



**BAHIANA**  
ESCOLA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA

**ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E SAÚDE HUMANA**

**JUNAURA ROCHA BARRETTO**

**EFICÁCIA DO USO DE *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* E *BIFIDOBACTERIUM LACTIS* NO TRATAMENTO DA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA E RESISTÊNCIA À INSULINA EM ADOLESCENTES OBESOS:  
ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO**

**TESE DE DOUTORADO**

**Salvador**

**2021**

**JUNAURA ROCHA BARRETTO**

**EFICÁCIA DO USO DE *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* E *BIFIDOBACTERIUM LACTIS* NO TRATAMENTO DA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA E RESISTÊNCIA À INSULINA EM ADOLESCENTES OBESOS: ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Medicina e Saúde Humana da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública como requisito parcial para obtenção do Título de Doutora em Medicina e Saúde Humana.

Orientador: Dr. Ney Boa-Sorte

Coorientador: Dr. Bruno Bezerril Andrade

**Salvador  
2021**

## **INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS**

Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública - EBMSP

Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz

Clínica Delfin Medicina Diagnóstica

PSH nutri

“Talvez não tenhamos feito o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não somos o que queremos ser, nem somos o que iremos ser, mas graças a Deus, não somos o que éramos.”

Martin Luther King



## AGRADECIMENTOS

A Deus, essa energia absoluta que em meu entendimento, tudo cria, tudo transforma e a tudo nos possibilita.

A Dr. Ney Boa-Sorte pelo incentivo, paciência e sobretudo pela parceria, sempre ensinando com dedicação paternal. Sem este apoio e incentivo, nada seria possível.

Aos meus pais, pela educação e amor incondicional que me dedicaram e dedicam sempre.

Aos meus filhos, Arthur e João Filipe, pela compreensão nas minhas ausências em momentos diversos durante esta trajetória. À João, pela parceria durante o projeto de pesquisa nas ilustrações da tese e da apresentação da defesa. À Arthur, pelos conselhos e apoio afetivo.

Ao meu marido e companheiro Tiago, pela paciência, carinho e ajuda de sempre.

Ao meu coorientador, Dr. Bruno Bezerril Andrade, pela disponibilidade, incentivo, auxílio com sua expertise e conselhos que acalmavam o meu "coração de estudante"!

À Valéria Borges, pela parceria e disponibilidade, pela sensibilidade e demonstração de amizade e afeto em tão pouco tempo de convivência.

À Thais Gonzalez e Fernanda Gonzalez, representando a Clínica DELFIN pela parceria e apoio na realização dos exames de ressonância magnética de fígado.

À Dra. Mônica Torres, amiga e colega de jornada, pelo apoio nos exames de imagem.

À Dra. Sandra Andrade, pela parceria e apoio na realização dos exames de imagem.

À Camila, nutricionista do projeto, que voluntariamente brilhou, nos ajudando e criando vínculos belíssimos conosco e com os pacientes.

Às estudantes de Iniciação Científica: Maria, Letícia e Isabela, pelo apoio na coleta de dados.

À toda a equipe assistencial do ADAB, funcionários da radiologia, recepção, enfermagem, Coordenação, supervisão, laboratório e segurança, pelo olhar empático ao projeto e pelo apoio fantástico dispensado ao PROBESO.

Ao laboratório APAE-Salvador na pessoa de Gildásio, pela parceria nos exames laboratoriais.

À equipe do Laboratório de Imunologia da Fiocruz-Bahia, pela parceria na realização de exames e produção científica.

Ao laboratório DAUDT, pela doação dos probióticos.

A PSH nutri, pelo apoio no cegamento das amostras.

Aos pacientes e seus familiares, por terem confiado a mim, o cuidado pela saúde deles.

Aos amigos que não me deixam faltar sorrisos e abraços.

Aos meus colegas da pós-graduação e amigos queridos que derramaram apoio, atenção e sensibilidade especial à minha pessoa: Ana Célia Romeo, André Romeo, Ana Rolin, Karla Mota, Mônica Torres, Joseane e Maria Consuelo.

Aos professores da pós-graduação da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, pela condução de um curso tão enriquecedor e prazeroso.

À EBMSP por nos proporcionar a oportunidade de nos tornarmos profissionais e seres humanos melhores, e por sempre valorizar o progresso do ser humano.

## RESUMO

BARRETTO, Junaura Rocha; BOA-SORTE, Ney Christian do Amaral, BEZERRIL ANDRADE, Bruno. Eficácia do uso de *Lactobacillus Acidophilus* e *Bifidobacterium Lactis* no tratamento da doença hepática gordurosa não alcoólica e resistência à insulina em adolescentes obesos: Ensaio clínico randomizado

**Introdução:** A DHGNA é a causa mais comum de doença crônica hepática em adultos e crianças. A patogênese da DHGNA está parcialmente elucidada; descrita como multifatorial, a resistência periférica à insulina (RI) tem um papel importante, assim como o aumento do estresse oxidativo com produção de radicais livres causando inflamação e fibrose. Vários autores descrevem o papel da microbiota intestinal na patogênese da DHGNA, inclusive sugerindo a sua implicação não só na indução da doença hepática, mas em sua progressão. O tratamento recomendado inclui as mudanças de estilo de vida, que apresentam baixa adesão entre crianças e adolescentes. Os estudos de intervenção com uso de probióticos são escassos nesse grupo de pacientes, e por isso promissores. **Objetivos:** Verificar a eficácia do uso de *Lactobacillus Acidophilus* e *Bifidobacterium Lactis* na redução da esteatose hepática e da quantificação de gordura hepática, e nos parâmetros relacionados à resistência à insulina em adolescentes obesos. **Método:** Trata-se de um estudo clínico, duplo-cego, randomizado e controlado com placebo cuja intervenção possui duração de 16 semanas. A intervenção consistiu na administração da combinação dos probióticos *Lactobacillus acidophilus LA-5®* e *Bifidobacterium lactis BB-12®*, contendo 1 x 10<sup>9</sup> Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de cada um dos probióticos, na forma de pó liofilizado, administrado por via oral, uma vez ao dia. Vinte e oito crianças e adolescentes foram acompanhados com avaliações clínicas e nutricionais e realização de exames laboratoriais e ressonância magnética de fígado no baseline e no final da intervenção. **Resultados:** Dentre os adolescentes do grupo placebo (N=12), 3(25%) apresentaram piora na classificação da gravidade da esteatose hepática segundo o valor do PDFF na ressonância magnética. No grupo que recebeu probióticos (N=14), apenas 1(7,1%) apresentou piora. Observou-se uma redução média da diferença percentual nos valores de rigidez hepática entre a semana 16 e a linha de base, para o grupo probiótico, enquanto houve aumento médio no grupo placebo (-4,77[13,28] vs. 3,03[12,01]; p=0,045). Não observamos alterações estatisticamente significantes para valores medianos da ALT antes e após intervenção em ambos os grupos, sem diferença entre os mesmos (p = 0,216). Após a intervenção, os valores finais da glicemia (p=0,043), insulina (p<0,001) e HOMA-IR (p<0,001) avaliados, aumentaram entre os adolescentes estudados de modo global, independente do grupo de estudo. Para o IMC, o percentual de gordura corporal e a circunferência da cintura, não foi observado aumento e/ou redução significativa entre os quatro períodos de avaliação (baseline, semanas 6, 12 e 16). **Conclusões:** Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em relação à redução de valores de percentual de gordura hepática ao PDFF e igualmente para os parâmetros relacionados à resistência à insulina; entretanto, no grupo que recebeu intervenção apresentou redução significativa dos valores relacionados a rigidez hepática.

**Descritores:** Esteatose hepática; Probióticos; Adolescentes; Obesidade; Resistência à insulina.

## ABSTRACT

BARRETTO, Junaura Rocha; BOASORTE, Ney Christian do Amaral, BEZERRIL ANDRADE, Bruno. Efficacy of the use of lactobacillus acidophilus and bifidobacterium lactis in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance in obese adolescents: Randomized clinical trial.

**Introduction:** NAFLD is the most common cause of chronic liver disease in adults and children. NAFLD pathogenesis is partially elucidated; described as multifactorial, peripheral insulin resistance (RI) plays an important role, as does the increase in oxidative stress with the production of free radicals causing inflammation and fibrosis. Several authors describe the role of the intestinal microbiota in the pathogenesis of NAFLD, including suggesting its involvement not only in the induction of liver disease, but in its progression. The recommended treatment includes lifestyle changes, which have low adherence among children and adolescents. Intervention studies using probiotics are scarce in this group of patients, and therefore promising. **Objectives:** To verify the effectiveness of the use of *Lactobacillus Acidophilus* and *Bifidobacterium Lactis* in reducing hepatic steatosis and in the quantification of hepatic fat, and in the parameters related insulin resistance in obese adolescents. **Method:** This is a clinical, double-blind, randomized, placebo-controlled study whose intervention lasts 16 weeks. The intervention consisted of administering a combination of the probiotics *Lactobacillus acidophilus LA-5®* and *Bifidobacterium lactis BB-12®*, containing  $1 \times 10^9$  Colony Forming Units (CFU) of each of the probiotics, in the form of lyophilized powder, administered orally, once a day. Twenty-eight children and adolescents were followed up with clinical and nutritional exams; laboratory tests and MRI of the liver at baseline and at the end of the intervention. **Results:** In the placebo group (N=12), 3 (25%) of the adolescents presented worsening in PDFF the classification of the severity of hepatic steatosis. In the group that received probiotics (N=14), only 1 (7.1%) had worsening. There was a mean reduction in percent difference in liver stiffness values between week 16 and baseline for the probiotic group, while there was a mean increase in the placebo group (-4.77[13.28] vs. 3.03[12.01]; p=0.045). We did not observe statistically significant changes for median ALT values before and after the intervention in both groups and, for the intervention group, the values were: 25(19-40.7) and 26 (19.5-33.0) with p = 0.216. After the intervention, the final values of blood glucose (p=0.043), insulin (p<0.001) and HOMA-IR (p<0.001) evaluated increased among the adolescents studied globally. In the variation of BMI, the percentage of body fat and waist circumference, between the evaluations carried out, there was no significant increase and/or reduction between the four evaluation periods. **Conclusions:** No statistically significant differences were observed between the groups regarding the reduction of liver fat percentage values to PDFF and equally for the parameters related to insulin resistance; however, the group that received the intervention showed a significant reduction in values related to liver stiffness.

