60%). (61) Os AGCC têm ação na redução do pH intestinal, na regulação do metabolismo energético, imunidade, incremento no TA e modulação do desenvolvimento de células cancerígenas. (62) Os AGCC são absorvidos e transferidos para o fígado através da VP, ativam a ChREBP, que aumenta a transcrição de várias proteínas envolvidas na lipogénese hepática. (52) A maior parte dos AGCC absorvidos a partir do cólon é metabolizada pelo fígado e apenas uma pequena porção (cerca de 20%) entra na circulação periférica. (74)

Geralmente, os AGCC derivados do cólon representam cerca de 10% da energia obtida pela dieta, de onde sobressai o acetato como principal fonte de energia. O butirato e o propionato são considerados anti-obesogénicos e o acetato é obesogénico. O acetato e o propionato são produzidos principalmente pelo filo *Bacteroidetes*, enquanto o butirato é produzido principalmente por *Firmicutes*. (53) O butirato é uma importante fonte de energia para as células epiteliais do colón, o propionato é usado pelo fígado e órgãos periféricos como substrato para a gliconeogénese e o acetato é potencialmente usado como colesterol ou precursor de ácidos gordos. (53, 61)

O butirato é reconhecido pelo seu papel no aumento da saciedade, diminuindo a ingestão de alimentos e retardando o esvaziamento gástrico devido à ativação do recetor de ácido gordo livre 3, que regula de forma positiva a produção do PYY e do GLP1. Estes estão envolvidos na regulação do apetite e são secretados em resposta à ingestão de alimentos. (8) O butirato também parece afetar positivamente a sensibilidade à insulina por meio da estimulação da libertação do GLP-1 e do polipeptídeo inibidor gástrico. O butirato e o propionato podem ainda aumentar a expressão da leptina. Por outro lado, o acetato é o mais

absorvido e constitui o substrato para a lipogénese e síntese de colesterol no fígado e TA. (53)

Adicionalmente, os AGCC são também substratos de recetores acoplados à proteína G, designadamente GPR43 e 41 (também chamado de recetor de ácido gordo livre 2 e 3, respetivamente), que são expressos em vários tipos de células (células imunes, células endócrinas e adipócitos) do hospedeiro. (7) A ativação do GPR43 pelos AGCC contribui para a inibição da lipólise e para a diferenciação dos adipócitos, o que se traduz no aumento do TA. (62)

Em modelos experimentais de doentes obesos foram encontrados níveis fecais elevados de AGCC. (27) A obesidade está associada ainda a uma proporção relativa menor de *Bacteroidetes/Firmicutes*. O incremento de *Firmicutes* é associado ao aumento de enzimas capazes de quebrar polissacarídeos não digeríveis da dieta e produzir AGCC. (62) Estes produtos microbianos servem de substrato para a lipogénese de novo, acelerando assim o desenvolvimento do FGNA. (92) Porém, têm ainda benefícios metabólicos, exemplificados pelo butirato, que auxilia na diminuição do desenvolvimento de obesidade induzida pela dieta rica em gordura e na RI. (88) OS AGCC também estão implicados na PI, especificamente o butirato que demonstrou melhorar a BI através da modulação e indução de mucinas e proteínas de *tight junction* (8) (claudina-2, ocludina, entre outras), o que reduz a translocação bacteriana. (44)

Em conclusão, os AGCC podem ligar-se a recetores expressos em todos os órgãos envolvidos na patogénese do FGNA como, por exemplo, TA, fígado e intestino, induzindo lipogénese hepática *de novo*, síntese de colesterol e alterações da homeostase da glicose. Os AGCC podem ainda modular a ingestão de alimentos, regulando a atividade neuronal, logo a regulação do apetite. (27)

11.6. Colina

A colina é um nutriente essencial com diversas funções. É solúvel em água, sendo um importante componente fosfolipídico da membrana celular. A colina tem um papel relevante no metabolismo lipídico no fígado e, adicionalmente, é molécula precursora do neurotransmissor acetilcolina. (52)

A deficiência de colina em humanos está associada ao FGNA, dano muscular e defeitos do tubo neural. (6, 69) Estes achados justificam-se pelo facto de que este nutriente é necessário para a síntese de fosfatidilcolina, que por sua vez é fundamental para a síntese de membranas celulares e VLDL, lipoproteína responsável pelo transporte de TG para fora do

fígado. A privação de colina resulta em esteatose e morte hepatocitária (98) A genotipagem de indivíduos para o polimorfismo de nucleótido único do promotor fosfatidiletanolamina N-metiltransferase (PEMT), uma enzima vital no metabolismo da colina, pode determinar a suscetibilidade ao FGNA. (6, 11)

É possível a produção de colina de novo, porém é limitada, pelo que a maior parte deve ser obtida pela dieta. (6, 69) As fontes exógenas de colina são carne, laticínios, peixes, soja, nozes e leguminosas. Como fontes endógenas de colina encontramos os lípidos biliares, as células epiteliais e as bactérias intestinais. (52) A análise genética mostrou que os genes do metabolismo da colina são encontrados amplamente distribuídos em três principais filos de bactérias (*Proteobacteria*, *Firmicutes* e *Actinobacteria*), componentes da MI humana. (98) A MI pode converter colina da dieta em metilaminas tóxicas, como é exemplo a TMA. Este último metabolito chega ao fígado através da VP e é oxidado para formar TMAO que é libertada na circulação. (69)

Assim, a conversão de colina pela MI parece estar envolvida na patogênese do FGNA por diminuição da biodisponibilidade hepática de colina, o que acarreta exportação ineficiente de VLDL, acumulação lipídica e inflamação hepática. (6) A TMAO também parece afetar a homeostase do colesterol, reduzindo a conversão de colesterol em ácidos biliares. (69)

