

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM PROBIÓTICOS EM
PACIENTES COM ESTEATO-HEPATITE NÃO ALCOÓLICA: ENSAIO
CLÍNICO RANDOMIZADO**

Tese de doutorado

Ms. Nut. Amanda Souza Silva Sperb

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA – FAMED
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA E
HEPATOLOGIA

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM PROBIÓTICOS EM
PACIENTES COM ESTEATO-HEPATITE NÃO ALCOÓLICA: ENSAIO
CLÍNICO RANDOMIZADO**

Autora: Ms. Amanda Souza Silva Sperb

Orientadora: Profa. Dra. Valesca Dall’Alba

**Tese apresentada a Universidade Federal do Rio
Grande do Sul como requisito para obtenção do título
de Doutora**

PORTO ALEGRE, 2020

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

Sperb, Amanda Souza Silva
EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM PROBIÓTICOS EM
PACIENTES COM ESTEATO-HEPATITE NÃO ALCOÓLICA: ENSAIO
CLÍNICO RANDOMIZADO / Amanda Souza Silva Sperb. --
2020.
85 f.
Orientadora: Valesca Dall'Alba.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e
Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica. 2.
Esteato-hepatite Não Alcoólica . 3. Probióticos. 4.
Síndrome Metabólica. 5. Microbiota Intestinal. I.
Dall'Alba, Valesca, orient. II. Título.

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

A minha família, que me apoiou e incentivou durante a realização desse trabalho. E, aos pacientes do Ambulatório de Gastroenterologia e Hepatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que tornaram possível a realização desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

A minha gratidão à professora Dra. Valesca Dall’Alba, por me oportunizar a realização desse trabalho, depositando confiança na minha capacidade e compartilhando do seu conhecimento.

A minha amiga e colega Juliana Bertani pelo auxílio e incentivo para o início desse trabalho.

O meu especial agradecimento à colega Helena Abadie por estar junto desde o início da prática dessa pesquisa, por passar confiança e força até a conclusão desse trabalho.

Ao meu marido Matheus Sperb, pelo apoio e compreensão incondicionais em todas as etapas desse trabalho.

Aos meus colegas do programa de Pós Graduação e Hepatologia, que no decorrer dessa caminhada sempre estiveram presentes com palavras e gestos de incentivo.

Aos médicos, residentes e alunos do curso de medicina pela disposição e colaboração no ambulatório com a coleta de dados.

Aos funcionários do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial aos do Centro de Pesquisa Clínica e Centro de Pesquisa Experimental, que com sua dedicação e competência colaboraram na realização desse trabalho.

E ao Programa de Pós-Graduação em Gastroenterologia e Hepatologia pela oportunidade de desenvolver o projeto.

Esta tese de Doutorado segue o formato proposto pelo Programa de Pós-graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sendo apresentada na forma de revisão de literatura e o primeiro manuscrito confeccionado e publicado sobre o tema da tese, constituindo-se dos seguintes elementos textuais:

1. Revisão da literatura
2. Justificativa
3. Questão de pesquisa
4. Hipóteses
5. Objetivos
6. Referências bibliográficas da tese
7. Artigo:

Artigo 1: Effect of probiotic supplementation in nonalcoholic steatohepatitis patients: PROBILIVER TRIAL protocol – *Trials*

8. Conclusões
9. Perspectivas futuras
10. Anexos

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	13
LISTA DE FIGURAS	14
1. REVISÃO DA LITERATURA.....	15
1.1 Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e Esteato-hepatite não alcoólica (EHNA).....	15
1.1.1 Diagnóstico de DHGNA e EHNA.....	16
1.1.2 Síndrome Metabólica x DHGNA	16
1.1.3 Aspectos nutricionais e recomendações nutricionais na DHGNA	17
1.2 Microbiota Intestinal	19
1.3 Probióticos.....	21
2. JUSTIFICATIVA	24
3. QUESTÃO DA PESQUISA.....	25
4. HIPÓTESES	26
<i>Hipótese nula</i>	26
<i>Hipótese verdadeira</i>	26
5. OBJETIVOS	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
6. ARTIGO CIENTÍFICO 1: Effect of probiotic supplementation in nonalcoholic steatohepatitis patients: PROBILIVER TRIAL protocol	28
7. CONCLUSÕES	41
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	42
ANEXOS	43

RESUMO

Introdução: A Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) compreende desde a esteatose hepática simples até esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), que pode progredir para cirrose ou hepatocarcinoma. Atinge um quarto da população mundial e está associada com a epidemia da obesidade. Considerando o aumento da prevelância de EHNA e a existência de lacunas no seu tratamento, esse estudo objetivou avaliar o efeito da suplementação com probióticos em marcadores de função hepática e parâmetros clínicos em pacientes com EHNA. **Métodos:** Trata-se de um ensaio clínico randomizado duplo-cego que incluiu pacientes adultos com EHNA diagnosticados por biópsia hepática. A intervenção consistiu de 24 semanas de suplementação com um mix de probióticos (*Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium lactis* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus paracasei*, 1×10^9 CFU) ou placebo, duas vezes ao dia. No período basal e após as 24 semanas de tratamento, foram avaliados os seguintes parâmetros: dados clínicos e demográficos, elastografia transitória (FibroScan), enzimas hepáticas, NAFLD *Fibrosis Score*, *Fatty Liver Index*, avaliação laboratorial, concentração sérica de *Toll-Like receptor -4* (TLR-4) e biomarcador *Citokeratin 18* (CK-18). Foi também realizada avaliação antropométrica, atividade física e do consumo alimentar, além de análises da microbiota intestinal através da região hipervariável V4 do gene *16S* rRNA. **Resultados:** Foram 85 pacientes elegíveis, desses, 46 pacientes confirmaram o diagnóstico de EHNA por biópsia hepática e, Quarenta e quatro pacientes completaram o estudo, sendo 59% mulheres, com média de idade de $51,4 \pm 11,6$ anos. No período basal, 87% dos pacientes tinham baixo grau de fibrose (26% F0; 61% F1 através de biópsia), valores de enzimas hepáticas [AST 32 (24-46) U/L, ALT 42 (28-63) U/L, GGT 46 (28-84) U/L], circunferência de cintura aumentada ($104,7 \pm 12$ cm) e IMC com classificação de obesidade $30,97$ ($28,36$ - $33,75$) kg/m^2 , 76% em Síndrome Metabólica (SM). Após 24 semanas de intervenção, não foram observadas diferenças entre os grupos probiótico e placebo nos componentes da SM, circunferência da cintura, IMC, escores e enzimas hepáticas. ($p > 0,05$ para todos). CK-18 reduziu em ambos os grupos após a intervenção: no grupo probiótico de $981,09$ ($738,34$ - $1134,73$) para $639,46$ ($509,50$ - $817,23$) mIU / ml ($p \leq 0,01$) e no grupo placebo de $789,74$ ($540,80$ - $985,65$) para $605,45$ ($472,13$ - $837,22$) mIU / ml ($p = 0,013$), entretanto sem diferença significativa entre os grupos ($p = 0,109$). Da mesma forma, TLR-4 reduziu em ambos os grupos após a intervenção, mas sem diferença entre os grupos ($p = 0,885$). Em relação à microbiota intestinal, não foram observadas diferenças na diversidade e abundância de filos e gêneros no grupo probiótico. Nenhuma outra mudança clinicamente significativa foi

observada nos grupos. **Conclusão:** A intervenção com probióticos por 24 semanas em pacientes com EHNA com baixo grau de fibrose demonstrou ser incapaz de promover alterações significativas na redução de biomarcadores de lesão e inflamação hepática, nas variáveis clínicas e nutricionais, e também na diversidade da microbiota intestinal

Palavras-chave: Doença hepática Gordurosa não alcoólica; Probioticos; *Toll-Like Receptor 4*, *Citokeratin-18*, Síndrome Metabólica, Microbiota

ABSTRACT

Introduction: Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) embraces from simple hepatic steatosis to nonalcoholic steatohepatitis (NASH), which can progress to cirrhosis or hepatocarcinoma. It affects a quarter of the world population and is associated with the obesity epidemic. Considering the increasing prevalence of NASH, and the existing gaps in its treatment, this study aimed to evaluate the effect of probiotic supplementation on liver function markers, and clinical parameters, in NASH patients. **Methods:** This double-blind, randomized clinical trial included adult outpatients with biopsy-proven NASH. The intervention consisted of 24 weeks of supplementation with probiotic mix (*Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium lactis* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus paracasei*, 1×10^9 CFU for each) or placebo, twice a day. At baseline and 24-weeks after treatment, the following parameters were evaluated: demographic and clinical data, transient elastography (FibroScan), hepatic enzymes, NAFLD *fibrosis score*, Fatty Liver Index, laboratory assessment, serum concentration of toll-like receptor-4 (TLR-4) and cytokeratin 18 (CK-18) biomarker. An anthropometric data assessment, dietary intake and physical activity were also carried out, as well as an analysis of the intestinal microbiota through the hypervariable V4 region of the *16S* rRNA gene. **Results:** From the 85 patients eligible, 46 were diagnosed with NASH through hepatic biopsy, and forty-four patients completed the trial (51,4 \pm 11,6 years, 59% women). At baseline, 87% had low hepatic fibrosis degree (26% F0; 61% F1 at biopsy), values of hepatic enzymes close to normal [AST 32 (24-46) U/L, ALT 42 (28-63) U/L, GGT 46 (28-84) U/L], increased waist circumference (104,7 \pm 12 cm), and BMI with obesity classification 30,97 (28,36-33,75) kg/m², and 76% with Metabolic Syndrome (MetS). After 24 weeks of intervention, no differences were observed between the Probiotic and Placebo groups in the components of the MetS, waist circumference, BMI, scores or liver enzymes ($p > 0.05$ for all). CK-18 was reduced in both groups after the intervention: in the probiotic group from 981.09 (738.34-1134.73) to 639.46 (509.50-817.23) mIU / ml ($p \leq <0.01$) and in the placebo group from 789.74 (540.80-985.65) to 605.45 (472.13-837.22) mIU / ml; $p = 0.013$, however with no significant difference between groups ($p = 0.109$). Likewise, TLR-4 was reduced in both groups after the intervention, also with no difference between groups ($p = 0.885$). In terms of gut microbiota (GM) no differences were observed in the diversity or abundance of phylum and genus in probiotic group. No other clinically significant changes were observed in the groups. **Conclusion:** The intervention with probiotics for 24 weeks in

patients with EHNA with low degree of fibrosis demonstrated to be unable to promote significant changes in the reduction of liver injury and inflammation biomarkers, nutritional and clinical parameters, and also in the diversity GM.

KEY WORDS: Non-alcoholic Fatty Liver Disease; Probiotics, Toll-Like Receptor 4, keratin-18, Metabolic Syndrome, Microbiota

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT – Alanina Aminotransferase

AST – Aspartato Aminotransferase

APRI – Índice de proporção Aspartato Aminotransferase para plaquetas

CK-18 - *Citokeratin 18*

DHGNA – Doença hepática gordurosa não alcoólica

EHA - Esteato-hepatite alcoólica

EHNA – Esteato-Hepatite não alcoólica

GGT – Gama Glutamil Transpeptidase

IMC – Índice de Massa Corporal

LPS- lipopolissacarídeo

OMS – Organização Mundial da Saúde

RI – Resistência à Insulina

SM – Síndrome Metabólica

TGI – Trato Gastrointestinal

TLR- 4 - *Toll-Like receptor – 4*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Evolução da doença hepática gordurosa não alcoólica -----12

Figura 2: Probióticos, prebióticos, antibióticos e transplante de microbiota fecal como
abordagem na modulação da microbiota intestinal da doença hepática gordura não alcoólica---
-----18

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e Esteato-hepatite não alcoólica (EHNA)

A DHGNA é caracterizada pelo acúmulo excessivo de lipídios nos hepatócitos, não associado ao consumo de bebidas alcoólicas ou causas secundárias como uso de medicamentos esteatogênicos ou doenças hereditárias. A presença de esteatose hepática pode ser detectada por exames simples de imagem, como ultrassonografia (Chalasani, et al, 2018). A DHGNA compreende desde a esteatose hepática simples até EHNA, forma que pode progredir para cirrose ou hepatocarcinoma (figura 1) (Chalasani, et al, 2018). Atinge aproximadamente 25% da população em geral e sua prevalência está associada com sedentarismo e consumo excessivo de alimentos ultraprocessados, ricos em açúcares e gordura *trans* (Sheka et al,2020; Grgurevice et al,2020).