**Descriptors:** Liver steatosis; Probiotics; Adolescents; Obesity; Insulin resistance.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Eixo intestino -fígado na DHGNA (Hipótese de múltiplos insultos).....	29
<b>Figura 2</b> - Apresentação dos sachês de probióticos e placebos entregue aos pacientes .....	45
<b>Figura 3</b> - Protocolo de consultas do ensaio clínico randomizado .....	52
<b>Figura 4</b> - Alterações nas proteínas bioquímicas do sangue periférico de pacientes com e sem esteatose hepática .....	67
<b>Figura 5</b> - Mudanças nas correlações entre as concentrações de proteínas plasmáticas nos pacientes com DHGNA .....	69
<b>Figura 6</b> - Correlação de Spearman dos parâmetros bioquímicos no sangue dos pacientes de acordo com o grau de DHGNA .....	72
<b>Figura 7</b> - Grau de perturbação bioquímica entre os grupos com e sem DHGNA.....	77
<b>Figura 8</b> - Parâmetros bioquímicos associados à DHGNA .....	78
<b>Figura 9</b> - Fluxograma CONSORT do desenho do estudo.....	79
<b>Gráfico 1</b> - 1A– Variação percentual dos valores do PDFF entre o baseline e a semana 16 (Sem 16) para os grupos Probiótico e Placebo; 1B – Variação dos valores absolutos de PDFF entre o baseline e a semana 16 (Sem 16). ADAB, EBMSp, outubro de 2019 a fevereiro de 2020.....	83
<b>Gráfico 2</b> - 2A– Variação percentual dos valores de rigidez hepática entre o baseline e a semana 16 para os grupos Probiótico e Placebo. ^2B – Variação dos valores absolutos de rigidez hepática entre o baseline e a semana 16. ADAB, EBMSp, outubro de 2019 a fevereiro .....	84
<b>Gráfico 3</b> - Efeito do uso de Probiótico na gravidade da DHGNA (piora da classificação) entre os grupos probiótico (N=14) e placebo (N=12) após a intervenção. ADAB, EBMSp, outubro de 2019 a fevereiro de 2020. ....	85
<b>Gráfico 4</b> - A, B e C – Evolução dos valores de AST (UI/L), ALT (UI/L) e GGT (UI/L) no baseline e semana 16, estratificado de acordo com o tipo de grupo de estudo (Probiótico e Placebo). ADAB, EBMSp, outubro de 2019 a fevereiro de 2020. ....	87
<b>Gráfico 5</b> - Valores de glicemia (mg/dL), insulinemia ( $\mu$ UI/L) e HOMA-IR antes e após a intervenção e valores das diferenças absolutas entre a semana 16 e o baseline dos níveis de glicemia (mg/dL), insulinemia ( $\mu$ UI/L) e HOMA-IR, entre os 28 adolescentes estudados, estratificados por grupo de estudo. ADAB, EBMSp, outubro de 2019 a fevereiro de 2020 ...	89
<b>Gráfico 6</b> - A, B, C e D – Evolução dos valores de Colesterol Total (mg/dl), LDL-c (mg/dl), HDL-c (mg/dl) e triglicerídeos (mg/dl) e diferença média percentual entre o baseline e semana 16, estratificado de acordo com o tipo de grupo de estudo (Probiótico e Placebo). ADAB, EBMSp, outubro de 2019 a fevereiro de 2020.....	91
<b>Gráfico 7</b> - Valores de IMC (kg/m <sup>2</sup> ) (11A), massa gorda (Kg) (11B) e circunferência da cintura (cm) (11C) no baseline, semanas 6, 12 e 16, para os grupos Probiótico (N=14) e Placebo (N=14). ADAB, EBMSp, outubro de 2019 a fevereiro de 2020.....	95
<b>Gráfico 8</b> - Descrição do percentual individual e médio, com o respectivo IC95%, da adesão terapêutica, nos intervalos de visitas, 0-6 semanas, 6-12 semanas e 12-16 semanas, entre os 28 adolescentes estudados, estratificado por grupo de estudo. ADAB, EBMSp, outubro de 2019 a fevereiro de 2020.....	96

<b>Gráfico 9</b> - Comparação dos valores individuais dos escores obtidos na Escala Bristol para cada visita realizada, entre os 28 adolescentes estudados, estratificados por grupo de intervenção. ADAB, EBMSp, outubro de 2019 a fevereiro de 2020.....	98
<b>Gráfico 10</b> - Descrição da média com o respectivo IC95% do VET consumido referido no momento pré-intervenção, semanas 6, 12 e 16 (semana final) entre os 28 adolescentes estudados, estratificado por grupo de estudo. ADAB, EBMSp, outubro de 2019 a fevereiro de 2020 .....	99
<b>Gráfico 11</b> - Descrição do consumo individual e médio (DP) do consumo de fibras alimentares (g/dia), nas semanas pré-intervenção (baseline), 6, 12 e 16, entre os 28 adolescentes estudados, estratificado por grupo de estudo. ADAB, EBMSp, outubro de 2019 a fevereiro de 2020 ...	100
<b>Gráfico 12</b> - Descrição do consumo individual e médio (DP) do percentual de gordura na dieta (%), nas semanas pré-intervenção (baseline), 6, 12 e 16, entre os 28 adolescentes estudados, estratificado por grupo de estudo. ADAB, EBMSp, outubro de 2019 a fevereiro de 2020 ...	101

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Características dos 72 adolescentes participantes da triagem inicial do estudo, atendidos no ambulatório Docente Assistencial da Escola Bahiana de Medicina, cidade de Salvador, Bahia.....	64
<b>Tabela 2</b> - Comparação dos marcadores bioquímicos e inflamatórios entre os 72 participantes da triagem inicial, identificados com e sem DHGNA, por via ultrassonográfica, atendidos no ambulatório Docente Assistencial da Escola Bahiana de Medicina, na cidade de Salvador, Bahia .....	65
<b>Tabela 3</b> - Concentração de marcadores bioquímicos de acordo com o grau de DHGNA, 36 adolescentes participantes da triagem inicial do estudo, atendidos no ambulatório Docente Assistencial da Escola Bahiana de Medicina, na cidade de Salvador, Bahia).....	73
<b>Tabela 4</b> - Comparação das características sociodemográficas, clínicas e antropométricas entre os grupos Probiótico (N=14) e Placebo (N=14), atendidos no ambulatório Docente Assistencial da Escola Bahiana de Medicina, na cidade de Salvador, Bahia).....	80
<b>Tabela 5</b> - Valores medianos (p25 – p75) dos parâmetros radiológicos e bioquímicos estudados entre os grupos probiótico (N= 14) e placebo (N=14) no baseline (pré-intervenção). ADAB, EBMSp, outubro de 2019 a fevereiro de 2020.....	82
<b>Tabela 6</b> - Comparação das diferenças absolutas e percentuais (antes e após a intervenção) dos parâmetros bioquímicos hepáticos entre os grupos Probiótico (N=14) e Placebo (N=14). ADAB, EBMSp, outubro de 2019 a fevereiro de 2020.....	86
<b>Tabela 7</b> - Comparação das diferenças dos valores absolutos e percentuais de Glicemia, insulina e Homa-IR entre os grupos Probiótico (N=14) e Placebo (N=14), antes e após a intervenção. ADAB, EBMSp, outubro de 2019 a fevereiro de 2020.....	88
<b>Tabela 8</b> - Comparação das diferenças dos valores absolutos e percentuais de colesterol total e frações entre os grupos Probiótico (N=14) e Placebo (N=14), antes e após a intervenção. ADAB, EBMSp, outubro de 2019 a fevereiro de 2020.....	90
<b>Tabela 9</b> - Comparação das diferenças dos valores absolutos e percentuais de ferritina, vitamina D e PCR-US entre os grupos Probiótico (N=14) e Placebo (N=14), antes e após a intervenção. ADAB, EBMSp, outubro de 2019 a fevereiro de 2020.....	92
<b>Tabela 10</b> - Valores medianos (p25 – p75) do peso, IMC, escore z do indicador IMC/idade, Circunferência da cintura, percentual de gordura corporal e relação cintura/quadril, no baseline (pré-) e na semana 16 (pós-intervenção). ADAB, EBMSp, outubro de 2019 a fevereiro de 2020 .....	93
<b>Tabela 11</b> - Comparação das diferenças absolutas e percentuais, entre o baseline e após a intervenção, dos valores de peso, IMC, escore z do indicador IMC/idade, CC, RCQ e percentual de gordura corporal entre os grupos Probiótico (N=14) e Placebo (N=14), antes e após a intervenção. ADAB, EBMSp, outubro de 2019 a fevereiro de 2020.....	94
<b>Tabela 12</b> - Frequência absoluta (percentual) de eventos adversos selecionados de acordo com intervalos de visitas (0-6 semanas, 6-12 semanas e 12-16 semanas), entre os 28 adolescentes estudados, estratificado por grupo de estudo. ADAB, EBMSp, outubro de 2019 a fevereiro de 2020 .....	97