O papel deste nutriente quando há indução de dietas pobres em colina em modelos animais, indicam o aparecimento de níveis reduzidos de VLDL e beta-oxidação de ácidos gordos, o que causa a deposição de ácidos gordos e colesterol, stresse oxidativo e alterações nas citocinas e adipocinas, juntamente com inflamação e fibrose hepáticas. (10, 69)

11.7. Ácidos biliares

Também influenciada pela composição da MI temos a composição de AB e pensa-se que estes desempenham igualmente um papel no desenvolvimento de FGNA. (99) Os AB são esteróis saturados que facilitam a absorção de lípidos no TGI. Os AB primários, ácidos cólico e quenodeoxicólico, são produzidos a partir do colesterol no fígado. São conjugados com taurina ou glicina. Posteriormente, os AB primários são convertidos em cerca de 20 AB secundários diferentes pela MI. (10) Mais de 95% dos AB secretados são reabsorvidos no íleo distal e apenas uma pequena proporção atinge normalmente o cólon. (63) Os AB previnem o SCBID, preservam a BI e previnem a translocação bacteriana. (57)

Os AB modulam a composição da MI e, por outro lado, a MI regula o *pool* de AB, uma vez que desconjuga e converte os AB primários em AB secundários. Apesar de uma grande variedade de microrganismos intestinais terem a capacidade de desconjugar AB, apenas

algumas bactérias (predominantemente espécies de *Clostridium*) facilitam a conversão de AB primários em AB secundários. (57, 100) Comparativamente aos indivíduos saudáveis, os doentes com EHNA têm concentrações mais altas de AB totais, ácidos cólico e quenodeoxicólico a nível fecal, bem como uma proporção mais elevada de AB primários/AB secundários. (99)

Reconhece-se que os AB podem funcionar como moléculas de sinalização importantes que ativam recetores do hospedeiro, como o recetor farnesóide X (FXR) e o recetor de ácido biliar acoplado à proteína G (TGR5). (57) Os AB primários atuam como ligantes para o FXR e AB secundários atuam como moléculas de sinalização para TGR5. (63) O FXR pertence ao grupo de recetores nucleares e tem surgido como um modulador vital no controlo de diversas vias metabólicas. O FXR é abundante no intestino e no fígado em relação a outros tecidos. (98) Desempenha um papel fundamental na absorção e transporte de AB para o fígado, bem como na lipogénese hepática *de novo*, transporte de lipoproteínas de baixa densidade e metabolismo de TG. (99) A homeostase da glicose também controlada pelo GLP-1, que é estimulado pelo TGR5. A ativação do TGR5 aumenta a secreção de GLP-1, mecanismo protetor da obesidade. (63)

Acredita-se que a MI desempenhe um papel na patogénese da EHNA, alterando o tamanho e a composição do *pool* AB, o que leva à inibição da sinalização de FXR e TGR5, promovendo assim obesidade e FGNA. (63)

11.8. Etanol

A MI produz diversos compostos potencialmente hepatotóxicos, como etanol, fenóis, amónia que são transportados para o fígado pela VP, estimulando as células Kupffer para a produção de óxido nítrico e citocinas, como TNF- α . (52)

O etanol endógeno é um metabólito cuja oxidação no fígado é realizada pela enzima álcool desidrogenase, levando à formação de acetato e acetaldeído. O primeiro composto é um substrato para a síntese de ácidos gordos e o segundo composto leva à produção de ROS. (59) O metabolismo do álcool leva à síntese de ácidos gordos e stresse oxidativo hepático, dois dos “hits” que concorrem na patogénese da EH/EHNA. Também pode afetar a PI levando à endotoxemia e suas consequências na doença. (11) Pensa-se que a produção de ROS pode estar envolvida em lesão hepática, sendo que contribui para a rutura da BI. (52)

Assim, a fermentação de hidratos de carbono por bactérias intestinais leva à produção de etanol que promove FGNA. Tal facto explica a presença de concentrações aumentadas de etanol no sangue em crianças com EHNA comparativamente a indivíduos saudáveis ou a

criança com EH, sugerindo que a produção de etanol pode contribuir para o agravamento da lesão hepática, estimulando a inflamação. (10) Em doentes obesos foram detetados níveis mais elevados de etanol. Também se verificou a expressão mais aumentada de forma significativa de enzimas que metabolizam o etanol em doentes com EHNA. (59)

11.9. Fator 4 semelhante à angiotensina

Um dos principais mecanismos protetores da obesidade induzida pela dieta são os níveis elevados de fator 4 semelhante à angiotensina (ANGPTL4), também conhecido como fator adipocitário induzido pelo jejum (FAF). (94)

A MI também pode diminuir a expressão intestinal de ANGPTL4, cuja função é a inibição da lipoproteína lipase do tecido adiposo. Deste modo, aumenta a captação de ácidos gordos no tecido adiposo e no fígado, favorecendo a expansão de tecido adiposo e a esteatose hepática. (8, 11)

12. Terapêutica

Até ao momento não existe tratamento específico para o FGNA. Como tal, na ausência de uma terapia comprovadamente eficaz, a abordagem deve ser multidisciplinar com combinação de métodos farmacológicos e não farmacológicos. (101)

Inicialmente, as opções terapêuticas para pacientes com FGNA incluem modificações no estilo de vida, abrangendo mudanças na dieta e aumento do exercício físico, sendo que pode haver complementaridade com terapia comportamental médica e cognitiva. (8)

As comorbidades metabólicas, como DM tipo 2, e fatores de risco cardiovascular devem ser controlados através da otimização da terapêutica, apesar da mesma não ter benefício específico no FGNA, exemplificado pela estatina para a dislipidemia. (101)

Com base na relação entre a MI e o FGNA, o tratamento direcionado à MI tornou-se uma abordagem promissora para o FGNA, através do uso de probióticos, prebióticos, antibióticos e transplante de microbiota fecal. (98)