A EHNA é definida pela presença de infiltração gordurosa em 5% ou mais do parênquima hepático com inflamação e lesão hepatocitária, com ou sem fibrose, sem causas secundárias para o acúmulo de gordura hepática (Chalasani, et al, 2018). A prevalência global diagnosticada por biópsia é de 3 a 6%, com uma tendência de aumento nos próximos anos, dado que é bastante preocupante, uma vez que a EHNA é considerada atualmente uma das principais causas de transplante hepático (Sheka et al,2020; Grgurevice et al.2020). A EHNA está fortemente associada à obesidade e resistência insulínica (RI) sendo considerada a manifestação hepática da Síndrome Metabólica (SM) (Chalasani et al, 2018).

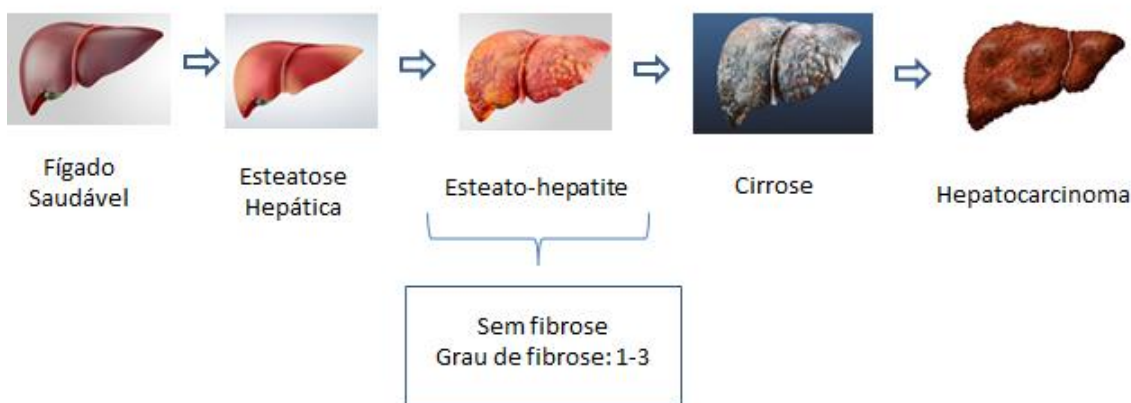


Figura 1 – História natural da Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica

1.1.1 Diagnóstico de DHGNA e EHNA

A biópsia hepática é o padrão ouro para o diagnóstico da EHNA, sendo capaz de refletir de forma confiável a histologia hepática. Ela ainda é considerada um procedimento que tem risco, embora menor nos últimos anos, especialmente quando realizada por profissionais experientes (Chalasani et al,2020).

Na tentativa de encontrar métodos menos invasivos, a *Citokeratin 18* (CK18) foi descrita em 2009 como um biomarcador plausível no diagnóstico de EHNA (Feldstein, et al, 2009; He et al, 2017). O biomarcador foi testado para avaliar a progressão DHGNA, onde foi encontrada uma relação positiva entre aumento de CK-18 e aumento do escore de atividade da DHGNA “*NAFLD activity score*”, assim como os pacientes com melhora no escore da doença tiveram um CK-18 diminuído (Kawanaka, et al, 2015).

Outros métodos, não invasivos, que auxiliam no diagnóstico e monitoramento de pacientes com DHGNA, são: *NAFLD Fibrosis Score*, *APRI score* e *Fat Liver Index* (Angulo P et al, 2007; Kruger, F C et al, 2011; Bedogni, et al, 2006).

A presença de obesidade, diabetes mellitus tipo 2 (DM), SM, história de apneia obstrutiva do sono, presença de RI e elevação crônica das enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) sem outra justificativa podem levar ao diagnóstico de EHNA (WGO, 2014). Histórico detalhado quanto ao consumo de álcool (< 10g/dia para mulheres e < 20 g/dia para homens) deve ser realizado, visto que não há nenhum diagnóstico específico para distinguir a EHNA e esteato-hepatite alcoólica (EHA) (WHO, 2014).

1.1.2 Síndrome Metabólica x DHGNA

A SM pode ser definida como um conjunto de desordens clínicas inter-relacionadas, incluindo obesidade, RI, tolerância diminuída à glicose, hipertensão e dislipidemia (Alberti, et al, 2009). Sua prevalência global está estimada a um quarto da população (Saklayen et al. 2018) No Brasil a prevalência está estimada em 30% da população (Vidigal, C F. et al. 2013)

O aumento da prevalência da SM e suas complicações tais como doenças cardiovasculares, têm sido acompanhados por um aumento de alterações hepáticas incluindo

DHGNA, que é frequentemente associada com a obesidade visceral, RI e dislipidemia (Asrih & Jornayvaz, 2015).

Vários são os fatores que podem contribuir para o desenvolvimento da SM: aumento de peso, tabagismo, sedentarismo, fatores dietéticos, entre outros (Dima-Cozma, et al, 2014; Chalasani et al, 2018; Koopman et al, 2019). A ingestão de alimentos integrais e adequação do consumo de fibras, principalmente solúveis são indicadas para quem apresenta SM (Dima-Cozma, et al, 2014; Steemburgo T, et al, 2007, Dall'Alba, et al, 2013).

A obesidade está fortemente associada a doenças do fígado, especialmente DHGNA, enquanto a perda de peso tem sido associada com melhora da condição hepática (Manne, 2014). Além de um fator de risco para esteatose, a obesidade se mostra fator de risco para progressão da EHNA e cirrose (Ratziu, 2015). Em um estudo brasileiro, indivíduos com DHGNA e obesos, apresentaram mais comorbidades e SM (Soler, 2008). Os casos de desnutrição, normalmente estão restritos a pacientes com doença hepática avançada, especialmente entre os candidatos a transplante (Manne, 2014).

1.1.3 Aspectos nutricionais e recomendações nutricionais na DHGNA

Uma revisão sistemática sobre o padrão dietético de pacientes com DHGNA demonstrou consumo excessivo de carboidratos e bebidas açucaradas, os quais estão também relacionados com evolução da doença. O estudo ainda faz referência a uma ingestão de lipídios e colesterol acima do recomendado, onde o consumo de gordura saturada estaria relacionado com a piora do quadro hepático (Gomes, 2014).

Algumas considerações importantes devem ser priorizadas no tratamento de pacientes com DHGNA: modificações do estilo de vida por meio de mudanças na dieta e incremento da atividade física. Estas medidas podem minimizar fatores de risco cardiovascular, frequentemente vistos em pacientes com EHNA. Além disso, a perda de peso adequada, entre 5 a 10%, também contribui para melhora das condições histopatológicas do parênquima hepático (WGO, 2011; Rinella et al, 2016; Chalasani et al, 2018).

Uma dieta com restrição calórica melhora a esteatose hepática em pacientes com EHNA, entretanto, dietas com modificações no conteúdo de alguns nutrientes têm demonstrado resultados melhores, ou seja, quando pacientes diabéticos são direcionados para uma dieta com baixo teor de carboidratos, estes apresentam melhora na sensibilidade

insulínica. Pacientes com hiperlipidemia, quando tratados com dieta com baixo teor de gordura, apresentam melhora no perfil lipídico. Da mesma forma, pacientes com DHGNA não diabéticos também se beneficiam da dieta com baixo teor de carboidratos para redução de esteatose hepática e inflamação e, no cuidado com a ingestão de colesterol podendo conferir menor risco cardiovascular (Rinella et al, 2016).

O estilo de dieta mediterrânea, composto por uma predominância de ácidos graxos monoinsaturados, contemplando fontes como azeite de oliva, oleaginosas, peixes e frutos do mar, além de ser rica em fibras, com alto consumo de vegetais, frutas e grãos integrais, foi testado em pacientes com DHGNA, conforme relata a revisão de Rinella et al. (2016) demonstrou eficiência na redução de esteatose hepática em 6 meses quando comparada a uma dieta com redução de gordura e carboidrato (Rinella et al, 2016; Chalasani et al, 2018)

As recomendações dietéticas deverão ser individualizadas e se deve procurar atingir déficit de energia de 500-1000 Kcal/dia, dependendo do índice de massa corporal (IMC) do paciente. A gordura total deve ser inferior a 30% do valor total das calorias diárias e o consumo de açúcares refinados deve ser reduzido, e ao contrário, fibras solúveis devem ser aumentadas na dieta e, carboidratos em 40 a 45% da dieta (Chalasani et al, 2018; Rinella et al, 2016)

A ingestão de bebidas e alimentos ricos em frutose e gorduras *trans* deve ser evitada, pois estes alimentos estão associados com RI e desenvolvimento de esteatose hepática, tendo como consequência uma depleção de ATP, lipotoxicidade e expressão do fator de necrose tumoral (TNF) (Simopoulos, et al, 2013).

A relação entre obesidade, Diabetes Mellitus (DM), SM e DHGNA [devido a efeitos da dieta inadequada] com microbiota intestinal tem sido sugerida no desenvolvimento e progressão da doença hepática (Ebrahimzadeh, et al, 2020).

A progressão da DHGNA para EHNA ainda não está elucidada e a ligação entre a microbiota intestinal e o desenvolvimento da obesidade e suas consequências metabólicas tem sido investigada. Pesquisas sugerem que a microbiota está relacionada com a esteatose hepática e inflamação, envolvendo receptores Toll-like, especialmente TLR-4 e citocinas pró-inflamatórias. Nesse sentido, a modulação da microbiota intestinal poderia trazer benefícios aos pacientes portadores de DHGNA (Moschen AR, 2013).

1.2 Microbiota Intestinal

A microbiota intestinal humana é formada por um complexo ecossistema envolvendo aproximadamente de 100 trilhões de microrganismos, que interagem com diversos nutrientes e com células do hospedeiro (Joyce, 2014). Os microrganismos relacionados à microbiota intestinal colonizam a mucosa e consolidam comunidades estáveis com outros microrganismos e o hospedeiro. Entretanto a colonização dos agentes patógenos é transitória, permanecem apenas no período que causa a doença (David et al., 2005). Assim, a microbiota intestinal humana apresenta grande influência no crescimento e nutrição das células epiteliais da mucosa intestinal (Biedermann et al, 2013). É composta por uma microbiota residente denominada indígena ou autóctone, convivendo harmonicamente com o hospedeiro, mostrando-se patógena quando há um desequilíbrio no ecossistema (Mackie et al, 1999).

A microbiota desempenha um efeito importante no desenvolvimento, função e manutenção do TGI por meio de várias maneiras: fortalecendo barreiras físicas da mucosa, estimulando a microcirculação vascular, regulando a produção de IgA secretora, produzindo ácidos graxos de cadeia curta, induzindo peptídeos antimicrobianos, e modulando o sistema imuno inato associado a mucosa. Entretanto, alterações nas comunidades microbianas estão relacionadas ao aparecimento de várias doenças, incluindo doença inflamatória intestinal, obesidade e SM (Santos J et al, 2019).

A DHGNA é uma doença multifatorial, fatores genéticos, inflamatórios e ambientais podem contribuir para sua patogênese. Dentre os fatores ambientais, destaca-se a dieta, a qual exerce importante papel na modulação da microbiota intestinal. A disbiose da microbiota pode contribuir de inúmeras maneiras para o aparecimento da EHNA, por meio da predisposição à obesidade, promoção de RI, alterando o metabolismo da colina e comprometendo a imunidade inata associada a mucosa intestinal (Ebrahimzadeh, et al, 2020).

Além disso, a microbiota intestinal patogênica pode comprometer a digestão e absorção de nutrientes, alterar o metabolismo de ácidos biliares, ativar vias inflamatórias nos enterócitos e hepatócitos, mecanismos relacionados com a patogênese de EHNA (Ebrahimzadeh, et al, 2020).

A microbiota pode influenciar a composição corporal devido a promover maior eficiência energética e aumentar a proporção de calorias obtidas a partir do conteúdo intestinal. Por exemplo, bactérias do tipo *Bacteroides thetaiotamicron*, possuem a capacidade de dividir mais ligações glicosídicas na dieta humana, podendo degradar polissacarídeos

indigestos e fornecer 10 a 15% das necessidades energéticas do hospedeiro (Duarte et al, 2019).