**Tabela 13** - Descrição dos pacientes que modificaram o padrão de consistência das fezes, segundo grupo de intervenção. ADAB, EBMSP, outubro de 2019 a fevereiro de 2020 .....98



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAB	Ambulatório Docente Assistencial de Brotas
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AGL	Ácidos graxos livres
ALT	Aminotransferase de alanina
ALT	Aminotransferase de aspartase
BCAA	Aminoácidos de cadeia ramificada
CA	Circunferência abdominal
CB	Circunferência do braço
CCA	Análise de Correlação Canônica ( <i>canonical correlation analysis</i> )
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
CRFs 15	<i>Case Report Forms</i>
DCS	Dobra cutânea subescapular
DCT	dobras cutâneas tricípital
DEXA	<i>Dual-energy X-ray absorptiometry</i>
DHGNA	Doença gordurosa hepática não alcoólica
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	Acido desoxirribonucleico
EBMSP	Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública
ECRs	Ensaio clínico randomizado
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
Fiaf	Fator adiposo induzido pelo jejum
GGT	Gama Glutamil Transferase
GLP-1	Glucagon Like Peptídeo
H <sub>2</sub>	Dióxido de hidrogênio
IL1	Interleucina 1
IL6	Interleucina 6
IMC	Índice de Massa Corpórea
IOTF	<i>International Obesity Task Force</i>
IPAQ-A	<i>Physical Activity Questionnaire</i> - questionário internacional de atividade física para adultos

IPAQ-C	<i>International Physical Activity Questionnaire</i> - questionário internacional de atividade física para crianças
JAM -A	Molécula de Adesão Juncional A
LPS	Lipossacarídeos
LPL	Lipase Lipoprotéica
MDP	Grau de Perturbação molecular ( <i>molecular degree of perturbation</i> )
NASH	<i>Non-Alcoholic SteatoHepatitis</i>
NASPGHAN	<i>North American Society For Pediatric Gastroenterology, Hepatology &amp; Nutrition</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPs	Padrão de Moléculas Associada a Patógenos
PDFF	<i>Proton density fat fraction</i>
PIGs	Pequenos para Idade Gestacional
PYY	Peptídeo YY
RCQ	Relação Cintura Quadril
ReBEC	Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos Resistência à insulina
RI	Resistência à insulina
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
TA	Termo de Assentimento
TC	Tomografia Computadorizada
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF $\beta$	<i>Transforming Growth Factor Beta</i> (Fator de Transformação do Crescimento Beta)
TLR	Toll Like Receptor
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
USG	Ultrassonografia
VET	Valor energético total
VLDL	<i>Very Low Density Lipoproteins</i> (Lipoprotein de Muito Baixa Densidade)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
2.1 Objetivo geral.....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
3.1 Obesidade como doença inflamatória multissistêmica.....	19
3.2 DHGNA e Resistência à insulina.....	22
3.3 A microbiota intestinal na obesidade e as repercussões no eixo intestino-fígado.....	24
3.4 Avaliação diagnóstica na DHGNA .....	33
3.5 O uso dos probióticos como opção terapêutica para a DHGNA .....	35
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>41</b>
4.1 Desenho e população do estudo .....	41
4.1.1 Cálculo e tamanho amostral .....	41
4.2 Aplicação dos critérios de elegibilidade e triagem ultrassonográfica.....	42
4.3 Critérios de inclusão e exclusão e seleção da amostra final do ECR .....	42
4.4 Procedimentos de Randomização e Alocação .....	44
4.5 Protocolo de intervenção, instrumentos e procedimentos de coleta .....	44
4.5.1 Caracterização da Intervenção e do Placebo .....	44
4.5.2 Descrição do protocolo para uso dos sachês .....	45
4.5.3 Descrição dos procedimentos realizados antes, durante e nos intervalos das visitas de avaliação.....	46
4.5.4 Avaliação Médica .....	47
4.5.5 Avaliação Nutricional.....	48
4.5.6 Avaliação da prática de atividade física .....	50
4.5.7 Avaliações Radiológicas.....	51
A) <i>Ultrassonografia de abdome total</i> .....	51
B) <i>Ressonância nuclear magnética de fígado</i> .....	51
4.5.8 Avaliações Laboratoriais .....	51
<b>4.6 Definição dos desfechos e variáveis do protocolo do ECR.....</b>	<b>53</b>
4.6.1 Desfechos Clínicos .....	53
4.6.2 Desfechos Antropométricos e Nutricionais.....	54
4.6.3 Desfechos de Atividade Física .....	55
4.6.4 Desfechos Radiológicos .....	55
4.6.5 Desfechos Laboratoriais .....	57
<b>4.7 Análise dos dados.....</b>	<b>60</b>
4.7.1 Triagem e comparação entre os grupos com e sem DHGNA(Etapa1).....	60
4.7.2 Ensaio clínico randomizado.....	61

<b>4.8 Questões éticas .....</b>	<b>62</b>
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>63</b>
<b>5.1 Comparação dos grupos com e sem DHGNA (Etapa 1) .....</b>	<b>63</b>
5.1.1 Características dos participantes.....	63
5.1.2 Comparação dos parâmetros bioquímicos do sangue periférico entre participantes com e sem esteatose hepática.....	64
5.1.3 Perfil de correlações entre os parâmetros bioquímicos do sangue e a presença de DHGNA .....	67
5.1.4 Associações entre o grau de DHGNA e os valores dos parâmetros bioquímicos no sangue periférico .....	70
5.1.5 DHGNA e grau de perturbação bioquímica no sangue periférico.....	76
5.1.6 Associação entre DHGNA e níveis de TGF- $\beta$ e Hemoxygenase .....	77
<b>5.2 Ensaio Clínico Randomizado, Duplo-cego, Placebo controlado.....</b>	<b>78</b>
5.2.1 Caracterização dos grupos intervenção e placebo na linha de base .....	80
5.2.2 Efeito do uso do probiótico nos valores de PDFF e Rigidez hepática obtidos na RNM. ....	82
5.2.3 Efeito do uso do probiótico na gravidade da DHGNA.....	85
5.2.4 Efeito do uso do probiótico nos parâmetros bioquímicos hepáticos .....	86
5.2.5 Efeito do uso do probiótico nos parâmetros bioquímicos do metabolismo glicídico.....	88
5.2.6 Efeito do uso do probiótico nos níveis séricos de colesterol e triglicerídeos .....	90
5.2.7 Efeito do uso do probiótico nos valores de ferritina, PCR e vitamina D .....	92
5.2.8 Efeito do uso do probiótico nos parâmetros antropométricos e de bioimpedância. ....	92
<b>5.3 Adesão à intervenção.....</b>	<b>96</b>
<b>5.4 Avaliação da segurança do uso de dos probióticos <i>Lactobacillus Acidophilus</i> LA-5® e <i>Bifidobacterium Lactis</i>BB-12® em adolescentes obesos com DHGNA.....</b>	<b>97</b>
<b>5.5 Avaliação dos aspectos do consumo alimentar e atividade física relacionados ao uso dos probióticos <i>Lactobacillus Acidophilus</i> LA-5® e <i>Bifidobacterium Lactis</i> BB-12® em adolescentes obesos com DHGNA. ....</b>	<b>99</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>102</b>
<b>6.1 Triagem pré intervenção: Comparação entre grupos com e sem DHGNA .....</b>	<b>102</b>
<b>6.2 Ensaio clínico randomizado.....</b>	<b>109</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>121</b>
<b>8 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>123</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>124</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>138</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>187</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Ao longo das últimas décadas, a prevalência da obesidade vem aumentando de forma significativa, sendo considerada um dos principais problemas de saúde pública e uma epidemia global(1-6). O Brasil vem seguindo a tendência mundial com aumento da prevalência especialmente na população jovem, com dados demonstrando que, nos últimos 30 anos, o número de crianças e adolescentes com sobrepeso e obesidade progrediu de quatro para 18% e de 7,5 para 15,5% em meninos e meninas, respectivamente(1, 4-6).

A literatura evidencia o aumento da prevalência da obesidade infantil como um preditor de permanência da doença na idade adulta(7-10), aumentando com isso a associação de várias comorbidades relacionadas à obesidade, como dislipidemias, resistência periférica à insulina, diabetes mellitus tipo 2, hipertensão arterial, complicações ortopédicas, (8-10) bem como o aumento da incidência da doença gordurosa hepática não alcoólica (DHGNA)(11-13). Esta última como doença emergente em crianças e adolescentes obesos, que quando evolui sem tratamento da causa etiológica pode ter como principal complicação a cirrose hepática(12-15). A DHGNA é a causa mais comum de doença crônica hepática em adultos e crianças (11,16, 17). A DHGNA é definida como um termo genérico que engloba a esteatose hepática, esteatohepatite e a evolução para fibrose ou cirrose(18). A real prevalência da DHGNA na população pediátrica é desconhecida em função da falta de dados em literatura. Os escassos estudos disponíveis, sugerem que a esteatose hepática afeta 2,6% das crianças e 9,6% dos adolescentes, entretanto a sua prevalência pode variar entre 12 a 80% em crianças obesas (12,14,19).