12.1. Modificação do estilo de vida

A modificação do estilo de vida continua a ser a principal intervenção de primeira linha no FGNA e deve ser recomendada a todos os pacientes. A perda de peso através de modificação dietética e exercício físico pode reverter a progressão da doença, uma vez que reduz a EH e a EHNA. Reduz ainda o risco de desenvolver DCV e DM. (101)

A atividade física reduz o tecido adiposo visceral e os ácidos gordos no plasma. (102) A perda de peso é altamente eficaz em pacientes com FGNA, uma vez que permite melhoria nas características histológicas da EHNA, verificando-se regressão da fibrose em pacientes com perda de peso $\geq 10\%$. (32) No entanto, a perda de peso deve ser gradual, pois se muito rápido associa-se a agravamento da esteato-hepatite e risco aumentado de insuficiência hepática e cálculos biliares. (103) O treino físico influencia também a MI, uma vez que aumenta a razão *Bacteroidetes/Firmicutes*. (98)

A restrição calórica exerce uma reprogramação metabólica corporal e diminui a lesão oxidativa às células. A ingestão de hidratos de carbono está ligada ao FGNA, pelo que a sua restrição na dieta reduz a carga glicémica, melhora a RI e diminui os TG. (102)

O consumo de açúcar deve ser mantido abaixo de 10% da ingestão calórica diária e deve ser evitada uma dieta rica em frutose. (103) A dieta rica em frutose pode alterar o metabolismo do fígado (contribui para a lipogénese hepática *de novo* e produção de ROS),

aumenta a promove o crescimento bacteriano, influencia a PI e aumenta o LPS a nível sérico. (98, 102)

A ingestão de fibra alimentar proporciona benefícios fisiológicos associados à fermentação por diferentes géneros e filos bacterianos que produzem AGCC. (44) Deve ser reduzido o consumo de alimentos como carnes vermelhas e gordura saturadas. (31)

12.2. Tratamento da obesidade

Vários medicamentos para a perda de peso foram avaliados como tratamentos potenciais para FGNA, como por exemplo, o *orlistat*, um inibidor da lipase intestinal, que promove a perda de peso ao diminuir a absorção de gorduras da dieta, causando má digestão da gordura intestinal. Mostrou melhorar a EH, porém não reverteu a EHNA nem teve benefício na fibrose hepática. (32)

A cirurgia bariátrica mostrou ser benéfica na redução das comorbidades associadas à obesidade e à síndrome metabólica. Além disso, foi comprovado que a cirurgia bariátrica induz mudanças drásticas na MI devido a mudanças anatómicas, resultando em exposição alterada ao ácido gástrico, absorção de nutrientes e AB, e mudanças na ingestão alimentar, fatores implicados na patogénese do FGNA. (8)

12.3. Sensibilizadores de insulina

Como o FGNA está intimamente associado à RI, sendo que esta desempenha um papel fundamental no início e progressão da EHNA e fibrose, várias estratégias de tratamento incluem agentes que aumentam a sensibilidade à insulina. (102, 103)

A metformina é uma biguanida, tendo sido foi o agente antidiabético inicialmente a ser avaliado como um tratamento potencial para EHNA e revelou melhoria dos níveis séricos de alanina aminotransferase. (32) Porém, apesar de evidências demonstrarem o benefício na acumulação de lípidos e inflamação, recentemente os dados sugerem falta de benefício histológico, pelo que não é recomendada como terapia do FGNA. (39)

As tiazolidinedionas (TZD), também conhecidas como glitazonas, são os fármacos testados e com maior em evidências para o tratamento da EHNA. (102) Exercem um efeito protetor a nível hepático pelo aumento da sensibilidade à insulina, elevação da produção de adiponectina e diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias no TA e macrófagos. (104) A *pioglitazona* demonstrou melhorar a esteatose, inflamação e balonização

hepatocelular, bem como a fibrose hepática, contudo também foram relatados efeitos colaterais, como ganho de peso e edema. (16, 105)

Os análogos do GLP-1 retardam o esvaziamento gástrico, diminuem o apetite e aumentam a saciedade e plenitude pós-prandial, possuindo ainda efeitos estimuladores da insulina e inibidores do glucagon. O *liraglutide* parece diminuir a disfunção metabólica, RI e lipotoxicidade nos principais órgãos que contribuem para a patogênese da EHNA. (9)

12.4. Vitamina E

Pensa-se que a vitamina E seja eficaz no FGNA atendendo ao efeito antioxidante e impacto no metabolismo lipídico e glicose. O estudo dos benefícios da vitamina E demonstraram que esta reduziu as alterações a nível da função hepática e as características histológicas da EHNA, porém não diminuiu a fibrose. (101)

12.5. Probióticos, Prebióticos e Simbióticos

Probióticos são microrganismos vivos não patogénicos que modificam a MI quando administrados em quantidades suficientes. (68) *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são os probióticos mais frequentemente usados para prevenir vários distúrbios metabólicos, incluindo FGNA e EHNA. (45) Os probióticos atuam na lesão hepática crónica através de diversos mecanismos: inibição da translocação bacteriana e invasão epitelial pela manutenção da integridade da BI; indução da produção de peptídeos antimicrobianos, reduzindo a inflamação e moldando o sistema imunológico do hospedeiro. (5) Os probióticos melhoram as concentrações de aminotransferases e os parâmetros metabólicos do FGNA, como a gordura visceral, colesterol total e RI. (58)