Além disso, as bactérias intestinais apresentam efeito central no metabolismo de ácidos biliares intraluminal, afetando sua fisiologia e conseqüentemente provocando alteração do balanço energético, sendo que os ácidos biliares são essenciais para a absorção e emulsificação das gorduras alimentares e vitaminas lipossolúveis no intestino delgado. Os ácidos biliares estão envolvidos no metabolismo lipídico e energético sendo capazes de reduzir os níveis de triglicerídeos. As conseqüências deste envolvimento incluem modificações na peroxidação lipídica e no armazenamento de ácidos graxos no fígado (Ebrahimzadeh, et al, 2020).

A RI é considerada um importante fator para a patogênese da DHGNA. A microbiota intestinal também tem sido destacada na patogênese da diabetes mellitus tipo 1 (Abu-Shanab, Quigley, 2010). Wen e colaboradores (2008) demonstraram diferença entre a microbiota de ratos destinados a desenvolver DM em relação ao grupo controle, concluindo que a interação da microbiota e imunidade inata foi um fator epigenético predisponente para a evolução da doença nesses animais (Wen et al, 2008).

Vale destacar também que dietas deficientes em colina têm sido associadas com o desenvolvimento e progressão da esteatose hepática. Estudo experimental demonstrou que uma alimentação deficiente em colina por um período de 4 semanas induz DHGNA, assim como níveis elevados das enzimas hepáticas, níveis dos triglicerídeos hepático e peroxidação lipídica (Ebrahimzadeh, et al, 2020). As enzimas produzidas pela microbiota intestinal iniciam um processo de conversão da colina dietética para dimetilamina e trimetilamina (Duseja & Chawla, 2014). Estes metabólitos são absorvidos via microvilosidades e são direcionadas ao fígado por meio da veia porta. (Ebrahimzadeh, et al, 2020).

Uma das vias estudadas como ligação direta entre a microbiota intestinal e a inflamação do fígado e fibrose é a ativação excessiva de *Toll-Like receptor – 4* (TLR-4), observada no parênquima hepático, com conseqüente aumento da inflamação hepática e sistêmica. O primeiro estudo que verificou o polimorfismo do gene de TLR-4 em humanos com DHGNA concluiu que TLR-4 é uma sinalização essencial na patogênese da doença e que a compreensão do mecanismo do gene pode fornecer novas abordagens no manejo da DHGNA (Kizitas, et al. 2014).

O uso de probióticos na redução da ativação da via TLR-4 vem sendo amplamente estudado em doenças do fígado. Um estudo utilizando modelo experimental de esteatose

induzida por frutose, o uso de *Lactobacillus casei shirota* atenuou significativamente a ativação de TLR-4 (Wagnerberger, et al. 2013 Estudo similar recente também demonstrou redução de TLR-4 após suplementação com mix de probióticos em modelo animal (Xue et al, 2017).

A terapêutica de EHNA tem uma ampla gama de alvos em estudos, entre eles a microbiota intestinal (Sheka et al., 2020). Várias abordagens para modular a microbiota vêm sendo descritas, incluindo dieta, probióticos, prebióticos, antibióticos e transplante de microbiota fecal (FMT) (Figura 2) (Bluemel et al, 2016).

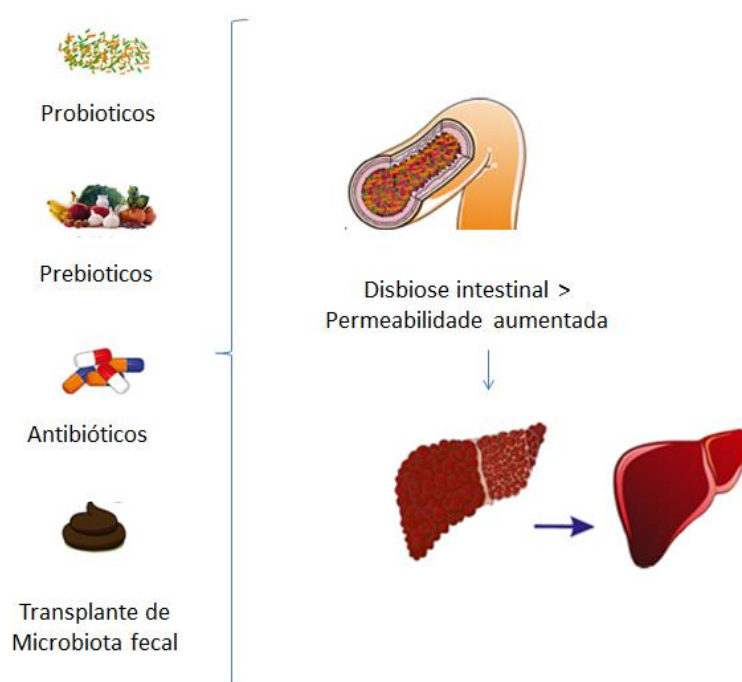


Figura 2: Probióticos, prebióticos, antibióticos e transplantes de microbiota fecal como abordagem na modulação da microbiota intestinal da Doença hepática Gordura Não Alcoólica

1.3 Probióticos

Os probióticos competem com bactérias patogênicas, podendo promover mudanças na composição de filos dominantes, restaurar/reconstituir a função da barreira intestinal promovendo a imunomodulação (Ebrahimzadeh, et al, 2020).

Os probióticos são caracterizados por microorganismos vivos que podem ser inseridos no preparo de diversos alimentos, produtos, suplementos dietéticos e medicamentos (WHO, 2014) e quando consumidos em quantidade suficientes tornam-se benéficos ao hospedeiro (Jain et al, 2014). São classificados como organismos não patogênicos que podem exercer uma influência benéfica ao indivíduo e modular o trato gastrointestinal (TGI). Microorganismos vivos nos alimentos ou na forma de suplemento tendem a melhorar a microbiota intestinal (Jain, et al, 2014). Os gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, são amplamente utilizados como probióticos, pois estas bactérias podem inibir a expansão de bactérias patogênicas Gram-negativas por meio da produção de ácido lático e outras substâncias antimicrobianas (Miura & Jain, 2014).

O gênero *Lactobacillus*, possui 56 espécies, sendo as mais utilizadas *L. acidophilus*, *L. rhamnusus* e *L. casei*. Estas bactérias são encontradas por todo TGI, compondo uma significativa parte da microbiota de homens e animais. Sabe-se que o *Lactobacillus rhamnusus* GG (LGG) pode prevenir em células Caco-2bbe a disfunção da barreira intestinal causada por reações inflamatórias e reduzir a inflamação intestinal e diarreia (Raizel et al, 2011).

Os ensaios clínicos com probióticos em DHGNA são bastante heterogêneos do ponto de vista de tempo de intervenção e principalmente por utilizarem diferentes cepas de bactérias (Brussow et al. 2019). Estudo realizado com pacientes portadores de DHGNA, que foram tratados com probiótico *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* por 3 meses, demonstrou redução significativa de AST, ALT e GGT, em relação ao grupo placebo (Aller et al, 2011) A suplementação com um simbiótico com múltiplas cepas (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Streptococcus thermophilus* e frutooligosacarídeos) por um período de 6 meses foi capaz de reduzir as enzimas hepáticas e grau de esteatose avaliado por ultrassonografia em pacientes diabéticos. (Shavakhi et al, 2013). Em outro estudo, também com pacientes com EHNA comprovada por biópsia, a suplementação de probiótico contendo lactobacilos e bifidobactérias, promoveu melhora da esteatose hepática e redução de AST após 6 meses de tratamento (Wong et al, 2013).

Eslamparast e colaboradores (2014) analisaram o efeito da suplementação com simbiótico contendo *Lactobacillus rhamnosus*, por 28 semanas em 52 pacientes com DHGNA e demonstraram uma redução significativa das enzimas hepáticas, além da redução do escore de fibrose avaliado por elastografia hepática no grupo intervenção

Estudos experimentais também sugerem que o probiótico poderia ser pensado como uma opção terapêutica na DHGNA. A suplementação com LGG em ratos num modelo de esteatose induzido por frutose promoveu redução de lipopolissacarídeo (LPS) atenuando a expressão gênica de *Tnf- α* , *Il-8R* e *Il-1B* no fígado. Além disso, o acúmulo de gordura no fígado e a concentração de AST também reduziram (Ritze, 2014). Em nosso grupo, no Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, já foi avaliado o efeito do probiótico LGG em um modelo de esteatose induzida por etanol em zebrafish, sendo observada uma redução dos níveis séricos de triglicerídeos, colesterol e esteatose hepática nos animais tratados (Schneider, 2014).

No estudo de Vajro e colaboradores (2011), crianças portadoras de doença hepática relacionada com a obesidade, foram submetidas à suplementação de LGG por oito semanas, ao final do estudo houve redução significativa de AST, quando comparado ao grupo placebo. Entretanto, a suplementação por oito semanas não foi suficiente para demonstrar diferença significativa em parâmetros antropométricos, nem na gordura visceral e TNF- α . (Varjo, 2011)

2. JUSTIFICATIVA

A EHNA é considerada uma das principais causas de indicação de transplante hepático. O tratamento tem como objetivo impedir ou retardar a progressão da doença e uma vez que atualmente nenhum fármaco ou tratamento tenham apresentado efeito que possa atenuar todos os mecanismos. Os componentes da doença são tratados separadamente com foco na normalização da glicemia, níveis de lipídios séricos, manejo da obesidade e pressão arterial, entre outros. Adicionalmente, a modulação da microbiota intestinal por meio do uso de probióticos, poderia conferir uma redução na inflamação presente nesses pacientes e consequentemente, representar uma opção terapêutica adjuvante. Além disso, atualmente poucos estudos disponíveis na literatura avaliaram o uso de probióticos em pacientes com EHNA, especialmente os que avaliaram a microbiota intestinal.

3. QUESTÃO DA PESQUISA

A suplementação com probióticos por 24 semanas pode modular a microbiota intestinal de pacientes com EHNA e assim conferir melhora em parâmetros hepáticos e clínicos?

4. HIPÓTESES

Hipótese nula

A suplementação com probióticos por 24 semanas não pode modular a microbiota intestinal de pacientes com EHNA, portanto não irá conferir melhora em parâmetros hepáticos e clínicos.

Hipótese verdadeira

A suplementação com probióticos por 24 semanas pode modular a microbiota intestinal de pacientes com EHNA e assim conferir melhora em parâmetros hepáticos e clínicos.

5. OBJETIVOS

Principal: Avaliar o efeito da suplementação com probióticos por 24 semanas em pacientes com EHNA em parâmetros hepáticos de fibrose e esteatose e na composição da microbiota intestinal.

Secundários:

Avaliar se a suplementação com probióticos por 24 semanas em pacientes com EHNA é capaz de promover alterações em:

- enzimas hepáticas
- escores: *NAFLD Fibrosis Score*, *APRI Score* e *Fat Liver Index*
- Biomarcador CK-18
- Concentração sérica de TLR-4
- componentes da Síndrome Metabólica

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abu-Shanab A, Quigley EMM. The role of the gut microbiota in nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2010;7:691–701.

Alberti, KGMM. et al., Harmonizing the Metabolic Syndrome: A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation.* 2009;120:1640-1645.

Angulo P, Hui JM, Marchesini G, Bugianesi E, George J, Farrell GC, Enders F, Saksena S, Burt AD, Bida JP, Lindor K, Sanderson SO, Lenzi M, Adams LA, Kench J, Therneau TM, Day CP. The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology* 2007; 45: 846-854 [PMID: 17393509]

Ariel E. Feldstein, Anna Wieckowska, A. Rocio Lopez, Yao-Chang Liu McCullough AJ. Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarker for nonalcoholic steatohepatitis: A multicenter validation study. *Hepatology.* 2009;50(4):1072-1078. Kawanaka M, Nishino K, Nakamura J, et al. correlation between serum cytotkeration-18 and the progression or regression of non-alcoholic fatty disease. *Ann Hepatol.* 2015;14(6):837-844.

Asrih M, Jornayvaz FR. Metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease: Is insulin resistance the link? *Mol Cell Endocrinol*, doi: 10.1016/j.mce.2015.02.018 .