A patogênese da DHGNA está parcialmente elucidada; descrita como multifatorial, a resistência periférica à insulina (RI) tem um papel importante, assim como o aumento do estresse oxidativo com produção de radicais livres causando inflamação e fibrose. Existem também descrições que relacionam a patologia da DHGNA a fatores genéticos (polimorfismos em genes produtores de citocinas pró-inflamatórias ou em genes de detoxificação de citocinas), além de fatores ambientais, tais como dieta, medicações ou a alterações da microbiota intestinal (20-22).

Vários autores descrevem o papel da microbiota intestinal na patogênese da DHGNA(15,18,23,24), inclusive sugerindo a sua implicação não só na indução da doença hepática, mas em sua progressão (19,20). Em pacientes com DHGNA, a permeabilidade intestinal e a prevalência de supercrescimento bacteriano intestinal estão presentes(21).

As recomendações primárias para o tratamento da DHGNA incluem mudanças dietéticas associadas a mudanças no estilo de vida. O tratamento medicamentoso incluindo o uso de antioxidantes, agentes anti-TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral), e probióticos, vem se mostrando promissor e, embora existam estudos nessa temática, ainda existe escassez de ensaios clínicos publicados, e essas terapias ainda não são consensuais para indicação prescritiva (22,23,25-28).

Os estudos com uso de probióticos são numerosos em literatura, especialmente os estudos experimentais em animais. Contudo, estudos em humanos ainda falham em sua metodologia, especialmente na forma de avaliação da gordura hepática, bem como na escolha de cepas específicas, tempo de intervenção e especialmente na escassez de estudos randomizados e bem controlados no tema (19,22,23,29). Por conta disso, em revisão sistemática conduzida pela COCHRANE, em 2007, há referência ao uso de probióticos para tratar as doenças hepáticas, inclusive a DHGNA como uma intervenção promissora. Ainda nesta revisão, os autores também relatam como dificuldades, a carência de estudos controlados e randomizados, bem como um padrão de definição das cepas de microrganismos a serem utilizadas e o tempo de intervenção(30).

Compreendendo que tanto a natureza da disbiose intestinal na obesidade, como a perda da integridade da barreira da mucosa intestinal, além dos mecanismos da resposta imunológica hepática aos fatores provenientes do intestino, são fatores relevantes para o desenvolvimento e progressão da doença, somando-se à escassez de ensaios clínicos sobre o tema na população pediátrica, novos dados provenientes de estudos bem desenhados nesse grupo populacional específico trarão informações relevantes para o aprimoramento na utilização de novas abordagens terapêuticas da DHGNA associada à obesidade na infância (31,32).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Verificar a eficácia do uso de *Lactobacillus Acidophilus* e *Bifidobacterium Lactis* na melhora dos parâmetros radiológicos, bioquímicos e antropométricos na Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) em adolescentes obesos.

### 2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o perfil laboratorial de adolescentes obesos com e sem DHGNA;
- Comparar o perfil laboratorial e de composição corporal de adolescentes obesos com e sem DHGNA;
- Testar a hipótese de que a suplementação de *Lactobacillus Acidophilus* e *Bifidobacterium Lactis* reduz os valores de aminotransferases e gama glutamil transferase(GGT) em adolescentes obesos com DHGNA;
- Verificar o impacto da suplementação com *Lactobacillus Acidophilus* e *Bifidobacterium Lactis* nos valores de HOMA-IR, insulina e ferritina séricos;
- Descrever os níveis de marcadores radiológicos de quantificação de gordura hepática (*Proton density fat fraction – PDFF*) antes e após intervenção;
- Verificar o impacto da suplementação com *Lactobacillus Acidophilus* e *Bifidobacterium Lactis* nos indicadores antropométricos para a avaliação da obesidade;
- Avaliar o impacto da suplementação com *Lactobacillus Acidophilus* e *Bifidobacterium Lactis* nos valores de percentual de gordura corporal da amostra estudada.

### **3 REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1 Obesidade como doença inflamatória multissistêmica**

A obesidade é descrita como uma doença de etiologia multifatorial, que resulta de um desequilíbrio entre a ingestão calórica e o gasto energético, determinado por fatores genéticos e ambientais, e cuja repercussão é o acúmulo excessivo de gordura no organismo, gerando complicações variadas. A OMS(Organização Mundial de Saúde) define a obesidade como excesso de gordura corporal com repercussões patológicas(33). O diagnóstico da obesidade é realizado de forma global com dados da história clínica, antecedentes familiares e neonatais, além das medidas antropométricas e avaliação laboratorial e radiológica.

Independente do critério diagnóstico utilizado, dados da literatura apontam o aumento da prevalência da obesidade infantil como um preditor de permanência da doença na idade adulta(34) e da associação de várias comorbidades amplamente descritas como relacionadas à obesidade, como dislipidemias, inflamações crônicas, resistência à insulina (RI), diabetes mellitus tipo 2 (DM2), hipertensão arterial, complicações ortopédicas, bem como o aumento da incidência da doença gordurosa hepática não alcoólica (DHGNA)(7,10,35,36,37,38).

Complementarmente, as crianças e adolescentes obesos também têm maior propensão a sofrerem de comorbidades psicológicas, como depressão, ansiedade, baixa autoestima, além de uma série de distúrbios emocionais e comportamentais (7).

O excesso de peso na infância e na adolescência tornou-se uma das preocupações mais importantes na saúde global, dado que, ao longo das últimas décadas a prevalência da obesidade vem aumentando de forma significativa, sendo considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) um dos principais problemas de saúde pública e uma epidemia mundial (1-6). Apesar de emergir como uma preocupação há várias décadas, as estatísticas continuam demonstrando que, com esse aumento na frequência da obesidade, ascendem, concomitantemente, as complicações associadas que contribuem com a elevação da morbimortalidade por doenças crônicas não transmissíveis na infância e adolescência, causas essas anteriormente descritas apenas na população adulta(5,7,39).



Estimativas recentes sugerem que mais de 340 milhões de crianças e adolescentes entre 5 e 19 anos de idade têm diagnóstico de sobrepeso ou obesidade, segundo os critérios da OMS (40). Os dados epidemiológicos evidenciam um aumento alarmante da prevalência da doença na faixa etária pediátrica que, em 1975 era de 4%, ou seja, 124 milhões de crianças e adolescentes afetados, e, em 2016, alcançou 18% (10,40,41). No Brasil, muito embora exista uma escassez de estudos de bases populacionais, os estudos disponíveis indicam que a prevalência entre adolescentes de diferentes cidades do país varia entre 15,3% e 29,1%, considerando os variados critérios diagnósticos (42-44).

Em geral, do ponto de vista epidemiológico e para estudos em grandes populações, o critério antropométrico baseado no índice de massa corporal (IMC) é utilizado. A OMS, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA (CDC, *Center for Disease Control and Prevention*) e a Força-Tarefa Internacional de Obesidade (IOTF, *International Obesity Task Force*) utilizam definições diferentes para sobrepeso e obesidade em crianças e adolescentes. A OMS utiliza o escore Z do indicador IMC/idade, de acordo com o gênero e a faixa etária, comparado a um parâmetro populacional previamente obtido com dados de crescimento de crianças e adolescentes de cinco países, incluindo o Brasil(44,45). De modo similar, o CDC-EUA utiliza a mesma estratégia, contudo, com base em dados populacionais de crianças e adolescentes norte-americanos (45). Diferentemente, a IOTF utiliza valores específicos de IMC para classificar as crianças como tendo sobrepeso ou obesidade, obtidos por interpolação estatística a partir dos valores de IMC de 25kg/m<sup>2</sup> e de 30 kg/m<sup>2</sup>, respectivamente (37, 38,45-47).

Em estudos de comparações entre os critérios diagnósticos para obesidade, observou-se que os critérios da IOTF mostraram maior especificidade, enquanto os critérios da OMS demonstraram maior sensibilidade (10). Como a abordagem da OMS fornece as estimativas mais elevadas de doença potencial, este é o método preferido pela maioria dos serviços para rastrear a obesidade em crianças mas, justamente por ter a melhor sensibilidade, incluirá mais casos falso-positivos, pois o IMC subestima o percentual de gordura corporal ou os níveis de adiposidade na população como um todo, e superestima a massa magra, como por exemplo, em atletas, cuja massa magra tem maior peso e o IMC seria mais elevado, não representando corretamente a alteração para o diagnóstico de obesidade (10).

Para além do uso do IMC, a quantificação da gordura corporal pode ser estimada através do uso de ferramentas científicas, tais como: i) aferição de dobras cutâneas; ii) avaliação da composição corporal através da análise bioimpedância elétrica, iii) pletismografia por deslocamento de ar e iv) a ferramenta atualmente descrita como mais precisa, a absorciometria de raio-X de energia dupla (DEXA, *Dual-energy X-ray absorptiometry*). Em comum, todos esses métodos são de difícil uso rotineiro na prática clínica diária, alguns pela reprodutibilidade em indivíduos muito obesos, como aferição de dobras cutâneas; outros por dificuldade de acesso em maior escala, como a pletismografia e o DEXA, ou pela dificuldade de precisão da mensuração, como na bioimpedância e aferição de dobras cutâneas(10,37).