Os prebióticos correspondem a hidratos de carbono não digeríveis que podem ser fermentados por bactérias e, posteriormente, alterar a composição e atividade do MI. (68) Causam alterações mediadas pelo intestino no metabolismo luminal e periférico, como diminuição de hepatotoxinas bacterianas, aumento da função da BI, diminuição da inflamação, redução da lipogénese de novo, modificação do apetite e saciedade, e controle glicémico. (10) Também ajudam a melhorar a função de BI, um fenómeno que diminui a translocação de LPS no hospedeiro. Tal facto justifica-se pelo aumento da expressão da atividade de proteínas envolvidas na função de BI, incluindo o do peptídeo semelhante ao glucagon 2 (GLP-2). (106) Os prebióticos, como a inulina e a oligofrutose, controlam o crescimento bacteriano, reduzem os níveis de endotoxina plasmática e aumentam a secreção de GLP-1. (3) Assim, após o

tratamento com prebióticos, as bactérias fermentadoras de hidratos de carbono (por exemplo, *Lactobacilli* e *Bifidobacteria*) aumentam, reduzindo a endotoxemia e melhorando o metabolismo da glicose. (48)

Os simbióticos referem-se à combinação de prebióticos e probióticos na melhoria das principais características do FGNA. (98)

12.6. Antibióticos

Os antibióticos podem eliminar a MI prejudicial e a sua eficácia foi confirmada em várias doenças hepáticas. Pode afetar positivamente a MI, promovendo o crescimento de bactérias intestinais benéficas, como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. (107)

Os antibióticos são usados para atuarem na flora intestinal e diminuir os efeitos dos componentes microbianos e dos seus metabolitos no hospedeiro. (60) Para o SCBID estão indicados os antibióticos que atuam apenas no TGI, como rifaximina e metronidazol. A rifaximina possui amplo espectro de atividade contra bactérias aeróbias e anaeróbias Gram-positivas e Gram-negativas e modula positivamente a composição e interações da MI. Conduz a alterações estáveis e persistentes na composição bacteriana do duodeno, porém os efeitos no colón são graduais e revertidos após suspensão do tratamento. (3)

Embora o tratamento com antibióticos a curto prazo possa ter um efeito terapêutico relevante, a sua utilização prolongada pode levar ao surgimento de resistência bacteriana, limitando assim a sua eficácia e aumentando o risco de infeções secundárias. Por isso, o uso crónico de antibióticos não é estimulado, uma vez que podem causar disbiose. (60, 107)

12.7. Transplante fecal

O transplante fecal é usado para restabelecer um ambiente microbiano intestinal saudável e restaurar a colonização fisiológica. Atualmente é um tratamento aceite para infeção recorrente ou refratária por *Clostridium difficile*. (73) O transplante fecal consiste na transferência de material fecal contendo bactérias de um dador saudável para um recetor doente de forma a restabelecer uma composição equilibrada da MI. (10)

Os dados indicam que transplante fecal pode atenuar a EHNA. (70) Pensa-se que provavelmente os efeitos benéficos sejam em parte devido ao aumento da concentração intestinal de butirato e na diminuição da PI. Assim, o transplante fecal pode fornecer uma nova opção terapêutica, necessitando de mais investigação clínica no futuro. (17)

12.8. Novas terapêuticas

Não existe atualmente nenhum fármaco para o tratamento específico do FGNA. No entanto, vários agentes visam diversos mecanismos de doença e têm sido investigados e encontram-se em ensaios clínicos. (101) Muitas das abordagens farmacológicas em investigação para o tratamento da EHNA estão focadas nos eventos que ocorrem a jusante da lesão hepática como a inflamação e fibrogênese. (108)

Os agonistas do recetor farnesóide são um exemplo de fármaco em estudo. Os ligantes sintéticos que ativam o FXR melhoram a sensibilidade à insulina e exibem efeitos anti-inflamatórios e antifibróticos. (16) O ácido obeticólico é um derivado semi-sintético do ácido quenodesoxicólico e funciona como agonista de FXR. (32) Foi demonstrado que melhora a resistência à insulina e as características histológicas da EHNA, incluindo fibrose. Porém, está associado a efeitos colaterais, como prurido e níveis elevados de colesterol LDL. (108, 109)

O *selonsertib* é um inibidor da cinase-1, reguladora na apoptose, e parte integrante da patogénese da lesão celular na EHNA, promovendo stresse oxidativo, fibrose e inflamação. A cinase-1 é ativada por ROS, TNF- α , stresse de retículo endoplasmático e LPS. No ensaio clínico com indivíduos com EHNA, o *selonsertib* melhorou a fibrose, porém é necessária avaliação adicional do verdadeiro impacto na EHNA. (32)

Os proliferadores do peroxissoma alfa (PPAR α) e gama (PPAR δ) são fatores de transcrição nucleares e potentes reguladores do metabolismo lipídico e inflamação, nomeadamente a nível hepatocitário. (39) O *elafibranor* é um agonista duplo dos recetores de PPAR α/δ que demonstrou induzir a resolução da EHNA, tendo ainda tido impacto positivo nos fatores cardiometabólicos, incluindo perfis lipídicos e sensibilidade à insulina. (32)

Os recetores de quimiocina tipo 2 (CCR2) e 5 (CCR5) são muito expressos na EHNA. O *cenicriviroc* trata-se de um inibidor duplo de CCR2/CCR5 que provou reduzir de forma eficaz a inflamação e a fibrose da EHNA. (105)

13. Prognóstico

Relativamente à população em geral, a sobrevida expectável de doentes com FGNA é baixa. (5) A causa principal de morte será atribuída a eventos cardiovasculares, seguindo-se a patologia maligna extra-hepática e, em menor extensão, a doença hepática em estágio terminal, contribui para a mortalidade nesta patologia. (110)

Principalmente relacionada com o prognóstico está a presença de fibrose hepática. Em muitos indivíduos, na ausência de fibrose significativa, o FGNA pode ser uma condição benigna, porém o avanço da doença para fibrose traduz-se no aumento significativo da morbilidade e mortalidade. (39)

O prognóstico hepático a longo prazo depende principalmente do estágio histológico na biópsia hepática, mas vários fatores de risco podem contribuir para a maior progressão da doença. (5) A EHNA acompanhada de obesidade tem uma probabilidade mais elevada de progredir para doença hepática em estágio terminal, associando desta forma a obesidade com maior taxa de mortalidade em doentes com FGNA. (9)

Enquanto a doença nos estádios iniciais é potencialmente reversível, o transplante de fígado é a solução mais promissora para os indivíduos com doença avançada. (5)

14. Conclusão

O FGNA e a obesidade levantam grandes preocupações de saúde pública em todo o mundo. O FGNA constitui uma das principais causas de doença hepática nos países desenvolvidos. Possui uma história natural muito heterogênea e cobre um amplo espectro de gravidade. A obesidade é um fator de risco bem documentado para o FGNA.