Bedogni, et al. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterology.* 2006; 6:33

Biedermann L, Zeitz J, Mwynyi J, Sutter-Minder E, Rehman A, Ott SJ, et al. Smoking cessation induces profound changes in the composition of the intestine al microbiota in humans. *Plos One*, 2013;8:1-8.

Bluemel S, Williams B, Knight R, Schnabl B. Precision medicine in alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease via modulating the gut microbiota. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 311: G1018–G1036, 2016.

Bruch JP, Álvares-da-Silva MR, Alves BC, Dall’Alba V. Reduced hand grip strength in overweight and obese chronic hepatitis C patients. *Arq Gastroenterol.* 2016; Vol 53

Brüssow, H.; Reid, G. Probiotics and prebiotics in clinical tests : an update [version 1 ; peer review : 2 approved]. *F1000Research (F1000 Faculty Rev)*., v. 8, p. 1–9, 2019.

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.

Dall’Alba V, Silva FM, Antonio JP, Steemburgo T, Royer CP, Almeida JC, Gross JL, Azevedo MJ. Improvement of the metabolic syndrome profile by soluble fibre - guar gum - in

patients with type 2 diabetes: a randomised clinical trial. *Br J Nutr.* 2013 Nov 14;110:1601-1610.

David CL, Paul SC, Tyrrell C. Role of the mucus layer in bacterial colonization of the intestine. In: *Colonization of Mucosa Surfaces.* Whashington, DC: ASM Press 2005;15: 199-212.

Dima-Cozma C, Gavriluță C, Mitrea G, Cojocaru DC. The importance of healthy lifestyle in modern society: a medical, social and spiritual perspective. *Eur J Sci Theol.* 2014;10:111-120.

Duarte SMB, Stefano JT, Oliveira CP. Microbiota and nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis (NAFLD/NASH). *Ann Hepatol [Internet].* 2019;18(3):416–21. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aohep.2019.04.006>

Duseja A; Chawla YK. Obesity and NAFLD The Role of Bacteria and Microbiota. *Clin Liver Dis* 2014;18:59–71.

Ebrahimzadeh Leylabadlo H, Ghotaslou R, Samadi Kafil H, Feizabadi MM, Moaddab SY, Farajnia S, et al. Non-alcoholic fatty liver diseases: from role of gut microbiota to microbial-based therapies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019;613–27.

Eslamparast T, Poustchi H, Zamani F, Sharafkhan M, Malekzadeh R, Hekmatdoost A. Synbiotic supplementation in nonalcoholic fatty liver disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Am J Clin Nutr* 2014;99:535–42

Gomes, A C S; Jardim B J; Alves, M A R. Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica e Síndrome Metabólica: aspectos nutricionais. *Universidade Unigranrio – Almanaque Multidisciplinar de Pesquisa.* 2014; 1 (2): 76-86

Grgurevic I, Podrug K, Mikolasevic I, Kukla M, Madir A, Tsochatzis EA. Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Implications for Clinical Practice and an Individualized Approach. *Can J Gastroenterol Hepatol.* 2020;2020:5–7.

He L, Deng L, Zhang Q, Guo J, Zhou J, Song W, et al. Diagnostic Value of CK-18 , FGF-21 , and Related Biomarker Panel in Nonalcoholic Fatty Liver Disease : A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomed Res Int.* 2017;2017.

Joyce SA, Gahan CGM. The gut microbiota and the metabolic health of the host. *Curr Opin Gastroenterol.* 2014;30(2):120–7.

Jain M, Gupta K, Jain P. Significance of Probiotics and Prebiotics in Health and Nutrition. *Malaya Journal of Biosciences.* 2014;1:181–195.

Kiziltas, et al. TLR4 Gene Polymorphism in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Comparison to Healthy Controls. *Metabolic syndrome and related disorders,* 2014; 12 (3): 165 – 170

Kruger FC, Daniels CR, Kidd M, Swart G, Brundyn K, van Rensburg C, Kotze M. APRI: a simple bedside marker for advanced fibrosis that can avoid liver biopsy in patients with NAFLD/NASH. *S Afr Med J* 2011; 101: 477-480 [PMID: 21920102]

- Koopman N, Molinaro A, Nieuwdorp M, Holleboom AG. Review article: can bugs be drugs? The potential of probiotics and prebiotics as treatment for non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2019;50(6):628–39.
- Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr.* 1999;69:1035-1045.
- Manne V, Saab S. Impact of Nutrition and Obesity on Chronic Liver Disease. *Clin Liver Dis.* 2014;18:205–218.
- Meroni M, Longo M, Dongiovanni P. The role of probiotics in nonalcoholic fatty liver disease: A new insight into therapeutic strategies. *Nutrients.* 2019;11(11):1–24.
- Miura K, Jain H. Role of gut microbiota and Toll-like receptors in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2014; 20: 7381–7391.
- Moschen AR, Kaser S, Tilg H. Non-alcoholic steatohepatitis: a microbiota-driven disease. 2013:1-9.
- Promrat K, Kleiner DE, Niemeier HM, Jackvony E, Kearns M, Wands JR, Fava JL, Wing RR. Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2010;51:121-129.
- Ratziu V, Goodman Z, Sanyal A. Current Efforts and trends in the treatment in NASH. *Journal of Hepatology.* 2015;62:565-575
- Raizel R, Santini E, Kopper AM, Reis Filho AD. Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. *Revista Ciência & Saúde,* 2011; 4: 66-74.
- Rafiq N, Younossi ZM. Nonalcoholic fatty liver disease: a practical approach to evaluation and management. *Clin Liver Dis.* 2009;13:249–266.
- Rinella E, Mary; Sanyal, J Arun. Management of NAFLD: a stage-based approach. *Nature Reviews Gastroenterol and Hepatology.* 2016; 13: 196-215
- Ritze Y, Bárdos G, Claus A, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG Protects against alcoholic fatty liver disease in mice. *PLoS One.* 2014;9(1):1-9. doi:10.1371/journal.pone.0080169.
- Samuel BS; Gordon, JI. A humanized gnotobiotic mouse model of host-archaeobacterial mutualism. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2006; 103:10011–10016.
- Saklayen G M. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Current Hypertension Reports* (2018) 20:12
- Santos JG, Alves BC, Hammes TO, Alba VD. Dietary interventions , intestinal microenvironment , and obesity : a systematic review. *Nutr Rev.* 2019;0(0):1–13.

Sanyal AJ, Chalasani N. Trials and Tribulations in Drug Development for nonalcoholic Steatohepatitis. *Clin Gastroenterol e Hepatol.* 2014;12:2104–2105.

Schneider ACR, Machado ABMP, de Assis AM, et al. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on hepatic and serum lipid profiles in zebrafish exposed to ethanol. *Zebrafish.* 2014;11(4):371-378. doi:10.1089/zeb.2013.0968.

Sheka AC, Adeyi O, Thompson J, Hameed B, Crawford PA, Ikramuddin S. Nonalcoholic Steatohepatitis: A Review. *Jama.* 2020;323(12):1175–83.

Soler, G.L Nogueira. Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica: associação com síndrome metabólica e fatores de risco cardiovascular. *Socerbj,* 2008; 21(2): 94-100

Simopoulos AP. Dietary omega3fatty acid deficiency and high fructose intake in the development of metabolic syndrome, brain metabolic abnormalities, and nonalcoholic fatty liver disease. *Nutrients* 2013; 5: 2901–2923.

Steemburgo T, Dall'Alba V, Gross JL, Azevedo MJ. Dietary factors and metabolic syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2007;51:1425-1433.

Vajro P, Mandato C, Licenziati MR, et al. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in pediatric obesity-related liver disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2011;52(6):740-743. doi:10.1097/MPG.0b013e31821f9b85.

Vidigal, C F. et al, Bressan J, Babio N, Salas-Salvadó J. Prevalence of metabolic syndrome in Brazilian adults: a systematic review. *BMC Public Health* 2013, 13:1198

Wagnerberger S, Spruss A, Kanuri G, et al. *Lactobacillus casei* Shirota protects fructose-induced liver steatosis: a mouse model. *J Nutr Biochem.* 2013;24(3):531-538. doi:10.1016/j.jnutbio.2012.01.014.

Wen L, Ley RE, Volchkov PY, Stranges PB, Avanesyan L, Stonebraker AC, et al. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of type 1 diabetes. *Nature* 2008; 455: 1109–1113.

WGO Practice Guideline - Probiotics and Prebiotics. Title: Probiotics and Prebiotics - October 2011.

Wong VW, Won GL, Chim AM et al. Treatment of nonalcoholic steatohepatitis with probiotics. A proof-of-concept study. *Ann. Hepatol.* 2013; 12: 256–262.

World Health Organization - WHO. Obesity and Overweight. [online] 2013. [cited 2013 May 15]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.

Xue L, He J, Gao N, Lu X, Li M, Wu X, et al. Probiotics may delay the progression of nonalcoholic fatty liver disease by restoring the gut microbiota structure and improving intestinal endotoxemia. *Nat Sci Reports.* 2017;(March):1–13.

6. ARTIGO CIENTÍFICO 1: Effect of probiotic supplementation in nonalcoholic steatohepatitis patients: PROBILIVER TRIAL protocol

Revista: Trials

Identificação: 1797006537202005

Status: Publicado

STUDY PROTOCOL

Open Access

Effect of probiotic supplementation in nonalcoholic steatohepatitis patients: PROBILIVER TRIAL protocol



Amanda Souza Silva-Sperb^{1*}, Helena Abadie Moraes¹, Bruna Concheski de Moura¹, Bruna Cherubini Alves¹, Juliana Paula Bruch-Bertani², Vittoria Zambon Azevedo³ and Valesca Dall'Alba^{1,3,4,5}

Abstract

Background: Recently factors in the relationship between gut microbiota, obesity, diabetes and the metabolic syndrome have been suggested in the development and progression of nonalcoholic steatohepatitis (NASH). In this sense, this work aims to evaluate the effects of probiotic supplementation on intestinal microbiota modulation, degree of hepatic steatosis and fibrosis, inflammation, gut permeability, and body composition.

Methods: This double-blind, randomized clinical trial will include adult outpatients with a diagnosis of NASH confirmed by biopsy with or without transient elastography. All patients will undergo a complete anamnesis to investigate their alcohol consumption, previous history, medications, nutritional assessment (dietary intake and body composition), sarcopenia, physical activity level and physical and functional capacity, cardiovascular risk, biochemical parameters for assessment of inflammatory status, lipid profile, hepatic function, gut permeability, and assessment of microbiota. These procedures will be performed at baseline and repeated after 24 weeks (at the end of the study). Through the process of randomization, patients will be allocated to receive treatment A or treatment B. Both patients and researchers involved will be blinded (double-blind study). The intervention consists of treatment with a probiotic mix (*Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium lactis* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus paracasei*, 1 x 10⁹ CFU for each) and the placebo which is identical in all its characteristics and packaging. Patients will be instructed to consume two sachets/day during 24 weeks and to report any symptoms or side effects related to the use of the sachets. Adherence control will be carried out through the patient's notes on a form provided, and also by checking the number of sachets used.

Discussion: The final results of study will be analyzed and disseminated in 2020.

Trial registration: ClinicalTrials.gov, ID: [NCT03467282](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03467282). Registered on 15 March 2018.

Keywords: Non-alcoholic fatty-liver disease, Probiotic, Sarcopenia, Inflammation, Microbiota, Permeability

Background

According to the American Association for the Study of Liver Diseases, non-alcoholic fatty-liver disease (NAFLD) is defined as the presence of steatosis, confirmed by imaging or histology, and not caused by significant alcohol consumption, long-term use of a steatogenic medication, or a

monogenic hereditary disorder. Histologically, NAFLD can be categorized into nonalcoholic fatty liver (NAFL) or non-alcoholic steatohepatitis (NASH), defined as the presence of $\geq 5\%$ of steatosis and inflammation with hepatocyte injury, with or without fibrosis [1]. By being highly associated with metabolic comorbidities, such as obesity, diabetes mellitus, and dyslipidemia, NAFLD is considered a hepatic manifestation of the metabolic syndrome [2, 3].