O tecido adiposo é considerado um importante órgão endócrino e metabólico, tendo os adipócitos como secretores de diversos hormônios que interferem na regulação cerebral da fome e saciedade, bem como no gasto energético. Atualmente, já foram identificados mais de 400 genes que codificam elementos que atuam na regulação do peso corporal, interferindo na ingestão alimentar, no gasto energético ou em ambos.

Nessa perspectiva, a obesidade e a síndrome metabólica são atualmente reconhecidas como condições de inflamação crônica (48), promovidas e mantidas pela expressão hormonal dos adipócitos. Entre as diversas adipocinas produzidas, a leptina é a principal adipocina com ação pró-inflamatória, cujos níveis encontram-se elevados na obesidade(49-51). Sua principal função é como sinalizadora da saciedade, e sua ação aumenta o gasto energético e o metabolismo lipídico.

Os níveis séricos de leptina se correlacionam positivamente com a massa adiposa, indicando a ocorrência de resistência à leptina, por isso, indivíduos obesos apresentam níveis elevados de leptina sem respostas anoréxicas esperadas(51,52). Como um contraponto à leptina, a adiponectina, tem papel anti-inflamatório, e protege contra a disfunção metabólica relacionada à obesidade, resistência à insulina e acúmulo de ácidos graxos livres (AGL). Na obesidade descreve-se níveis reduzidos dessa adipocina (49-51).

A ação da leptina também se associa a uma desregulação do metabolismo lipídico, com elevação dos níveis de AGL e redução da oxidação dos mesmos, causando acúmulo intracelular de lipídios e lipoproteínas. Todo esse processo ocasiona uma disfunção celular em diversos

tecidos (músculo cardíaco, hepatócitos, rins e células beta pancreáticas) (49-51). Como consequência, os AGL, colesterol e seus metabólitos aumentam a expressão de citocinas inflamatórias, incluindo o fator de crescimento do endotélio vascular, IL6 e TGF- $\beta$  (53, 54). Evidências recentes sugerem que o acúmulo de lipídios leva à lesão mitocondrial, o que contribui com a evolução dos danos a diversos órgãos (55).

### **3.2 DHGNA e Resistência à insulina**

A DHGNA é a causa mais comum de doença crônica hepática em adultos e crianças(12,16,56). É definida como um termo genérico que engloba a esteatose hepática, esteatohepatite e a evolução para fibrose ou cirrose (18).

A DHGNA é compreendida como uma doença multissistêmica e de fisiopatologia complexa, que pode acometer vários órgãos além do fígado e relacionar-se com doenças crônicas extra-hepáticas, em especial diabetes mellitus tipo 2, doença crônica vascular e doença renal crônica (57).

Considerada como a repercussão hepática da síndrome metabólica, a sua prevalência aumenta em consonância com o aumento da prevalência da obesidade e é proporcional à gravidade da síndrome metabólica (58). A real prevalência da DHGNA na população pediátrica é desconhecida em função da falta de informação em literatura, além de variar amplamente a depender dos métodos diagnósticos utilizados e das características da população estudada(12, 59). Os dados disponíveis sugerem que a esteatose hepática afeta cerca de 2,6% das crianças e 9,6% dos adolescentes, embora a sua prevalência varie entre 12 e 80% em crianças obesas(12,14,19).

Dados de uma revisão sistemática com metanálise sobre a prevalência da DHGNA em crianças e adolescentes, descreveu, em estudos populacionais, uma prevalência média geral de 7,6% e, em populações obesas, essa frequência aumentou para 34,2% (12), reforçando a associação entre obesidade a alteração hepática.

No Brasil não existem dados muito precisos sobre a prevalência de DHGNA na população pediátrica. Alguns estudos demonstram que a frequência da doença varia conforme o IMC, a idade, o sexo e a origem étnica, sendo maior no sexo masculino, quanto maior o IMC e a idade

(12, 53). Os estudos que descrevem maior prevalência de DHGNA na população pediátrica adolescente (entre 11 e 19 anos), relatam o dobro da frequência em crianças do sexo masculino (12,17,18). Entre adolescentes, as alterações de composição corporal e de níveis hormonais, associadas à resistência fisiológica à insulina da puberdade, juntamente com aspectos comportamentais, como as escolhas alimentares e ao sedentarismo, mais frequente nesta faixa etária do que na infância, contribuem para o desenvolvimento da obesidade e, conseqüentemente, da ocorrência da DHGNA(56).

Em relação às diferenças sexuais na frequência da DHGNA relatadas como mais impactantes entre homens, também são descritas diferenças quanto ao risco de evolução para esteatohepatite, mais comuns também entre os meninos (12,17,18). Isso se deve ao fato de que os estrógenos atuam como protetores contra apoptose celular, têm efeito anti-fibrinogênico e reduzem a peroxidação lipídica, uma das principais vias que se acredita aumentar o risco de progressão da DHGNA para esteatohepatite (54).

A história natural da DHGNA parece variar de acordo com o tipo histológico. Assim, a esteatose, fase inicial da doença, pode evoluir para esteatohepatite, fibrose e posteriormente cirrose. Dados limitados de literatura sobre a evolução da doença na faixa etária pediátrica sugerem maior morbimortalidade nesse grupo, quando comparados aos adultos, pois considera-se doença de início precoce, podendo representar um fenótipo mais agressivo. Descreve-se cerca de quinze a vinte por cento das crianças com DHGNA apresentando fibrose igual ou superior ao estágio 3 no momento do diagnóstico(18,60-62).

A patogênese da DHGNA está parcialmente elucidada. Geralmente, se aceita a hipótese intitulada de “múltiplo hit”, enfatizando o papel dos AGL circulantes e da RI. Descrita como um dos principais fatores na patogênese da DHGNA, a RI é considerada uma resposta metabólica inadequada à ação da insulina nas células de vários tecidos, como o muscular, adiposo e hepático(54). Assim, na obesidade, a presença da resistência à insulina associada a um estilo de vida sedentário e a hábitos alimentares inadequados causam uma redução na oxidação de lipídios do músculo esquelético e promovem a lipogênese hepática *de novo*(20). Fisiologicamente, a insulina controla a produção hepática de glicose regulando a lipólise dos adipócitos, levando à diminuição do fluxo de ácidos graxos para o fígado (56). A gordura pode se acumular no fígado na forma de triglicérides ou de AGL, em que o primeiro não tem potencial hepatotóxico descrito e, em contrapartida, o segundo causa disfunção mitocondrial e

produção de radicais livres, causando com isso, disfunção no retículo endoplasmático celular(56). O acúmulo dessa gordura nos hepatócitos associados ao estresse oxidativo e à inflamação que se segue, da doença hepática, que resulta em esteatohepatite, conhecida como NASH (*Non-Alcoholic SteatoHepatitis*) e, após alguns anos, pode resultar em fibrose e cirrose (56, 63). O acúmulo dessa gordura nos hepatócitos associados ao estresse oxidativo e à inflamação que se segue, culminarão na doença hepática progressiva, resultando em esteatohepatite, conhecida como NASH (*Non-Alcoholic SteatoHepatitis*) e que, após alguns anos, poderá vir a transformar-se em fibrose e cirrose (56,63).

### **3.3 A microbiota intestinal na obesidade e as repercussões no eixo intestino-fígado**

O corpo humano abriga mais de 10–100 trilhões de microorganismos, incluindo bactérias, arqueas e eucariotos, protozoários e fungos. De fato, existem 10 vezes mais cepas microbianas que células humanas em um indivíduo adulto, o que contribui para que o homem tenha 100 vezes mais genes bacterianos que os existentes em seu próprio genoma humano. São mais de mil espécies bacterianas em relação de simbiose com o organismo, exercendo funções e interferindo diretamente, especialmente no metabolismo energético, regulação hormonal e na imunidade (64-67).

A microbiota é definida como sendo a comunidade microbiana associada ao corpo (incluindo bactérias, bacteriófagos, fungos, protozoários e vírus) e os seus genes (microbioma) (68). A colonização bacteriana se inicia no útero e é alterada de forma dinâmica ao longo da vida. O microbioma da criança difere muito do adulto, iniciando com baixa diversidade e tornando-se gradualmente mais complexo com o tempo (64,68-69). De fato, o microbioma infantil é altamente moldado pela via de parto (vaginal ou cesárea), pelo contato materno (microbiota materna), ingestão do colostro e, pela ingestão do leite materno, contato com microrganismos ambientais, bem como pela exposição precoce a antibióticos (64,68-71).

A composição da microbiota infantil evolui e torna-se mais parecida com a dos adultos por volta dos três anos de idade, muito embora só na idade adulta a microbiota atinge seu pico de complexidade, em termos de quantitativos de bactérias, diversidade e estabilidade genética(71-72). Por ser moldada também por condições ambientais, a microbiota sofre alterações em diferentes regiões geográficas, a depender do tipo de alimentação (68-69)

A maior parte das bactérias que compõem a microbiota humana está localizada no sistema digestório, predominantemente no cólon, embora a pele, a cavidade oral e vagina tenham a sua microbiota específica(66). Estima-se que entre 1000 e 1150 espécies bacterianas colonizam o sistema digestório humano, com cada indivíduo abrigando cerca de pelo menos 160 dessas espécies (71-72).