A MI desempenha um papel importante na proteção imunológica do hospedeiro, na capacidade de captação de energia e na absorção de nutrientes. O eixo intestino-fígado desempenha um papel central na patogênese da obesidade e FGNA pela ligação entre a MI e o sistema imunológico do hospedeiro, modulando a inflamação, a RI e a PI. A MI obesogénica pode alternar a função hepática, uma vez que estimula a produção de TG hepáticos e modula o metabolismo lipídico sistémico que afeta indiretamente o armazenamento de ácidos gordos no fígado. A MI parece ainda desempenhar um papel importante na progressão do FGNA para EHNA.

A disbiose associada ao SCBID tem um impacto na função da BI através da alteração das *tight junctions*, o que promove a translocação de LPS do intestino para a circulação sistémica e portal. Associadamente, outros produtos bacterianos, como por exemplo o etanol e a TMAO, podem induzir toxicidade hepática, que favorece estados pró-inflamatórios e lesão hepática. O aumento da proporção de *Firmicutes* em relação a *Bacteroidetes* induz uma maior capacidade de captação de energia dos hidratos de carbono não digeridos o que leva a produtos finais mais fermentáveis. Pode ainda ocorrer perturbação no metabolismo da colina e AB com efeitos prejudiciais no fígado.

Apesar do conhecimento atual da epidemiologia, patogênese e história natural do FGNA, até o momento não foram aprovadas terapias farmacológicas específicas para esta doença e, conseqüentemente, não existem estratégias gerais para a sua abordagem. Apesar de antibioterapia convencional ter benefício, o seu uso clínico é limitado atendendo à elevada prevalência de resistência bacteriana. Os probióticos, prebióticos e simbióticos são alternativas seguras e eficazes. O transplante fecal é também uma estratégia promissora que pode reverter a disbiose associada ao FGNA. Algumas terapêuticas estão a ser desenvolvidas, tendo por base os processos fisiopatológicos da inflamação e evolução da fibrose hepática, envolvendo frequentemente componentes e metabolitos derivados da MI.

Conflitos de interesse e fontes de financiamento

Declara-se que o presente trabalho, desenvolvido com cariz puramente académico, não apresenta conflitos de interesse nem fontes externas de financiamento.

15. Agradecimentos

Agradeço ao Professor Doutor Rui Gradiz e à Professora Doutora Anabela Mota Pinto pela disponibilidade e orientação científica na concretização deste trabalho.

16. Bibliografia

1. Cotter TG, Rinella M. Nonalcoholic Fatty Liver Disease 2020: The State of the Disease. *Gastroenterology*. 2020;158(7):1851-64.
2. Pais R, Maurel T. Natural History of NAFLD. *J Clin Med*. 2021;10(6).
3. Kessoku T, Kobayashi T, Imajo K, Tanaka K, Yamamoto A, Takahashi K, et al. Endotoxins and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:770986.
4. Huang TD, Behary J, Zekry A. Non-alcoholic fatty liver disease: a review of epidemiology, risk factors, diagnosis and management. *Intern Med J*. 2020;50(9):1038-47.
5. Doulberis M, Kotronis G, Gialamprinou D, Kountouras J, Katsinelos P. Non-alcoholic fatty liver disease: An update with special focus on the role of gut microbiota. *Metabolism*. 2017;71:182-97.
6. Hrnčir T, Hrnčířová L, Kverka M, Hromádka R, Machová V, Trčková E, et al. Gut Microbiota and NAFLD: Pathogenetic Mechanisms, Microbiota Signatures, and Therapeutic Interventions. *Microorganisms*. 2021;9(5).
7. Canfora EE, Meex RCR, Venema K, Blaak EE. Gut microbial metabolites in obesity, NAFLD and T2DM. *Nat Rev Endocrinol*. 2019;15(5):261-73.
8. Schwenger KJP, Bolzon CM, Li C, Allard JP. Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: the role of the gut bacteria. *Eur J Nutr*. 2019;58(5):1771-84.
9. Polyzos SA, Kountouras J, Mantzoros CS. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. *Metabolism*. 2019;92:82-97.
10. Safari Z, Gérard P. The links between the gut microbiome and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Cell Mol Life Sci*. 2019;76(8):1541-58.
11. Duseja A, Chawla YK. Obesity and NAFLD: the role of bacteria and microbiota. *Clin Liver Dis*. 2014;18(1):59-71.
12. Compare D, Coccoli P, Rocco A, Nardone OM, De Maria S, Carteni M, et al. Gut-liver axis: the impact of gut microbiota on non alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2012;22(6):471-6.
13. Leung C, Rivera L, Furness JB, Angus PW. The role of the gut microbiota in NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016;13(7):412-25.
14. Suppli MP, Bagger JI, Lelouvier B, Broha A, Demant M, Kønig MJ, et al. Hepatic microbiome in healthy lean and obese humans. *JHEP Rep*. 2021;3(4):100299.
15. Khan A, Ding Z, Ishaq M, Bacha AS, Khan I, Hanif A, et al. Understanding the Effects of Gut Microbiota Dysbiosis on Nonalcoholic Fatty Liver Disease and the Possible Probiotics Role: Recent Updates. *Int J Biol Sci*. 2021;17(3):818-33.

16. Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, Sanyal AJ. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med.* 2018;24(7):908-22.
17. Han H, Jiang Y, Wang M, Melaku M, Liu L, Zhao Y, et al. Intestinal dysbiosis in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): focusing on the gut-liver axis. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2021:1-18.
18. Ayonrinde OT. Historical narrative from fatty liver in the nineteenth century to contemporary NAFLD - Reconciling the present with the past. *JHEP Rep.* 2021;3(3):100261.
19. Lonardo A, Leoni S, Alswat KA, Fouad Y. History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci.* 2020;21(16).
20. Younossi ZM. Non-alcoholic fatty liver disease - A global public health perspective. *J Hepatol.* 2019;70(3):531-44.
21. Murag S, Ahmed A, Kim D. Recent Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gut Liver.* 2021;15(2):206-16.
22. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018;15(1):11-20.
23. Makri E, Goulas A, Polyzos SA. Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis and Emerging Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Arch Med Res.* 2021;52(1):25-37.
24. Mitra S, De A, Chowdhury A. Epidemiology of non-alcoholic and alcoholic fatty liver diseases. *Transl Gastroenterol Hepatol.* 2020;5:16.
25. Sheka AC, Adeyi O, Thompson J, Hameed B, Crawford PA, Ikramuddin S. Nonalcoholic Steatohepatitis: A Review. *Jama.* 2020;323(12):1175-83.
26. Demir M, Lang S, Steffen HM. Nonalcoholic fatty liver disease - current status and future directions. *J Dig Dis.* 2015;16(10):541-57.
27. Pierantonelli I, Svegliati-Baroni G. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Basic Pathogenetic Mechanisms in the Progression From NAFLD to NASH. *Transplantation.* 2019;103(1):e1-e13.
28. Lackner C. Hepatocellular ballooning in nonalcoholic steatohepatitis: the pathologist's perspective. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011;5(2):223-31.
29. Carr RM, Oranu A, Khungar V. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathophysiology and Management. *Gastroenterol Clin North Am.* 2016;45(4):639-52.
30. Juanola O, Martínez-López S, Francés R, Gómez-Hurtado I. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Metabolic, Genetic, Epigenetic and Environmental Risk Factors. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;18(10).
31. Mundi MS, Velapati S, Patel J, Kellogg TA, Abu Dayyeh BK, Hurt RT. Evolution of NAFLD and Its Management. *Nutr Clin Pract.* 2020;35(1):72-84.

32. Patel SS, Siddiqui MS. Current and Emerging Therapies for Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Drugs*. 2019;79(1):75-84.
33. Stefan N, Häring HU, Cusi K. Non-alcoholic fatty liver disease: causes, diagnosis, cardiometabolic consequences, and treatment strategies. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2019;7(4):313-24.
34. Basaranoglu M, Basaranoglu G, Sentürk H. From fatty liver to fibrosis: a tale of "second hit". *World J Gastroenterol*. 2013;19(8):1158-65.
35. Milić S, Lulić D, Štimac D. Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: biochemical, metabolic and clinical presentations. *World J Gastroenterol*. 2014;20(28):9330-7.
36. Brunt EM, Wong VW, Nobili V, Day CP, Sookoian S, Maher JJ, et al. Nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15080.
37. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella 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*. 2018;67(1):328-57.
38. Gerges SH, Wahdan SA, Elsherbiny DA, El-Demerdash E. Non-alcoholic fatty liver disease: An overview of risk factors, pathophysiological mechanisms, diagnostic procedures, and therapeutic interventions. *Life Sci*. 2021;271:119220.
39. Marjot T, Moolla A, Cobbold JF, Hodson L, Tomlinson JW. Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Adults: Current Concepts in Etiology, Outcomes, and Management. *Endocr Rev*. 2020;41(1).
40. Nobili V, Alkhoury N, Alisi A, Della Corte C, Fitzpatrick E, Raponi M, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a challenge for pediatricians. *JAMA Pediatr*. 2015;169(2):170-6.
41. Kleiner DE, Makhlouf HR. Histology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis in Adults and Children. *Clin Liver Dis*. 2016;20(2):293-312.
42. Chakravarthy MV, Waddell T, Banerjee R, Guess N. Nutrition and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Current Perspectives. *Gastroenterol Clin North Am*. 2020;49(1):63-94.
43. Nagashimada M, Honda M. Effect of Microbiome on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and the Role of Probiotics, Prebiotics, and Biogenics. *Int J Mol Sci*. 2021;22(15).
44. Altamirano-Barrera A, Uribe M, Chávez-Tapia NC, Nuño-Lámbarri N. The role of the gut microbiota in the pathology and prevention of liver disease. *J Nutr Biochem*. 2018;60:1-8.
45. Ni Y, Ni L, Zhuge F, Fu Z. The Gut Microbiota and Its Metabolites, Novel Targets for Treating and Preventing Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Mol Nutr Food Res*. 2020;64(17):e2000375.