The global prevalence of NAFLD diagnosed by imaging is estimated at around 25% [4]. This liver disease is positively related to the epidemic of obesity, and

* Correspondence: amandasilva_nutricionista@yahoo.com.br

¹Graduate Program: Sciences of Gastroenterology and Hepatology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Ramiro Barcelos 2400 - 2nd floor, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



metabolic diseases. When NASH is diagnosed via liver biopsy, a procedure not always feasible in the studies, the estimated prevalence in the general population varies from between 1.5 and 6.4%. Patients with NASH with a higher degree of fibrosis and concurrent metabolic diseases, such as diabetes, hypertension, visceral obesity, and dyslipidemia, present a higher mortality risk. Therefore, patients with this profile have a greater requirement for treatment [1].

The gut microbiota seems to be related to NAFLD/NASH by contributing to intestinal permeability and choline-metabolism disturbance, endogenous-alcohol production, inflammatory cytokine release, and hepatic Toll-like receptor (TLR) regulation. Moreover, some studies have suggested that patients with NASH have a different microbiota composition than patients without the disease [5].

Microbiota dysbiosis is related to dysfunction of the intestinal barrier, increasing its permeability and exposing the liver to microbial translocation [6, 7]. The increased permeability allows the passage of products from the gut microbiota into the portal circulation, stimulating an inflammatory cascade and favoring the development of NASH, hepatic fibrosis, and hepatocellular carcinoma [8–10]. The relation of the intestine-liver axis in an environment of increased intestinal permeability seems to play an important role in the pathogenic mechanism of NASH. Several studies have documented the progression of NASH related to increased intestinal permeability [6, 8, 11–14].

Also, it has been described that the gut microbiota is related to liver steatosis and inflammation involving TLR, especially TLR-4, and proinflammatory cytokines [15]. Experimental studies lead us to believe that probiotics could be considered a therapeutic option in NAFLD. In our group, the effect of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) on a model of alcohol steatosis in zebrafish was evaluated. A reduction of serum triglycerides, cholesterol, and hepatic steatosis levels was observed in treated animals [16]. There are already clinical trials that demonstrate the benefit of probiotic supplementation by reducing liver enzyme levels, steatosis severity (measured by the Fatty Liver Index), and proinflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor alpha (TNF α) and interleukin (IL)-6, and also improve the lipid profile [17–21]. However, these studies are very heterogeneous in terms of the intervention time and the strains of bacteria involved.

Another concern in NAFLD is the relationship with sarcopenia [22–24], characterized by the loss of skeletal muscle mass, muscle strength and physical performance, with adverse risks [25]. Lee et al. [24] highlight that individuals with sarcopenia have a higher risk of NAFLD and liver fibrosis development. Wijarnprecha et al. [26]

and Bindels et al. [27] suggest a relationship between muscle loss and changes in gut microbiota. The authors suggest that the modulated microbiota may act on muscle physiology through amino-acid changes, influencing metabolites, such as bile acids, and modulate the production of proinflammatory cytokines, an effect correlated with an improvement in the markers of skeletal-muscle atrophy.

Currently, there is no broad-spectrum drug to treat NASH, so, to prevent or delay the progression of liver disease, the associated comorbidities must be treated separately. However, we believe that modulating the microbiota through probiotic supplementation could confer benefit on NASH, especially by reducing inflammation, and thus becoming an adjunct therapeutic option. In this context, we have designed a randomized clinical trial in order to evaluate the effect of probiotic supplementation on microbiota and in the course of NASH.

Methods

Study setting

This is a single-center, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial that will include adult subjects with NASH treated at an outpatient clinic of the Nutrition and Dietetic Division of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. The present protocol was written in accordance with Standard Protocol Items: Recommendations for Interventional Trials (SPIRIT) guidelines and completing the SPIRIT Checklist [28] (Additional file 1).

Eligibility criteria

Inclusion criteria: adult subjects diagnosed with NASH, with or without fibrosis, by liver biopsy.

Exclusion criteria: patients with human immunodeficiency virus, hepatitis B virus or hepatitis C virus infection; a significant intake of alcohol; cirrhosis; pregnancy; liver transplantation; supplements and foods with probiotics; use of immunosuppressant, antibiotic, and corticosteroid drugs, and valproic acid and amiodarone, and with any other chronic inflammatory diseases.

Interventions

The patients will be randomized to an intervention group (probiotic) or a control group (placebo). Patients allocated to the intervention group will receive probiotic supplementation which consists of a 1-g sachet containing *Lactobacillus acidophilus* SD5221 (1×10^9 CFU) + *Lactobacillus rhamnosus* SD5675 (1×10^9 CFU) + *Lactobacillus paracasei* SD5275 (1×10^9 CFU) + *Bifidobacterium lactis* SD5674 (1×10^9 CFU), while those allocated to the control group will receive a 1-g sachet with an identical appearance (physical and organoleptic) containing polydextrose/maltodextrin as the placebo. Patients

will be instructed to ingest two sachets daily with water at room temperature for a period of 24 weeks.

The patients will receive a spreadsheet to mark the intake of the sachets and write down any symptoms that may appear during the intervention period. Every 45 days, patients will be seen and adherence to treatment will be evaluated through the spreadsheet and by counting the sachets that were not consumed.

The participants will be instructed to advise the research team about the need to use any other non-routine medications, as some medications may alter the intestinal microbiota, and also to inform the team when they use a product that contains probiotics.

Randomization

The randomization will be performed through a simple, sequential, randomization plan generated online (using the randomization.com website).

Outcomes

Primary outcome:

- Modification in fibrosis level by elastography scores

Secondary outcomes:

- Gut microbiota diversity assessed by metagenomic analysis
- Intestinal permeability assessed by claudin-3 and lipopolysaccharide (LPS) levels
- Inflammatory response evaluated by *TLR-4* gene expression and biomarker cytokeratin 18 (CK-18) and C-reactive protein (CRP) levels
- Components of the metabolic syndrome evaluated by anthropometry and laboratorial assessment
- Modifications in the parameters of sarcopenia evaluated by Dual-energy X-ray Absorptiometry (DEXA), bioelectrical impedance analysis (BIA), physical capacity, and myostatin, a negative regulator of muscle growth, and testosterone levels

Participant timeline

The participant timeline is presented in Fig. 1.

Sample size

The sample size estimation was carried out in WINPEPI 11.20 (Brixton Health, Israel), based on data from Eslam-parast et al. [29] that found a mean reduction in fibrosis score of 9.36 ± 1.9 to 6.38 ± 1.5 in NAFLD patients taking symbiotic supplementation ($P < 0.001$, compared to placebo). Thus, considering a power of 90% and a significance of 5%, adding 10% to compensate for eventual losses, it will be necessary to include 46 patients with NAFLD in the present study.

Recruitment

Potentially eligible patients will be identified in the everyday clinical practice of the research staff, or referred to them for assessment of eligibility having been identified by clinical staff who are not research staff. Medical records will be checked to identify any other potentially eligible patients. The patient's eligibility will be confirmed by the responsible researcher. After confirmation, any patient who agrees to participate in the research must sign the informed consent to begin participation.

Allocation

Patients will be allocated to group A or group B, in a numerical sequence from 1 to 46 generated using the randomization.com website. The list will be in the possession of the researchers responsible for recruitment, but only the external investigator will have access to which patients are receiving probiotic or placebo. Delivery of the supplementation will be made to the participants according to the list generated by researchers and will be communicated to the external researcher in the sequence on the list. The products are stored in boxes identified according to the researchers' randomization list. The allocation sequence was generated, and will be administered, by the external researcher and the participants will be included and referred to the procedures by the other researchers.

Blinding

Patients and the researchers administering the study will not know the composition of each sachet of supplements and the participant's allocation treatment. An external researcher will be unblinded. Researchers will know which supplements each participant received only at the end of the study. The external researcher will be informed about the composition of each supplement if needed.

Data collection methods

The evaluations will be carried out by three trained researchers: two registered nutritionist dietitians and one undergraduate student.

Clinical evaluation

The data collection protocol includes demographic data, clinical diagnosis and diagnostic methods, medications in use, alcohol consumption, smoking status, and blood pressure measurement. In addition, details of the disease diagnosis (liver biopsy and transient elastography) are recorded.

Diagnosis

The patients were, or will be, diagnosed with NASH by liver biopsy, which is the gold standard procedure.

Week	STUDY PERIOD					
	Enrolment	Baseline	Post-allocation			Close-out
	0	0	6	12	18	24
ENROLMENT:						
Eligibility screen	X					
Informed consent	X					
Randomization	X					
Allocation		X				
INTERVENTIONS:						
<i>Probiotic</i>		X	X	X	X	X
<i>Placebo</i>		X	X	X	X	X
ASSESSMENTS:						
<i>Nutritional</i>		X	X	X	X	X
<i>Sarcopenia</i>		X				X
<i>Physical activity</i>		X				X
<i>Laboratory</i>		X				X
<i>Cardiovascular</i>		X				X
<i>Microbiota Assessment</i>		X				X
<i>Fibrosis</i>	X					X

Fig. 1 Schedule of enrollment, interventions, and assessments

Biopsies were, or will be, performed at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) or another institution, requested in the outpatient clinic as needed and medically indicated. The procedure is invasive and requires some care, but the recovery is fast. A fragment of liver is removed for analysis and used for classification as not NAFLD (< 5% of hepatic steatosis), NAFL ($\geq 5\%$ of hepatic steatosis without evidence of hepatocellular injury in the form of hepatocyte ballooning), and NASH ($\geq 5\%$ of hepatic steatosis and inflammation with hepatocyte injury, with or without any fibrosis). Liver biopsy results are also scored by the NAFLD Activity Score (NAS), which is a tool for measuring change in liver histology [1].

Hepatic structure and functional assessment

Liver fibrosis will be assessed by transient elastography (FibroScan). The Controlled Attenuation Parameter (CAP) is a tool based on the FibroScan, used for the detection and quantification of liver steatosis. The elastic wave propagates through the liver at a certain rate dependent on hepatic stiffness (fibrosis). The higher the

velocity, the greater the stiffness, measured in kilopascals (kPa), and the greater the extent of the fibrosis. The median is considered the most representative value, being the immediate result, and is numerical and expressed in kPa [30].

In addition, blood samples will be collected for the evaluation of the genetic expression of biomarker *TRL4*, and CK-18, which are directly associated to liver inflammation.

Scores

The NAFLD Fibrosis Score, APRI Score and Fatty Liver Index [31–33] are useful tools for the diagnosis and monitoring of patients with NAFLD. The NAFLD Fibrosis Score is based on the following parameters: age, Body Mass Index (BMI), whether type-2 diabetes mellitus or impaired fasting glucose, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, and platelet and albumin levels, while the APRI Score includes the aspartate aminotransferase level and platelet count. The Fatty Liver Index diagnoses fatty liver using laboratory parameters (alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase,

gamma glutamyl transferase, glucose, insulin, triglycerides, cholesterol levels), and clinical (gender, age, alcohol intake) and anthropometric (waist circumference, triceps, biceps, subscapular and supra-iliac skinfolds) findings. The scores will be calculated via an online calculator (MDCalc.com).

Microbiota assessment

For the microbiota assessment, the patients will be instructed to collect a stool sample within 24 h prior to their next visit (baseline and close-out) using a disposable pad and sterile paddle pot. Samples will be immediately frozen in the patient's own freezer. On the day of the consultation, the patient will transport the sample to the research center using cooling elements and a styro-foam box. Afterwards, samples will be stored at -80°C until analysis.

For intestinal microbiota assessment, the bacterial deoxyribonucleic acid (DNA) will be extracted from the feces using the QIAmp DNA Stool Mini kit (Qiagen, São Paulo, Brazil). Extracted DNA will be kept at -20°C until the moment of use. Approximately 50 ng DNA will be used for amplification of the V4 hypervariable region of the bacterial *16S* rRNA gene by polymerase chain reaction (PCR). The resulting product will be purified and used in the preparation of the emulsion PCR, followed by the sequencing reaction in the Ion Torrent Personal Genome Machine (Life Technologies, São Paulo, Brazil). The sequencing data will be processed using QIIME software. Bacterial-diversity analyses will be based on the degree of similarity between *16S* rRNA sequences which are grouped into Operational Taxonomic Units (OTUs). Sequencing and analysis will be performed at the HCPA Protein Analysis Unit (UAMP).