Os principais filos que representam cerca de 90% da microbiota do sistema digestório são: Firmicutes e Bacteroidetes, mas descreve-se ainda os filos Actinobacteria, Proteobacteria e Verrucomicrobia, bem como Archaea (66,72). Cada filo contém gêneros distintos de bactérias; o Firmicutes possui mais de 250 gêneros, incluindo *Lactobacillus*, *Mycoplasma*, *Bacillus*, e *Clostridium*, dentre outros organismos produtores de butirato. Os Bacteroidetes, por sua vez, possuem cerca de 20 gêneros, dos quais o gênero mais abundante é o *Bacteroides*, mas também são representados por *Prevotella* e *Xylanibacter*, responsáveis pela degradação de muitos glicanos complexos. O filo Archaea é representado pelo *Methanobrevibacter smithii*, responsável pela produção de metano na luz intestinal(66) Os remanescentes 10% incluem as Actinobactérias Gram-positivas e as Proteobactérias Gram-negativas e os Verrucomicrobia(72).

A microbiota intestinal exerce várias funções, dentre elas pode-se destacar a fermentação das fibras dietéticas, atuando como fonte adicional de energia para o hospedeiro, síntese de vitaminas e outros compostos bioativos que são absorvidos pelo epitélio intestinal, interferindo em funções metabólicas diversas, além de exercer várias funções imunológicas, endócrinas e relacionadas à regulação neural(71).

A disbiose intestinal é uma condição na qual a homeostase bacteriana intestinal está alterada. As alterações no conteúdo bacteriano, bem como em suas funções metabólicas, ou quaisquer alterações na distribuição bacteriana no intestino, que estão associadas a um estado de doença, podem ser caracterizadas como disbiose (73).

Os estudos que comprovaram a atuação da microbiota intestinal na obesidade inicialmente foram experimentais, com camundongos descritos como "germ free", ou seja, com intestino livre de germes, nos quais observou-se a ausência de obesidade, ainda que submetidos a dieta obesogênica. Adicionalmente, quando esses recebiam transplante fecal dos seus pares obesos,

desenvolviam a patologia. Novas descobertas em estudos experimentais demonstraram que camundongos obesos possuíam níveis mais elevados de Firmicutes e níveis mais baixos de Bacteroidetes do que seus irmãos magros, da ninhada(66,72-75). Tais achados em modelos animais sugeriram um papel relevante da microbiota intestinal na etiologia da obesidade.

Em humanos, vários estudos observacionais descrevem maior abundância do filo Firmicutes e menor abundância de Bacteroidetes em obesos, quando comparados com suas contrapartes magras (71-72).

De fato, apesar das diferenças anatômicas e de composição da microbiota entre humanos e camundongos, alguns estudos que utilizaram sequenciamento genético, descrevem menor ou maior abundância do filo Bacteroidetes, maior abundância do filo Firmicutes e maiores concentrações de lactobacilos na microbiota intestinal de adultos obesos e com sobrepeso, em comparação com indivíduos magros(64,75).

A obesidade também tem sido associada à menor diversidade da microbiota, que por sua vez, está diretamente associada às diferenças na capacidade metabólica, fatores importantes na patogênese da doença (72,74). Dados de literatura demonstram que crianças com sobrepeso tendem a ter um quantitativo menor de lactobacilos na sua microbiota e um número mais elevado de *B. fragilis* aos seis meses de idade(76). Uma vez que os dados trazem evidências acerca do papel da microbiota na etiologia da obesidade, torna-se importante compreender por quais mecanismos esse efeito pode ser explicado. Existem vários mecanismos descritos, relacionando a ação da microbiota intestinal na obesidade, sendo os principais, os que seguem:

- 1) **Aumento da absorção de nutrientes, maior disponibilidade de calorias e aumento da lipogênese:** em estudos experimentais com camundongos, observou-se aumento da captação de monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos não absorvidos da dieta pelo colón, associado ao aumento na quantidade de capilares no endotélio epitelial. Essa condição aumenta a disponibilidade hepática desses carboidratos, que são fermentados, em parte, pelos componentes da microbiota colônica, que produzirá os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), especialmente acetato, propionato e butirato, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e hidrogênio (H<sub>2</sub>). Dentre estes AGCC, o butirato é utilizado como substrato energético principal para os enterócitos. Adicionalmente, o acetato e o propionato são absorvidos e utilizados pelo fígado como substratos para a lipogênese e a gliconeogênese, resultando em

maior disponibilidade de calorias para o hospedeiro, na forma de gordura para os tecidos periféricos, aumentando a gordura corporal total. Esse mecanismo pode fornecer até 10% da ingestão calórica diária, dependendo do conteúdo da dieta. Estudos de metagenômica já identificaram que os genes responsáveis pela síntese de AGCC são comumente expressos pela microbiota colônica (65,66,71,72). Além dessa atuação já descrita, os AGCC são capazes de atuar nas células endócrinas intestinais, regulando a liberação de glucagon like peptídeo (GLP-1), interferindo na homeostase do apetite, e no metabolismo lipídico e glicídico(72). Especificamente em relação às alterações hormonais promovidas pelos AGCC, é descrito que o acetato aumenta a liberação de leptina pelas células de gordura; o butirato e o propionato aumentam a secreção de PYY (peptídeo YY) e GLP-1 no intestino e as taxas de lipólise e lipogênese nas células de gordura. Ressalta-se que a regulação do apetite via hipotálamo ocorre, diretamente, através da secreção de GLP-1 e do PYY(71).

- 2) **Redução da atividade do fator adiposo induzido pelo jejum (Fiaf):** o Fiaf é um supressor da lipoproteína lipase (LPL) do tecido adiposo e a redução da sua atividade leva ao aumento da captação celular de ácidos graxos e consequente armazenamento de triglicerídeos nos adipócitos(64,66,70,72,74). Alguns componentes da microbiota gastrointestinal são capazes de suprimir a expressão de genes do hospedeiro para algumas proteínas, como o Fiaf, sendo esse mecanismo um promotor de lipogênese. Outro achado já descrito na literatura corresponde ao fato de que a microbiota oriunda de uma dieta rica em gordura, reduz a expressão dos genes do hospedeiro que codificam proteínas responsáveis pelas ligações intercelulares do epitélio intestinal. Como será descrito adiante, essa redução aumenta a permeabilidade da mucosa a alguns fatores que promovem aumento da inflamação e alteram o funcionamento hormonal intestinal(64,72,77).
  
- 3) **Promoção da Inflamação:** A obesidade é descrita como uma doença associada à inflamação crônica, e a microbiota intestinal tem importante contribuição nesse aspecto. Descrita como contendo mais bactérias gram-negativas, a microbiota do obeso estimula a inflamação através dos seus lipossacarídeos (LPS), que são componentes da parede celular dessas bactérias. Esse componente exerce um papel importante na gênese da inflamação e resistência à insulina. Através da sinalização com os *Toll Like Receptor* (TLR), os macrófagos são estimulados a produzirem citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6, contribuindo assim para a resistência à insulina e aumentando o estoque de lipídios



no tecido adiposo(66,71,72). A consequente inflamação sistêmica de baixo grau tem sido implicada no desenvolvimento de aterosclerose e DM2I(72). Assim, esses mecanismos não apenas contribuem para o ganho de peso, mas também para o desenvolvimento de processos patogênicos crônicos e progressivos.

Neste processo fisiopatogênico, o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica desempenham um papel importante na patogênese da DHGNA, pois seus produtos finais podem induzir lesão hepatocelular e fibrogênese. O fígado é o principal órgão que desintoxica o excesso de moléculas de heme- pela ação da heme-oxigenase. A heme oxigenase-1 (HO-1) é uma proteína responsiva ao estresse, que desempenha um papel fundamental contra o estresse oxidativo, pois ao clivar o radical heme- (pró-oxidante) promove a liberação de monóxido de carbono, biliverdina, bilirrubina e ferro livre. Esses produtos atuam com atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e antiapoptóticas. A superprodução de biliverdina e bilirrubina serve como um mecanismo de defesa antioxidante, ou seja, inibindo a oxidação do LDL (78,79).