46. Zwartjes MSZ, Gerdes VEA, Nieuwdorp M. The Role of Gut Microbiota and Its Produced Metabolites in Obesity, Dyslipidemia, Adipocyte Dysfunction, and Its Interventions. *Metabolites*. 2021;11(8).
47. Kim B, Choi HN, Yim JE. Effect of Diet on the Gut Microbiota Associated with Obesity. *J Obes Metab Syndr*. 2019;28(4):216-24.
48. Vallianou N, Stratigou T, Christodoulatos GS, Dalamaga M. Understanding the Role of the Gut Microbiome and Microbial Metabolites in Obesity and Obesity-Associated Metabolic Disorders: Current Evidence and Perspectives. *Curr Obes Rep*. 2019;8(3):317-32.
49. Bonsembiante L, Targher G, Maffei C. Non-alcoholic fatty liver disease in obese children and adolescents: a role for nutrition? *Eur J Clin Nutr*. 2021.
50. Yadav A, Kataria MA, Saini V. Role of leptin and adiponectin in insulin resistance. *Clin Chim Acta*. 2013;417:80-4.
51. Chang ML, Yang Z, Yang SS. Roles of Adipokines in Digestive Diseases: Markers of Inflammation, Metabolic Alteration and Disease Progression. *Int J Mol Sci*. 2020;21(21).
52. Arslan N. Obesity, fatty liver disease and intestinal microbiota. *World J Gastroenterol*. 2014;20(44):16452-63.
53. Adolph TE, Grander C, Grabherr F, Tilg H. Adipokines and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Multiple Interactions. *Int J Mol Sci*. 2017;18(8).
54. P. KSW. Obesity and the liver: nonalcoholic fatty liver disease Division of Gastroenterology and Hepatology, Northwestern University, Chicago, Ill Translational Research; 2014.
55. Moon YA. The SCAP/SREBP Pathway: A Mediator of Hepatic Steatosis. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2017;32(1):6-10.
56. Lu FB, Hu ED, Xu LM, Chen L, Wu JL, Li H, et al. The relationship between obesity and the severity of non-alcoholic fatty liver disease: systematic review and meta-analysis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018;12(5):491-502.
57. Ma J, Zhou Q, Li H. Gut Microbiota and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Insights on Mechanisms and Therapy. *Nutrients*. 2017;9(10).
58. Duarte SMB, Stefano JT, Oliveira CP. Microbiota and nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis (NAFLD/NASH). *Ann Hepatol*. 2019;18(3):416-21.
59. Gkolfakis P, Dimitriadis G, Triantafyllou K. Gut microbiota and non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2015;14(6):572-81.
60. Hu H, Lin A, Kong M, Yao X, Yin M, Xia H, et al. Intestinal microbiome and NAFLD: molecular insights and therapeutic perspectives. *J Gastroenterol*. 2020;55(2):142-58.

61. Machado MV, Cortez-Pinto H. Diet, Microbiota, Obesity, and NAFLD: A Dangerous Quartet. *Int J Mol Sci.* 2016;17(4):481.
62. Bakhshimoghaddam F, Alizadeh M. Contribution of gut microbiota to nonalcoholic fatty liver disease: Pathways of mechanisms. *Clin Nutr ESPEN.* 2021;44:61-8.
63. Ghoshal UC, Goel A, Quigley EMM. Gut microbiota abnormalities, small intestinal bacterial overgrowth, and non-alcoholic fatty liver disease: An emerging paradigm. *Indian J Gastroenterol.* 2020;39(1):9-21.
64. Frazier TH, DiBaise JK, McClain CJ. Gut microbiota, intestinal permeability, obesity-induced inflammation, and liver injury. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2011;35(5 Suppl):14s-20s.
65. Yang YJ, Ni YH. Gut microbiota and pediatric obesity/non-alcoholic fatty liver disease. *J Formos Med Assoc.* 2019;118 Suppl 1:S55-s61.
66. Augustyn M, Grys I, Kukla M. Small intestinal bacterial overgrowth and nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Hepatol.* 2019;5(1):1-10.
67. Lau LHS, Wong SH. Microbiota, Obesity and NAFLD. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1061:111-25.
68. Xie C, Halegoua-DeMarzio D. Role of Probiotics in Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Does Gut Microbiota Matter? *Nutrients.* 2019;11(11).
69. Chu H, Duan Y, Yang L, Schnabl B. Small metabolites, possible big changes: a microbiota-centered view of non-alcoholic fatty liver disease. *Gut.* 2019;68(2):359-70.
70. Poeta M, Pierri L, Vajro P. Gut-Liver Axis Derangement in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Children (Basel).* 2017;4(8).
71. Vancamelbeke M, Vermeire S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017;11(9):821-34.
72. Portincasa P, Bonfrate L, Khalil M, Angelis M, Calabrese FM, D'Amato M, et al. Intestinal Barrier and Permeability in Health, Obesity and NAFLD. *Biomedicines.* 2021;10(1).
73. Albillos A, de Gottardi A, Rescigno M. The gut-liver axis in liver disease: Pathophysiological basis for therapy. *J Hepatol.* 2020;72(3):558-77.
74. Massier L, Blüher M, Kovacs P, Chakaroun RM. Impaired Intestinal Barrier and Tissue Bacteria: Pathomechanisms for Metabolic Diseases. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021;12:616506.
75. Hyun CK. Molecular and Pathophysiological Links between Metabolic Disorders and Inflammatory Bowel Diseases. *Int J Mol Sci.* 2021;22(17).
76. Grander C, Grabherr F, Moschen AR, Tilg H. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Cause or Effect of Metabolic Syndrome. *Visc Med.* 2016;32(5):329-34.