Intestinal-permeability assessment

Intestinal permeability will be evaluated by the serum quantification of claudin-3 and LPS biomarkers. From blood samples, serum will be obtained by centrifugation and stored at -80°C . The quantification of the biological markers will be performed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the manufacturer's instructions.

Sarcopenia

Sarcopenia will be determined following the European Consensus [25] considering muscle mass, muscle strength, and physical performance.

Muscle mass will be measured by the body composition assessment. DEXA (The GE Medical Systems Lunar Prodigy densitometer, Chicago, IL, USA) will be used for body-composition assessment. Fat and lean masses will be determined for the whole body and for body regions (trunk and limbs), as previously described [34]. Electrical

bioimpedance (Biodynamics450[®], Plainview, NY, USA) will be used to measure the percentage of fat, lean mass, and phase angle. Patients should be fasting for 4 h, not drink alcohol and/or caffeine, not have exercised in the last 12 h, not take diuretics the day before the test, not have a pacemaker in situ, and not be pregnant or menstruating. Patients will be questioned about the presence of significant diarrhea at the time of the examination to exclude the possibility of dehydration [35].

Muscle strength will be evaluated by the handgrip strength (dynamometry). Patients should be seated with their elbow flexed at 90° to hold the dynamometer (Jamar, Duluth, MN, USA) at its maximum strength for 3 s. There will be three repetitions with an interval of 1 min with the dominant hand. The highest strength will be recorded in kgF for classification [36].

Physical performance will be assessed through three different tests: the Five-times sit-to-stand test (FTSTS), the Usual Gait Speed test, and the Unipedal Stance test. The FTSTS test will be performed using a chair leaning against the wall. Initially, participants will be instructed to sit without assistance with their arms crossed in front of the body. If the patient demonstrates being able to perform this task they will be instructed to repeat the test five times, as close together as possible. The test performance will be measured by the time spent running the test [37]. To perform the Usual Gait Speed test the participant must walk a distance of 10 m in a straight line. The time taken to complete the course will be divided by the distance, providing the measure of the speed of the march (m/s). The test will be performed three times and the first and last 2 m will be excluded to discount the acceleration and deceleration phases. Participants will be asked to walk at their normal pace, even using walking aids and no incentive or instruction will be given in order to not influence the results [38]. A speed lower than 0.8 m/s will be considered as risk for sarcopenia [39, 40]. The Unipedal Stance test will be performed to evaluate the patient's balance. Participants will be instructed to place their hands on their waist and raise one of their legs (chosen by the participant themselves) by flexing the knee and balancing on only one foot for a maximum of 30 s or until the individual becomes unbalanced. The test will be repeated three times and the longest time will be considered [41].

A blood sample will also be collected for the evaluation of testosterone, insulin-like growth factor 1 (IGF-1), and myostatin.

Physical-activity assessment

The International Physical Activity Questionnaire – Short Form (IPAQ) will be applied to evaluate the weekly time spent in physical exercise.

Cardiovascular-risk assessment

Cardiovascular risk will be estimated by the Framingham Risk Score [42] and the Atherosclerotic Cardiovascular Disease (ASCVD) risk calculator [43].

All data will be included in the database filled out by the researchers, as well as in a physical agenda to log the attendance frequency of the participants. The patients will be contacted to be reminded about the guidelines and to confirm the visits. Subjects who discontinue treatment will also have their data treated at the end of this study.

Laboratory assessment

Laboratory assessment will consist of a liver function test (aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, gamma glutamyl transferase, bilirubin, alkaline phosphatase), a lipid profile (triglycerides, total cholesterol, HDL-cholesterol, non-HDL cholesterol, and LDL-cholesterol) and the levels of other relevant indices such as CRP, insulin, glucose, glycated hemoglobin, HOMA-IR, albumin, creatinine, and a blood count. Serum will be obtained by centrifugation and stored at -80°C . Quantification of the biomarkers will be performed by ELISA according to the manufacturer's instructions.

Nutritional assessment

The anthropometric assessment will include the measurements of weight and height for calculating BMI, waist circumference between the twelfth rib and the iliac crest with an inextensible fiberglass tape measure, and tricipital, bicipital, subscapular and supra-iliac skin folds using a Lange[®] adipometer [33].

Dietary intake will be checked by 3-day diet record, describing the foods eaten for three non-consecutive days (two weekdays and one weekend day). The records will be calculated using the NutriBase[®] software, 2007. Evaluation of total, insoluble, and soluble fiber intake will be calculated through the data of the spreadsheet developed by Schakel et al. [44].

Data management

The data of the participants will be included in an Excel database and then exported to SPSS version 18. The database will be shared between the data-collecting researchers and a responsible researcher. Patients will be coded according to the order in which they enter the survey following number allocation, corresponding randomization, collection of blood or feces, and begin or end (pre or post treatment). The procedures will be updated in the cadre ClinicalTrials.gov, ID: NCT03467282.

Statistical analysis

For the quantitative variables, the comparison between the values obtained before and after the intervention will be performed by the *t* test for parametric samples (or Wilcoxon's

signed-rank test if the data do not satisfy the assumptions for this test); for the qualitative variables, the McNemar test will be used.

In the comparison of treatments for the quantitative variables, a delta value will be computed (value before – value after); the delta values will be compared between interventions using the *t* test for independent samples (or the Mann-Whitney *U* test). Delta values can be adjusted by age and other covariates by analysis of covariance. It will be considered statistically significant if $P < 0.05$. Statistical analysis will be performed in SPSS 18.0.

Data monitoring

There is no significant risk in the supplementation of probiotics, and adverse events or symptoms are rarely described in the literature; therefore, a data monitoring committee is not necessary. However any symptoms will be reported by the patients and considered in this research.

Harms

In the treatment-adherence control worksheet it will be possible to write down any possible symptoms that may appear during the period. Also, patients will be advised that if they feel any symptom or discomfort during the treatment they will be free to stop.

Auditing

The research will be regularly reviewed by the responsible researchers and professors involved.

Confidentiality

The data collected during the surveys will always be treated confidentially. The results will be presented together, without the identification of the participants.

Ancillary care

In the event of any intercurrent events or damage resulting from the participation of the subjects in the survey, they will receive all necessary care, at no personal cost, at that hospital.

Dissemination policy

During and after the survey, the ClinicalTrials.gov database will be replete with data. After completing the research and processing the data, an article will be written for later publication in an international journal for the dissemination of data and results.

Discussion

This is the first double-blind, randomized clinical trial in NASH patients that will evaluate not only the repercussion of 24-week probiotic supplementation on the disease, the intestinal microbiota, and nutritional changes,

but also sarcopenic parameters. This study will evaluate several parameters: nutritional, functional, physical, and laboratorial assessments, including tests used for diagnosis and follow-up (TLR-4 and CK-18), and evaluation of degree of liver fibrosis, intestinal permeability, microbiota composition, and cardiovascular risk.

Because NASH is a worrying disease, already considered one of the main indications for liver transplantation [3], it is important to investigate an adjuvant treatment for this disease. It is believed that treating dysbiosis by modulating the intestinal microbiota through probiotic supplementation may be beneficial for NASH patients. However, the studies remain heterogeneous from the point of view of intervention time and products and quantities of supplements used [17–19, 29, 45].

In this study, there is a research team, consisting of dietitian nutritionists, hepatologists, and undergraduate students, committed to the appropriate selection of patients and all data collection. As previously mentioned, the probiotics were donated for this research. We believe that the findings from this study will be generalizable to populations outside Brazil, considering its high methodological quality (based on similar studies), which includes the randomized sample composed of patients found in routine clinical practice.

Trial status

The study is in the data collection phase. Recruitment started in March 2018 and is predicted to end in May 2019. Forty-five patients have started the study protocol and additional patients are being recruited. The current protocol is version 6.0, created in September 2017 and approved by the Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre in October 2017, before randomization.

Additional file

Additional file 1: Standard Protocol Items: Recommendations for Interventional Trials (SPIRIT) 2013 Checklist: Recommended items to address in a clinical trial protocol and related documents*. (DOC 121 kb)

Abbreviations

FTSTS: Five-times sit-to-stand test; kPa: Kilopascals; NAFLD: Non-alcoholic fatty-liver disease; NASH: Non-alcoholic steatohepatitis; PCR: Polymerase chain reaction; TLR: Toll-like receptor

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the Research and Events Fund from the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), and the National Council for Scientific and Technological Development – Brazil for financial support.

Authors' contributions

ASS-S: responsible for the intervention, microbiota assessment, and liver function testing. HAM: responsible for sarcopenia assessment. BCM: responsible for intestinal permeability assessment. JPB-B: conceived the study and participated in the design. VZA: conduct research pertaining to the

manuscript. BCA: contributed to the drafting of the manuscript. ASS-S, HAM, BCM: data collection, nutritional, laboratorial, and inflammatory marker assessments, and VD: responsible for the conduction of the PROBLIVER TRIAL protocol. All authors are involved for the main purpose of this manuscript and have read and approved the final manuscript.

Funding

This study is financed by the Research and Events Fund from the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES/PROAP), National Council for Scientific and Technological Development – Brazil (CNPq, Universal 1/2016). All the funding sources are not involved in the study design and data collection, and will not be involved in the analysis and interpretation of data.

Availability of data and materials

Access to data will be controlled by the chief investigator. Donors of probiotics and placebos will have access only to published data. Trial participants or their proxies are provided with assurances about the maintenance of privacy and confidentiality in the informed consent. Participating patients will have access to the results of the routine examinations that are in their medical records, and the other tests will be available from the investigators according to the patients' interest and request.

Ethics approval and consent to participate

This research is approved by the Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, registered under numbers 16–0438, 17–0406, and 19–0289, and it is also registered at ClinicalTrials.gov under the identifier NCT03467282. In the possibility of any protocol change, this will be done through an amendment to this same approved project. Written informed consent will be obtained from all patients to be included in this clinical trial by the main researchers. In the informed consent is the patient's agreement to allow the storage of their biological material (blood/feces) for future analysis.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Graduate Program: Sciences of Gastroenterology and Hepatology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Ramiro Barcelos 2400 - 2nd floor, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil. ²Department of Nutrition, Universidade do Vale do Taquari, Lajeado, Brazil. ³Graduate Program in Food, Nutrition and Health, UFRGS, Porto Alegre, Brazil. ⁴Nutrition and Dietetics Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil. ⁵Department of Nutrition, School of Medicine, UFRGS, Porto Alegre, Brazil.

Received: 3 May 2019 Accepted: 24 August 2019

Published online: 10 October 2019

References

- Chalasan 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.
- Puchakayala BK, Verma S, Kanwar P, Hart J, Sanivarapu RR, Mohanty SR. Histopathological differences utilizing the nonalcoholic fatty liver disease activity score criteria in diabetic (type 2 diabetes mellitus) and non-diabetic patients with nonalcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol*. 2015;7(25):2610–8.
- Sanyal AJ, Chalasani N. Trials and tribulations in drug development for nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014;12:2104–5.
- Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016;64(1):73–84.
- Chu H, Williams B, Schnabl B. Gut microbiota, fatty liver disease, and hepatocellular carcinoma. *Liver Res*. 2018;2(1):43–51.