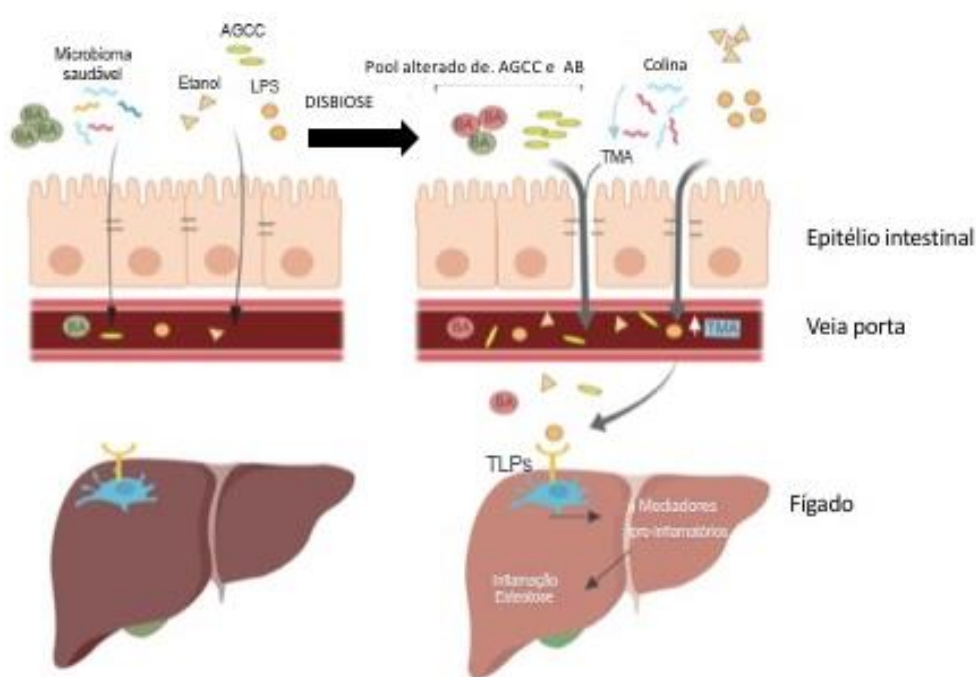
O TGF- $\beta$  é membro de uma família de citocinas com atividade multifuncional. Durante a fibrogênese hepática, as células estreladas no fígado produzem TGF- $\beta$ , e os seus níveis séricos se elevam em pacientes com DHGNA, e em maiores proporções naqueles que evoluem para NASH. O TGF- $\beta$  controla a deposição da matriz extracelular das proteínas de cicatrização, como colágeno, fibronectina, proteoglicanos e ácido hialurônico. Embora os estudos sobre essa citocina e DHGNA, ainda sejam escassos, têm sido descritos níveis séricos mais elevados em pacientes com DHGNA e, significativamente maiores, naqueles que evoluem para NASH. Esse achado potencializa essa citocina ao papel de potencial marcador bioquímico, não invasivo, de evolução para fibrose hepática (80,81).

Diversos avanços tecnológicos foram desenvolvidos na última década para caracterização da microbiota intestinal, especialmente a tecnologia de sequenciamento de alto rendimento que possibilitou o conhecimento da composição do microbioma e suas funções, suas relações com patologias diversas, especialmente as doenças metabólicas, sendo as mais prevalentes a DM2 e obesidade(82).

A DHGNA, especialmente a NASH em estágio mais avançado, representa uma das comorbidades comuns da obesidade e DM2 na adolescência. Essas três condições clínicas

compartilham mecanismos comuns no processo fisiopatológico(82,83). De fato, a resistência à insulina é considerada como fator de maior importância na patogênese da DHGNA, como já descrito anteriormente, na teoria de múltiplos insultos (*multiple hits*). Neste caso, o acúmulo hepático de gordura é o primeiro insulto, sendo a resistência à insulina, responsável por essa ocorrência, seguida de múltiplos fatores que perpetuam a patogênese da doença (84,85,86). Ilustrado na Figura 1.

**Figura 1 - Eixo intestino -fígado na DHGNA (Hipótese de múltiplos insultos)**



Do lado esquerdo, os componentes do eixo intestino-fígado na sua função normal; do lado direito, o status DHGNA. O microbioma disbiótico, associado ao aumento da permeabilidade de barreira intestinal com a translocação de alguns produtos bacterianos para a veia porta, especialmente o LPS. Esses produtos bacterianos interagem com os receptores Toll-like (TLRs) na superfície das células hepáticas, desencadeando respostas inflamatórias, contribuindo para o desenvolvimento da DHGNA. Abreviaturas: AB= Ácidos biliares; AGCC= Ácidos graxos de cadeia curta; LPS=Lipopolissacarídeo ; TMA = Trimetilamina ; TLRs = Receptor Tool-like . Adaptada de Safari, *et al.* ,2020(86)

No estado de resistência à insulina ocorre um estímulo para a lipogênese hepática *de novo*, e também uma função potente em suprimir a lipólise a nível de tecido adiposo, aumento com isso o efluxo de AGL para o fígado (84,86). Esse processo resulta no acúmulo de gordura nos hepatócitos e, posteriormente, na evolução para um processo inflamatório, a esteatohepatite,

que culmina na ocorrência de fibrose e cirrose hepáticas. Destaca-se que todo esse processo tem no estado de resistência à insulina uma condição fundamental para seu desenvolvimento. Fatores genéticos ou alterações epigenéticas podem interferir no conteúdo de gordura hepático, contribuindo para a progressão para inflamação (NASH) e fibrose. A cascata de sinalização da insulina em pacientes com DHGNA sofre ação direta de fatores ambientais (dieta rica em gordura ou frutose e a disbiose intestinal), contribuindo para além do desenvolvimento da doença, como também para a sua progressão(84-87).

Os principais mecanismos associados ao caminho fisiopatogênico da microbiota intestinal e a DHGNA estão descritos a seguir:

- A) Produção de LPS por bactérias gram-negativas:** como já descrito previamente, a microbiota do obeso tem composição diferente, possuindo mais bactérias do filo bacteroidetes e mais bactérias gram negativas produtoras de LPS. Essas bactérias atuam diretamente nos receptores PAMPs (padrão de moléculas associada a patógenos) e os principais são os receptores *Toll like* (especialmente os TL4 e TLR5), induzindo uma resposta inflamatória marcada, especialmente, pela maior produção de IL6 e TNF-alfa, que aumentam a permeabilidade da mucosa intestinal. Esse processo resulta na elevação dos níveis plasmáticos de LPS, com piora da resposta à insulina e, por conseguinte, interferindo também na patogênese da DHGNA (82,85,87).
  
- B) Produção de Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC):** os AGCC produzidos pela microbiota intestinal exercem um papel importante na função de barreira intestinal, tem efeito anti-inflamatório e promovem maior oxidação de AGL, além de aumentar o gasto energético (85). Logo, esse processo desfavorece o surgimento e a progressão da obesidade. Contudo, uma redução na população de bactérias que produzem determinados tipos de AGCC podem contribuir com a resistência à insulina. Os AGCC são importantes em diversas funções no epitelial intestinal. O butirato, por exemplo, aumenta a produção de muco e afeta a expressão de proteínas responsáveis pelas junções firmes intercelulares dos enterócitos. Assim como o butirato, o acetato também exerce função de proteção da barreira intestinal. Ambos podem aumentar a oxidação de ácidos graxos e o gasto energético, reduzindo o peso corporal. Dentre os efeitos anti-inflamatórios recentemente conhecidos do butirato, está a indução de geração

extratímica de células  $T_{reg}$  anti-inflamatórias que, no tecido adiposo, reduzem a infiltração macrofágica, um fator que melhora a resistência à insulina(85).

**C) Metabolismo de ácidos biliares e produção de aminoácidos de cadeia ramificada:**

Os ácidos biliares são reconhecidos como importantes reguladores do metabolismo lipídico. As bactérias intestinais atuam sobre os ácidos biliares primários, gerando os ácidos biliares secundários. Estes ativam os receptores TLR5, que ativam a secreção de GLP1 nas células intestinais, resultando no efeito protetor para a resistência à insulina(85). Os ácidos biliares também se ligam ao receptor Farsenóide X (FXR) que é um fator de transcrição para controle de funções metabólicas. O papel da microbiota intestinal na regulação da diversidade na produção de ácidos biliares secundários via receptor FXR é bem reconhecido, pois em pacientes com DHGNA têm menor diversidade na *Pool* de ácidos biliares(85,86,89). Outro mecanismo interligado ao processo de RI e DM2 corresponde ao aumento dos níveis de aminoácidos de cadeia ramificada (*branched-chain amino acids* - BCAA)circulantes. Os mecanismos que correlacionam a resistência à insulina e os níveis de BCAA circulantes ainda são controversos, mas a microbiota intestinal parece ser uma fonte importante de leucina, isoleucina e valina(85).

De fato, os ácidos biliares produzidos em resposta a uma dieta rica em gordura também promovem crescimento de Clostridium, agente envolvido no aumento da produção de BCAAs por proteólise(85). Adicionalmente, comparando a microbiota intestinal de pacientes portadores de DHGNA, com indivíduos sem a doença, observou-se que havia maior quantidade intestinal de bactérias gram-negativas no grupo com doença hepática. Os autores informam uma elevação de até 20% para bactérias do filo Bacteroidetes, em pacientes com DHGNA e, redução de até 24% de Firmicutes, especialmente os gêneros produtores de AGCC. Associado, ocorreu também elevação nos gêneros de bactérias produtoras de LPS(86).

**D) Aumento da permeabilidade da mucosa intestinal e inflamação:** o aumento da permeabilidade intestinal está relacionado à função das junções intercelulares do epitélio intestinal. Em estudos experimentais foi observado que camundongos deficientes na molécula de adesão juncional A (JAM-A) apresentam um aumento da permeabilidade intestinal(90). Esse aumento da permeabilidade permite que produtos

derivados das bactérias intestinais, especialmente o LPS, o peptidoglicano e o DNA (ácido desoxirribonucleico) bacteriano possam atingir a veia porta e assim ativar os TLRs nas células de Kupffer, levando a uma cascata inflamatória e com isso piorando a resposta à insulina responsável pela patogênese da DHGNA e potencializando a evolução para esteatohepatite e fibrose (90).

**E) Consumo de energia e fermentação anaeróbica:** a microbiota intestinal atua no metabolismo energético do hospedeiro, contribuindo para o desenvolvimento ou piora da obesidade e resistência à insulina, condições que se associam, fortemente, à DHGNA. Essas bactérias que compõem a microbiota, fermentam polissacarídeos não digeríveis, gerando monossacarídeos e AGCC, aumentando a extração de energia por parte do hospedeiro. Descreve-se a atuação dos AGCC na termogênese e gasto energético, no controle da saciedade, na ativação de gliconeogênese, modulação da inflamação intestinal e na regulação de hormônios intestinais, especialmente o GLP1 e o PYY. Existe ainda a descrição do aumento da atividade de lipase lipoproteica (LPL), aumentando o acúmulo de gordura hepática, além da alteração da motilidade intestinal contribuindo com maior absorção(70,86,90).