77. Luther J, Garber JJ, Khalili H, Dave M, Bale SS, Jindal R, et al. Hepatic Injury in Nonalcoholic Steatohepatitis Contributes to Altered Intestinal Permeability. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2015;1(2):222-32.
78. Cui Y, Wang Q, Chang R, Zhou X, Xu C. Intestinal Barrier Function-Non-alcoholic Fatty Liver Disease Interactions and Possible Role of Gut Microbiota. *J Agric Food Chem*. 2019;67(10):2754-62.
79. Machado MV, Cortez-Pinto H. Gut microbiota and nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol*. 2012;11(4):440-9.
80. Damms-Machado A, Louis S, Schnitzer A, Volynets V, Rings A, Basrai M, et al. Gut permeability is related to body weight, fatty liver disease, and insulin resistance in obese individuals undergoing weight reduction. *Am J Clin Nutr*. 2017;105(1):127-35.
81. Teixeira TF, Souza NC, Chiarello PG, Franceschini SC, Bressan J, Ferreira CL, et al. Intestinal permeability parameters in obese patients are correlated with metabolic syndrome risk factors. *Clin Nutr*. 2012;31(5):735-40.
82. Rafiei R, Bemanian M, Rafiei F, Bahrami M, Fooladi L, Ebrahimi G, et al. Liver disease symptoms in non-alcoholic fatty liver disease and small intestinal bacterial overgrowth. *Rom J Intern Med*. 2018;56(2):85-9.
83. Fialho A, Thota P, McCullough AJ, Shen B. Small Intestinal Bacterial Overgrowth Is Associated with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *J Gastrointest Liver Dis*. 2016;25(2):159-65.
84. Flores-Guerrero JL, Post A, van Dijk PR, Connelly MA, Garcia E, Navis G, et al. Circulating trimethylamine-N-oxide is associated with all-cause mortality in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int*. 2021;41(10):2371-82.
85. Ferolla SM, Armiliato GN, Couto CA, Ferrari TC. The role of intestinal bacteria overgrowth in obesity-related nonalcoholic fatty liver disease. *Nutrients*. 2014;6(12):5583-99.
86. Cassard AM, Gérard P, Perlemuter G. Microbiota, Liver Diseases, and Alcohol. *Microbiol Spectr*. 2017;5(4).
87. de Faria Ghetti F, Oliveira DG, de Oliveira JM, de Castro Ferreira L, Cesar DE, Moreira APB. Influence of gut microbiota on the development and progression of nonalcoholic steatohepatitis. *Eur J Nutr*. 2018;57(3):861-76.
88. Grabherr F, Grander C, Effenberger M, Adolph TE, Tilg H. Gut Dysfunction and Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10:611.
89. Miura K, Ishioka M, Iijima K. The Roles of the Gut Microbiota and Toll-like Receptors in Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Obes Metab Syndr*. 2017;26(2):86-96.

90. Knaapen M, Kootte RS, Zoetendal EG, de Vos WM, Dallinga-Thie GM, Levi M, et al. Obesity, non-alcoholic fatty liver disease, and atherothrombosis: a role for the intestinal microbiota? *Clin Microbiol Infect.* 2013;19(4):331-7.
91. Saad MJ, Santos A, Prada PO. Linking Gut Microbiota and Inflammation to Obesity and Insulin Resistance. *Physiology (Bethesda).* 2016;31(4):283-93.
92. Jadhav K, Cohen TS. Can You Trust Your Gut? Implicating a Disrupted Intestinal Microbiome in the Progression of NAFLD/NASH. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;11:592157.
93. Lawan A, Bennett AM. Mitogen-Activated Protein Kinase Regulation in Hepatic Metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2017;28(12):868-78.
94. Kobylak N, Virchenko O, Falalyeyeva T. Pathophysiological role of host microbiota in the development of obesity. *Nutr J.* 2016;15:43.
95. Idalsoaga F, Kulkarni AV, Mousa OY, Arrese M, Arab JP. Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Alcohol-Related Liver Disease: Two Intertwined Entities. *Front Med (Lausanne).* 2020;7:448.
96. Koukias N, Buzzetti E, Tsochatzis EA. Intestinal hormones, gut microbiota and non-alcoholic fatty liver disease. *Minerva Endocrinol.* 2017;42(2):184-94.
97. Brumbaugh DE, Friedman JE. Developmental origins of nonalcoholic fatty liver disease. *Pediatr Res.* 2014;75(1-2):140-7.
98. Han R, Ma J, Li H. Mechanistic and therapeutic advances in non-alcoholic fatty liver disease by targeting the gut microbiota. *Front Med.* 2018;12(6):645-57.
99. Jayakumar S, Loomba R. Review article: emerging role of the gut microbiome in the progression of nonalcoholic fatty liver disease and potential therapeutic implications. *Aliment Pharmacol Ther.* 2019;50(2):144-58.
100. Sharpton SR, Schnabl B, Knight R, Loomba R. Current Concepts, Opportunities, and Challenges of Gut Microbiome-Based Personalized Medicine in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Cell Metab.* 2021;33(1):21-32.
101. Majumdar A, Verbeek J, Tsochatzis EA. Non-alcoholic fatty liver disease: Current therapeutic options. *Curr Opin Pharmacol.* 2021;61:98-105.
102. Raza S, Rajak S, Upadhyay A, Tewari A, Anthony Sinha R. Current treatment paradigms and emerging therapies for NAFLD/NASH. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2021;26(2):206-37.
103. Singh S, Osna NA, Kharbanda KK. Treatment options for alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease: A review. *World J Gastroenterol.* 2017;23(36):6549-70.
104. Van Gaal LF, Mertens J, Francque S, De Block C. Therapeutic approaches for non-alcoholic steatohepatitis. *Ther Adv Endocrinol Metab.* 2021;12:20420188211034300.

105. Shen B, Lu LG. Efficacy and safety of drugs for nonalcoholic steatohepatitis. *J Dig Dis.* 2021;22(2):72-82.
106. Druart C, Alligier M, Salazar N, Neyrinck AM, Delzenne NM. Modulation of the gut microbiota by nutrients with prebiotic and probiotic properties. *Adv Nutr.* 2014;5(5):624s-33s.
107. Chen HT, Huang HL, Li YQ, Xu HM, Zhou YJ. Therapeutic advances in non-alcoholic fatty liver disease: A microbiota-centered view. *World J Gastroenterol.* 2020;26(16):1901-11.
108. Neuschwander-Tetri BA. Non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Med.* 2017;15(1):45.
109. Mantovani A, Dalbeni A. Treatments for NAFLD: State of Art. *Int J Mol Sci.* 2021;22(5).
110. Sanna C, Rosso C, Marietti M, Bugianesi E. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Extra-Hepatic Cancers. *Int J Mol Sci.* 2016;17(5).