6. Fukui H. Increased intestinal permeability and decreased barrier function: does it really influence the risk of inflammation? *Inflamm Intest Dis*. 2016; 1(3):135–45.
7. Bluemel S, Williams B, Knight R, Schnabl B. Precision medicine in alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease via modulating the gut microbiota. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2016;311(6):G1018–36.
8. Poeta M, Pierri L, Vajro P. Gut-liver axis derangement in non-alcoholic fatty liver disease. *Children (Basel)*. 2017;4(8):E66.
9. Roh YS, Seki E. Toll-like receptors in alcoholic liver disease, non-alcoholic steatohepatitis and carcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013;28(Suppl 1):38–42.
10. Thuy S, Ladumer R, Volynets V, Wagner S, Strahl S, Königsrainer A, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in humans is associated with increased plasma endotoxin and plasminogen activator inhibitor 1 concentrations and with fructose intake. *J Nutr*. 2008;138(8):1452–5.
11. Arab J, Arrese M, Trauner M. Recent insights into the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Annu Rev Pathol*. 2018;13:321–50.
12. Ferolla SM, Couto CA, Costa-Silva L, Armiliato GN, Pereira CA, Martins FS, et al. Beneficial effect of synbiotic supplementation on hepatic steatosis and anthropometric parameters, but not on gut permeability in a population with nonalcoholic steatohepatitis. *Nutrients*. 2016;8(7):E397.
13. 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.
14. Miele L, Valenza V, La Torre G, Montalto M, Cammarota G, Ricci R, et al. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2009;49(6):1877–87.
15. Moschen AR, Kaser S, Tilg H. Non-alcoholic steatohepatitis: a microbiota-driven disease. *Trends Endocrinol Metab*. 2013;24(11):537–45.
16. Schneider AC, Machado AB, de Assis AM, Hermes DM, Schaefer PG, Guizzo R, et al. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on hepatic and serum lipid profiles in zebrafish exposed to ethanol. *Zebrafish*. 2014; 11(4):371–8.
17. Aller R, De Luis DA, Izola O, Conde R, Gonzalez Sagrado M, Primo D, et al. Effect of a probiotic on liver aminotransferases in nonalcoholic fatty liver diseases patients: a double blind randomized clinical trial. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2011;15(9):1090–5.
18. Shavakhi A, Minakari M, Firouzian H, Assali R, Hekmatdoost A, Ferns G. Effect of a probiotic and metformin on liver aminotransferases in non-alcoholic steatohepatitis: a double blind randomized clinical trial. *Int J Prev Med*. 2013;4(5):531–7.
19. Wong VW, Won GL, Chim AM, Chu WC, Yeung DK, Li KC, Chan HL, et al. Treatment of nonalcoholic steatohepatitis with probiotics. A proof-of-concept study. *Ann Hepatol*. 2013;12(2):256–62.
20. Kobylak N, Avenavoli L, Mykhalchshyn G, Kononenko L, Boccuto L, Kyriienko D, et al. A multi-strain probiotic reduces the Fatty Liver Index, cytokines and aminotransferase levels in NAFLD patients: evidence from a randomized clinical trial. *J Gastrointest Liver Dis*. 2018;27(1):41–9.
21. Javadi L, Ghavami M, Khoshbaten M, Safaiyan A, Barzegari A, Gargari BP. The potential role of probiotics or/and prebiotic on serum lipid profile and insulin resistance in alcoholic fatty liver disease: a double blind randomized clinical trial. *Crescent J Med Biol Sci*. 2017;4(3):131–8.
22. Hong HC, Hwang SY, Choi HY, Yoo HJ, Seo JA, Kim SG, et al. Relationship between sarcopenia and nonalcoholic fatty liver disease: the Korean Sarcopenic Obesity Study. *Hepatology*. 2014;59(5):1772–8.
23. Guichelaar MM, Charlton MR. Decreased muscle mass in nonalcoholic fatty liver disease: new evidence of a link between growth hormone and fatty liver disease? *Hepatology*. 2014;59(5):1668–70.
24. Lee YH, Kim SU, Song K, Park JY, Kim DY, Ahn SH, et al. Sarcopenia is associated with significant liver fibrosis independently of obesity and insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease: Nationwide surveys (KNHANES 2008–2011). *Hepatology*. 2016;63(3):776–86.
25. Cederholm T, Barazzoni R, Austin P, Ballmer P, Biolo G, Bischoff SC, et al. ESPEN guidelines on definitions and terminology of clinical nutrition. *Clin Nutr*. 2017;36(1):49–64.
26. Wijampreecha K, Panjawan P, Thongprayoon C, Jaruvongvanich V, Ungprasert P. Sarcopenia and risk of nonalcoholic fatty liver disease: a meta-analysis. *Saudi J Gastroenterol*. 2018;24(1):12–7.
27. Bindels LB, Beck R, Schakman O, Martin JC, De Backer F, Sohet FM, et al. Restoring specific lactobacilli levels decreases inflammation and muscle atrophy markers in an acute leukemia mouse model. *PLoS One*. 2012;7(6): e37971.
28. Chan AW, Tetzlaff JM, Altman DG, Laupacis A, Gøtzsche PC, Križevac J, et al. SPIRIT 2013 Statement: defining standard protocol items for clinical trials. *Ann Intern Med*. 2013;158(3):200–7.
29. Eslamparast T, Poustchi H, Zamani F, Sharafkhan M, Malekzadeh R, Hekmatdoost A. Synbiotic supplementation in nonalcoholic fatty liver disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Am J Clin Nutr*. 2014;99(3):535–42.
30. Castera L, Forns X, Alberti A. Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography. *J Hepatol*. 2008;48(5):835–47.
31. Angulo P, Hui JM, Marchesini G, Bugianesi E, George J, Farrell GC, et al. The NAFLD Fibrosis Score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology*. 2007;45(4):846–54.
32. Kruger FC, Daniels CR, Kidd M, Swart G, Brundyn K, van Rensburg C, et al. APRI: a simple bedside marker for advanced fibrosis that can avoid liver biopsy in patients with NAFLD/NASH. *S Afr Med J*. 2011;101(7):477–80.
33. Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, Masutti F, Passalacqua M, Castiglione A, et al. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol*. 2006;6:33.
34. Silva TR, Spritzer PM. Skeletal muscle mass is associated with higher dietary protein intake and lower body fat in postmenopausal women. *Menopause*. 2017;24(5):502–9.
35. Slinde F, Rossander-Hulthén L. Bioelectrical impedance: effect of 3 identical meals on diurnal impedance variation and calculation of body composition. *Am J Clin Nutr*. 2001;74(4):474–8.
36. Schlüssel MM, dos Anjos LA, de Vasconcelos MT, Kac G. A dinamometria manual e seu uso na avaliação nutricional. (Reference values of handgrip dynamometry of healthy adults: a population-based study). *Clin Nutr*. 2008; 27(4):601–7.
37. Cesari M, Kritchevsky SB, Newman AB, Simonsick EM, Harris TB, Penninx BW, et al. Added value of physical performance measures in predicting adverse health related events: results from the Health, Aging and Body Composition Study. *J Am Geriatr Soc*. 2009;57(2):251–9.
38. Graham JE, Ostir GV, Fisher SR, Ottenbacher KJ. Assessing walk speed in clinical research: a systematic review. *J Eval Clin Pract*. 2008;14(4):552–62.
39. Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, Boirie Y, Cederholm T, Landi F, et al. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing*. 2010; 39(4):412–23.
40. Lauretani F, Russo CR, Bandinelli S, Bartali B, Cavazzini C, Di Iorio A, et al. Age-associated changes in skeletal muscles and their effect on mobility: an operational diagnosis of sarcopenia. *J Appl Physiol* (1985). 2003;95(5):1851–60.
41. Gustafson AS, Noaksson L, Kronhed AC, Möller M, Möller C. Changes in balance performance in physically active elderly people aged 73–80. *Scand J Reab Med*. 2000;32(4):168–72.
42. D'Agostino RB Sr, Vasan RS, Pencina MJ, Wolf PA, Cobain M, Massaro JM, et al. General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2008;117(6):743–53.
43. Goff DC Jr, Lloyd-Jones DM, Bennett G, Coady S, D'Agostino RB, Raymond G, et al. 2013 ACC/AHA Cardiovascular Risk Guideline. *Circulation*. 2013;129: S49–73.
44. Schakel S, Sievert YA, Buzzard IM. Dietary fiber values for common foods. In: Spiller GA, editor. *CRC handbook of dietary fiber in human nutrition*. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press; 2001. p. 614–48.
45. Vajro P, Mandato C, Licenziati MR, Franzese A, Vitale DF, Lenta S, et al. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in pediatric obesity-related liver disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2011;52(6):740–3.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

7. CONCLUSÕES

A Intervenção com probiótico em pacientes no estágio inicial de EHNA demonstrou ser incapaz de promover uma mudança significativa nos parâmetros hepáticos, nutricionais, clínicos e na análise parcial da microbiota intestinal.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Por se tratar de um grande ensaio clínico, que teve outros braços, incluindo avaliação de fatores de risco cardiovasculares, parâmetros de sarcopenia e permeabilidade intestinal, pretendemos futuramente fazer outros cruzamentos de dados a fim de compreender melhor os resultados que tivemos.
- Ampliar as análises referentes à microbiota intestinal correlacionando-a com os principais desfechos de interesse do estudo, incluindo a análise da microbiota do grupo controle;
- Avaliar fatores preditores da resposta individual dos pacientes que receberam probióticos;
- Realizar acompanhamento dos pacientes desse estudo, a fim de verificar o impacto a longo prazo da intervenção.

ANEXOS

ANEXO I - REGISTRO ALIMENTAR

Exemplo: Registrar todos os alimentos ingeridos durante o dia, em cada refeição e nos intervalos. Especificar as quantias em medidas caseiras.

Dia da semana: exemplo

Data ____/____/____

Horário	Alimento	Quantidade consumida
8:00	Leite semi-desnatado	meia xícara (75ml)
	Café sem açúcar	meia xícara (75ml)
	Pão de centeio	2 fatias grandes
	Queijo prato	1 fatia
	Margarina	2 pontas de faca
	Mamão	uma fatia pequena
10:30	Banana prata	uma unidade pequena
12:00	Arroz	4 colheres de sopa
	Feijão	4 colheres de sopa
	Bife de frango	uma unidade pequena
	Óleo de Oliva	uma colher de chá
16:00	Leite desnatado	um xícara
	Nescafé	uma colher de cafezinho
	Cream Cracker	4 unidades
20:00	Guisado com moranga	três colheres de sopa
	Batata assada	2 médias
	Souflé de espinafre	3 colheres de sopa
	Salada de repolho	uma xícara

ANEXO II - Orientações para realizar a coleta de fezes:

Data em que a coleta deverá ser feita: _____

-Há diversas maneiras para fazer a coleta de fezes, entretanto sugerimos o protocolo abaixo, **lembrando que as fezes não podem entrar em contato com a água do vaso sanitário.**

No dia da coleta, primeiro urine no vaso sanitário para não contaminar as fezes com a urina;

Não tomar laxante para fazer a coleta;

Coloque o protetor descartável, que está no kit, dentro da patente (a parte plástica deve ficar virada para baixo, de forma que as fezes cairão direto no protetor);

Após fazer cocô, coletar uma parte do mesmo, com o auxílio da pazinha, e colocá-lo no pote coletor. Não é necessário encher o pote de coleta, apenas uma pequena quantidade já é suficiente;

Descarte o protetor descartável sujo no lixo;

Em seguida, colocar o pote contendo a amostra de fezes no isopor junto com o pacote de gelo e guardar no congelador;

O pacote de gelo não precisa ser trocado.

OBS: É RECOMENDÁVEL COLOCAR O PACOTE DE GELO NO CONGELADOR ANTES DA COLETA PARA QUE O PACOTE DE GELO JÁ ESTEJA CONGELADO NO MOMENTO DA COLETA.

Dia da consulta: _____

Retire o isopor do refrigerador contendo o pote coletor com as fezes e o pacote de gelo e traga-o para o Hospital de Clínicas de Porto Alegre no dia da consulta.

Transportar o isopor em uma sacola plástica.

Qualquer dúvida em relação à coleta deste exame entre em contato através do telefone (51) 81910017 com a pesquisadora Amanda Souza.

ANEXO III - QUESTIONÁRIO INTERNACIONAL DE ATIVIDADE FÍSICA –

VERSÃO CURTA -

Nome: _____ Data: _____/
_____/ _____ IDADE : _____ Sexo: F () M ()

Nós estamos interessados em saber que tipos de atividade física as pessoas fazem como parte do seu dia a dia. Este projeto faz parte de um grande estudo que está sendo feito em diferentes países ao redor do mundo. Suas respostas nos ajudarão a entender que tão ativos nós somos em relação à pessoas de outros países. As perguntas estão relacionadas ao tempo que você gasta fazendo atividade física na **ÚLTIMA** semana. As perguntas incluem as atividades que você faz no trabalho, para ir de um lugar a outro, por lazer, por esporte, por exercício ou como parte das suas atividades em casa ou no jardim. Suas respostas são **MUITO** importantes. Por favor responda cada questão mesmo que considere que não seja ativo. Obrigado pela sua participação!

Para responder as questões lembre que:

atividades físicas **VIGOROSAS** são aquelas que precisam de um grande esforço físico e que fazem respirar **MUITO** mais forte que o normal

atividades físicas **MODERADAS** são aquelas que precisam de algum esforço físico e que fazem respirar **UM POUCO** mais forte que o normal

Para responder as perguntas pense somente nas atividades que você realiza **por pelo menos 10 minutos contínuos** de cada vez.

1a Em quantos dias da última semana você **CAMINHOU** por pelo menos 10 minutos contínuos em casa ou no trabalho, como forma de transporte para ir de um lugar para outro, por lazer, por prazer ou como forma de exercício?

dias _____ por **SEMANA** () Nenhum

1b Nos dias em que você caminhou por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou caminhando **por dia**?

horas: _____ Minutos: _____

2a. Em quantos dias da última semana, você realizou atividades **MODERADAS** por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo pedalar leve na bicicleta, nadar, dançar, fazer ginástica aeróbica leve, jogar vôlei recreativo, carregar pesos leves, fazer serviços domésticos na casa, no quintal ou no jardim como varrer, aspirar, cuidar do jardim, ou qualquer atividade que fez aumentar **moderadamente** sua respiração ou batimentos do coração (**POR FAVOR NÃO INCLUA CAMINHADA**)

dias _____ por **SEMANA** () Nenhum

2b. Nos dias em que você fez essas atividades moderadas por pelo menos 10 minutos contínuos, quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades **por dia**?

horas: _____ Minutos: _____

3a Em quantos dias da última semana, você realizou atividades **VIGOROSAS** por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo correr, fazer ginástica aeróbica, jogar futebol, pedalar rápido na bicicleta, jogar basquete, fazer serviços domésticos pesados em casa, no quintal ou cavoucar no jardim, carregar pesos elevados ou qualquer atividade que fez aumentar **MUITO** sua respiração ou batimentos do coração.

dias _____ por **SEMANA** () Nenhum

3b Nos dias em que você fez essas atividades vigorosas por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades **por dia**?

horas: _____ Minutos: _____

Estas últimas questões são sobre o tempo que você permanece sentado todo dia, no trabalho, na escola ou faculdade, em casa e durante seu tempo livre. Isto inclui o tempo sentado estudando, sentado enquanto descansa, fazendo lição de casa visitando um amigo, lendo,

sentado ou deitado assistindo TV. Não inclua o tempo gasto sentado durante o transporte em ônibus, trem, metrô ou carro.

4a. Quanto tempo no total você gasta sentado durante um **dia de semana**?

_____ horas ____ minutos

4b. Quanto tempo no total você gasta sentado durante em um **dia de final de semana**?

_____ horas ____ minutos

ANEXO IV - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**Títulos dos Projetos: EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM PROBIÓTICOS EM
PACIENTES COM DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA:
ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO**

**AVALIAÇÃO DE OBESIDADE SARCOPÊNICA EM PACIENTES COM DOENÇA
HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA PRÉ E PÓS INTERVENÇÃO COM
SUPLEMENTAÇÃO DE PROBIÓTICOS**

Você está sendo convidado a participar de duas pesquisas cujos objetivos são avaliar o efeito do uso de probióticos por 6 meses, em pacientes com Doença hepática não alcoólica na composição da microbiota intestinal e na evolução da doença e avaliar a presença de sarcopenia, em pacientes com Doença hepática gordurosa não alcoólica antes e após a intervenção com probióticos. Ambas as pesquisas estão sendo realizadas pelo Programa de Pós Graduação de Gastroenterologia e Hepatologia - UFRGS no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

A microbiota intestinal se forma quando nascemos, ela é composta por uma enorme variedade de microrganismos presentes no nosso intestino e desempenham importante papel na saúde. Um desequilíbrio na composição da microbiota pode estar relacionado com doenças, problemas no fígado e excesso de peso. Os probióticos são bactérias benéficas (um dos tipos de microrganismos) que, quando consumidas em quantidade suficiente, podem contribuir para o equilíbrio da microbiota e desta forma ter benefício a saúde. Os probióticos podem ser adicionados ao preparo de alimentos, ou consumidos na forma de suplementos dietéticos ou medicamentos.

A obesidade sarcopênica é a perda da massa e funcionalidade dos músculos aliado ao aumento da gordura corporal, sendo um processo de múltiplas causas. Diversos fatores estão ligados a isto, podendo ser citados deficiências hormonais do envelhecimento, baixo consumo de proteínas e a baixa atividade física. A sarcopenia tem sido associada com a doença hepática gordurosa não alcoólica e pode estar associada a piores desfechos clínicos relacionados ao fígado. Nesta pesquisa também avaliaremos se existe obesidade sarcopênica e se ela se modifica após a suplementação com probióticos

Se você aceitar participar da pesquisa serão realizados os seguintes procedimentos:

Etapa 1: Será realizada uma entrevista em que você será avaliado(a) quanto à prática de atividade física, consumo de álcool e características cardiovasculares. Você receberá orientações para o preenchimento de um registro alimentar, que será realizado na sua casa, onde você irá relatar todos os alimentos e bebidas consumidos durante 3 dias (2 dias da semana e 1 dia do final de semana). Além disso, você receberá um kit e instruções para realizar uma coleta de fezes um dia antes da sua próxima consulta. Para a coleta, você deverá evacuar diretamente sobre um protetor descartável fornecido no kit, e depois irá transferir as fezes para um pote também fornecido no kit. Após a coleta, a amostra deverá ser armazenada

no isopor refrigerado até a próxima consulta. Após, no Centro de Pesquisa Clínica (CPC) do HCPA serão realizados testes funcionais. O primeiro é o teste de velocidade da marcha, que consiste em medir o tempo que a pessoa leva para fazer uma caminhada de 10 metros. Este teste é realizado em uma superfície plana e firme e o pesquisador lhe acompanhará durante o trajeto. Teste de força e potência dos membros inferiores, no qual você será deverá sentar e levantar de uma cadeira 5 vezes. Teste de apoio unipodal, no qual de pé você deverá elevar uma das pernas flexionando o joelho e equilibrar-se em apenas um dos pés, 3 vezes em cada perna. Essa primeira etapa terá duração de aproximadamente 1 hora. No final desta consulta, será agendada nova consulta, uma semana depois, no Centro de Pesquisa Clínica (CPC) do HCPA.

Etapa 2 (Centro de Pesquisa Clínica). Serão realizadas as seguintes avaliações:

a) Coleta de 25mL de sangue (corresponde a 3 colheres de sopa) para avaliação função hepática (fígado) e exames marcadores de inflamação (CK-18 e TLR-4) e marcadores de sarcopenia (hormônio do crescimento, testosterona e miostatina), que são hormônios e proteínas considerados importantes para o aparecimento dessa condição. Exames de interesse desta pesquisa como colesterol, triglicerídeos, glicose, insulina, hemograma, proteína C-reativa, albumina, creatinina, caso você autorize, serão consultados diretamente do seu prontuário.

b) Avaliação nutricional realizada por nutricionista, através da medida de peso, altura, força do aperto de mão que é feita em um aparelho onde você aperta com sua mão simulando um aperto de mão para avaliar sua força, circunferência da cintura, circunferência do braço, circunferência da panturrilha, e verificação de gordura no braço, verificação da gordura do tríceps (parte de trás do braço), das costas e do abdômen com auxílio de um aparelho, plicômetro, que funciona como uma pinça segurando por alguns segundos a parte de trás do braço. Para avaliação de gordura corporal, serão utilizados dois aparelhos, um de bioimpedância, semelhante a uma balança, no qual você ficará em pé e deverá segurar duas hastas (cabos) por aproximadamente um minuto; e outro, de Absortometria Radiológica de Dupla Energia (Dexa), que é um exame de imagem de baixa radiação, aplicado por um técnico habilitado, onde você irá deitar-se de barriga para cima uma maca para a captura de imagens com o aparelho que apenas irá passar sob seu corpo. O exame tem duração de aproximadamente cinco minutos.

c) Verificação da pressão arterial (PA);

d) Entrega do registro alimentar de três dias que foi realizado em casa;

e) Entrega da caixinha térmica contendo o pote com a amostra de fezes;

Caso alguns destes parâmetros estejam alterados, essas informações poderão ser encaminhadas ao seu médico assistente. Após esses procedimentos você será sorteado para um de dois grupos dessa pesquisa, não sendo possível escolher de qual grupo participar. Nem você nem os pesquisadores saberão de qual grupo você fará parte. Um grupo receberá saches contendo probióticos e o outro, sachês com um pó com as mesmas características, porém sem probióticos, contendo uma substância chamada polidextrose ou maltodextrina, à base de carboidrato. O conteúdo dos sachês é um pó sem sabor que deverá ser adicionado em um copo de água temperatura ambiente. Você deverá consumir dois sachês por dia todos os dias

pela manhã, em jejum, durante 6 meses. Metade dos sachês serão fornecidos nesta consulta e a outra metade na próxima consulta. Os procedimentos realizados nesta etapa 2 terão duração de aproximadamente 1 hora e 15 minutos.

Etapa 3 (Centro de Pesquisa Clínica, três meses após a etapa 2): nessa consulta de acompanhamento você receberá outro diário para levar para casa para anotar todos os alimentos e bebidas consumidos durante 3 dias e outro kit para coleta de fezes que deverá ser realizada um dia antes da sua última consulta. Também serão realizados novamente os testes funcionais realizados na etapa 1. Nesse mesmo momento irá receber o restante dos sachês. Essa etapa terá uma duração aproximada de 30 minutos.

Etapa 4 (Centro de Pesquisa Clínica, três meses após a etapa 3): Nessa última etapa, você será submetido aos mesmos procedimentos, questionários e exames das etapas anteriores (com exceção dos testes funcionais) , com a orientação de 12 horas de jejum para a coleta de sangue. Essa consulta terá duração de 1 hora e 15 minutos.

O tempo total de duração do estudo é de 6 meses e entraremos em contato durante o período para orientações, esclarecimentos de dúvidas e para agendar suas consultas.

Quanto aos possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da sua participação na pesquisa: poderá sentir algum desconforto na coleta de sangue pelo jejum e eventualmente pode aparecer um hematoma (machuca roxa) pela picada da agulha. Você poderá sentir algum incômodo pelo tempo dispendido nos questionários ou nas consultas, assim, como é possível algum incômodo pela coleta de fezes ou algum mal estar durante os testes funcionais como dor, cansaço, fadiga, tontura, falta de ar ou queda. Os riscos serão minimizados com adequado treinamento da equipe de pesquisadores. Se você sentir algum desconforto ou sintoma durante a realização dos testes, a atividade será interrompida imediatamente. Em relação aos probióticos, eventualmente você poderá apresentar algum desconforto ou distensão abdominal, entretanto, não são conhecidos riscos ou efeitos negativos graves com o seu uso.

Os possíveis benefícios da pesquisa são o benefício do uso dos probióticos, se for sorteado para este grupo, com a melhora na microbiota podendo refletir na evolução de sua doença hepática. Como participante desta pesquisa, você terá conhecimento sobre seu peso, composição corporal, quantidade e funcionalidade dos músculos e ainda saber se seus hábitos alimentares são adequados para sua saúde.

Ao final do estudo, todos os participantes receberão orientação nutricional personalizada e se identificada a necessidade de acompanhamento nutricional seu médico assistente será comunicado.

O material biológico coletado será armazenado de forma codificada. Após a realização das análises previstas neste projeto, as amostras serão armazenadas. Este material, além de ser utilizado neste estudo, poderá ser utilizado em outros estudos futuros do nosso grupo. Neste caso, um novo projeto de pesquisa será submetido para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa e você será chamado para reconsentir com o uso do material.

Sua participação em ambas as pesquisas é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento,

não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e

você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação nas pesquisas, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante as pesquisas serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Dra. Valesca Dall'Alba, ou com as pesquisadoras Amanda Souza Silva e Helena Abadie Moraes, ou ainda, pessoalmente na zona 15 do HCPA, quartas-feiras das 16-19h ou no Serviço de Gastroenterologia, segundo andar (3359-8307) ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Com relação às amostras biológicas armazenadas

Autorizo o armazenamento do material biológico para pesquisas futuras.

Não autorizo o armazenamento do material biológico para pesquisas futuras.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____