O butirato exerce uma função de proteção de barreira de mucosa intestinal e aumento do gasto energético do hospedeiro. Nos pacientes com DHGNA, observa-se supercrescimento bacteriano em intestino delgado e na disbiose intestinal predominam bactérias gram negativas produtoras de LPS (83,91). A abundância de Bacterioides correlacionou-se com redução de produção de AGCC(92). Similarmente descrito na população pediátrica com Bacteroidetes mais abundantes e Firmicutes menos abundantes, bem como proporções mais elevadas dos gêneros Prevotella e Escherichia(93).

**F) Regulação do metabolismo da colina:** a colina é essencial para a produção de VLDL (Very Low Density Lipoprotein) colesterol e para a transferência hepática de gordura. Dietas isentas de colina são utilizadas em estudos experimentais para induzir a DHGNA em animais. A redução da colina, além de reduzir o VLDL, reduz a beta oxidação, causando depósito de AG e colesterol, aumentando o estresse oxidativo, o que resulta em alterações em citocinas e adipocinas com leve infamação hepática. A microbiota intestinal tem um papel fundamental na conversão da colina em dimetilamina e

trimetilamina, reduzindo assim os níveis de colina, contribuindo para o dano hepático (70,83,86).

**G) Produção endógena de etanol:** o etanol é um metabólito microbiano derivado da fermentação sacarolítica e alimentação cruzada da microbiota intestinal. A literatura descreve que pacientes com NASH e obesidade possuem maior quantidade de bactérias produtoras de etanol nas fezes, bem como concentrações aumentadas de etanol na circulação sistêmica e respiração(91,94). O etanol derivado das bactérias intestinais (ou o metabólito oxidado acetaldeído) está possivelmente envolvido na progressão da DHGNA por meio de ação hepatotóxica direta, além de interferir na função de barreira intestinal, resultando em aumento da endotoxemia, contribuindo ainda mais para a progressão da DHGNA e evolução para NASH (91,94).

### 3.4 Avaliação diagnóstica na DHGNA

A DHGNA é frequentemente assintomática. Assim, a triagem para a doença tem indicação para que se inicie o tratamento precoce e busque evitar a progressão para doença hepática irreversível, que é a fibrose e, posteriormente, a cirrose. A identificação precoce da doença permite implementar medidas de mudanças de estilo de vida, que se mostraram eficazes na reversão da DHGNA e até mesmo da NASH (18).

A NASPGHAN (*North American Society For Pediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition*) recomenda a utilização de dosagem da Aminotransferase de alanina (ALT) como exame de triagem. A dosagem desse marcador bioquímico está universalmente disponível, tem baixo custo e é minimamente invasivo. Apesar de ser descrito como possuidor de boa sensibilidade, existe grande divergência na literatura a respeito de quais medidas de referência devem ser utilizados para a triagem da DHGNA(18). Valores de ALT acima de 50 U/L, em meninos, e acima de 44 U/L, em meninas, eram descritos como níveis de alerta para a presença de DHGNA(13). Embora, em 2010, Schwimmer *et al.* propuseram usar um valor de referência mais baixo, respectivamente de 25 U/L e 22 U/L, para meninos e meninas(95).

A Academia Americana de Pediatria, nas suas diretrizes de 2007 já recomendava a triagem bianual com dosagens de AST e ALT (aminotransferase de aspartase), a partir dos 10 anos de

idade para crianças com diagnóstico de obesidade e para as que apresentavam sobrepeso com fatores de risco associados. Adicionalmente, se os níveis de ALT e AST ultrapassassem duas vezes o limite superior da normalidade, havia recomendação de encaminhamento ao especialista(96). Em recente publicação de algoritmo de diagnóstico e tratamento da obesidade, Cuda & Censani (2019) já recomendam a triagem com dosagens das enzimas hepáticas em crianças obesas ou com sobrepeso possuindo 2 ou mais fatores de risco associados, já a partir dos 2 anos de idade(97).

Apesar do uso dos valores de ALT em pontos de corte mais baixos para identificar possíveis crianças e adolescentes com acúmulo de gordura hepática(95), há descrição de anormalidades histológicas, incluindo fibrose significativa, em crianças que apresentavam níveis normais ou apenas levemente elevados de ALT. Isso indica que a dosagem de ALT isolada não é uma ferramenta de rastreamento ideal para a presença de DHGNA(15,98). A ALT, quando elevada pode representar a evolução para esteatohepatite e subseqüentemente para fibrose. Os sinais clínicos potenciais de maior risco para fibrose em crianças com esteatohepatite são: ALT elevada (geralmente  $>80$  U/L), esplenomegalia e a relação  $AST/ALT < 0,8$  (18,99). Adicionalmente, a presença de panhipopituitarismo e DM2 são fatores de risco clínicos conhecidos para esteatohepatite e fibrose avançada (15,56,99).

De forma a complementar o processo de investigação inicial para a presença de esteatose hepática, os exames de imagem também são descritos como métodos de triagem diagnóstica da DHGNA. A ultrassonografia de abdome, apesar de ser um método fácil e disponível, apresenta baixa especificidade e sensibilidade para o diagnóstico da doença, especialmente em crianças cujo percentual de hepatócitos acometidos é inferior a 33% (100). Adicionalmente, o método ultrassonográfico é impreciso na quantificação da esteatose em crianças com DHGNA(18). Assim, exames radiológicos mais acurados, tais como a tomografia computadorizada (TC) e a ressonância nuclear magnética (RNM), têm sido propostos, apesar de terem acesso mais restrito, especialmente para crianças de menor idade. Apesar de ambos serem métodos de custo elevado, alguns centros pediátricos já o utilizam para o diagnóstico da DHGNA(15,18).

Dados de estudos em adultos e crianças mostram que a TC de abdome apresenta sensibilidade de 46% a 72% e especificidade de 88% a 95% no diagnóstico da DHGNA. Seu uso porém, como teste de triagem para DHGNA, é inadequado devido à elevada exposição radiológica, acentuada

pelo acesso mais restrito e à necessidade de sedação em crianças menores(101). A RNM foi validada e demonstra ser um método preciso para a detecção e quantificação da esteatose hepática em adultos e crianças(102). Através da RNM ocorre a quantificação da esteatose hepática através da fração de gordura de densidade de prótons (PDFF - *Proton Density Fat Fraction*), com elevada acurácia(103-105). Adicionalmente, a elastografia, método aplicado durante a realização da ressonância, identifica o grau de fibrose e é importante para estabelecer o diagnóstico de NASH e cirrose (15,103-105).

Definida como o padrão ouro para o diagnóstico acurado do estágio da DHGNA, a biópsia hepática é pouco realizada em pacientes pediátricos, devido à invasibilidade e riscos de complicações. Está indicada para a avaliação da DHGNA em crianças com risco aumentado de esteatohepatite e/ou fibrose avançada (13,18,56).

### **3.5 O uso dos probióticos como opção terapêutica para a DHGNA**

As modificações no estilo de vida (dieta e atividade física) são o principal tratamento para DHGNA. Vários estudos, mesmo com metodologia heterogênea e tempo de tratamento variado, demonstraram eficácia dessas mudanças na obesidade e, conseqüentemente, na DHGNA. Embora saibamos que em adultos a redução de 10% do peso corporal impacta em até 90% de regressão da esteatohepatite, não existem evidências suficientes que determinem qual o grau de redução do IMC/idade ou qual percentual de perda ponderal é necessário para a melhora da DHGNA em crianças e adolescentes(18, 56).

Em relação a medidas farmacológicas, embora existam ensaios clínicos para o tratamento da DHGNA na população pediátrica, esses são escassos. Ademais, apresentam algumas limitações importantes, como a ausência de padronização dos critérios diagnósticos, a ausência de randomização e a ausência de grupo controle, com abordagens de intervenção variadas. Somase a isso, o fato de que a realização de estudos que envolvem o tratamento da DHGNA pediátrica é de difícil execução, uma vez que não existem ainda padronizados biomarcadores não invasivos validados para a faixa etária, e o conhecimento preciso da história natural de evolução da doença ainda não é ser uma realidade totalmente elucidada(30,56,99).



A despeito das dificuldades observadas, alguns fármacos têm sido avaliados no tratamento da DHGNA. A metformina e a vitamina E são os medicamentos mais testados em ensaios clínicos ou estudos de coorte(18). O estudo TONIC foi um importante ensaio clínico multicêntrico, que envolveu 173 crianças e adolescentes de 8 a 17 anos. Esse estudo realizado em três braços (uso de metformina, vitamina E o aconselhamento sobre mudança de estilo de vida), e cujo desfecho primário foi a redução sustentada de ALT e secundário, a alteração histológica, realizada em um subgrupo, porém não foi observada diferença quanto ao uso da metformina em relação ao grupo placebo, mas observou melhora histológica no grupo que utilizou a vitamina E (106).

Outros estudos posteriores não demonstraram superioridade da Vitamina E em relação às mudanças de estilo de vida (107,108). De modo similar, estudos envolvendo o uso do ácido ursodesoxicólico também não demonstraram a sua eficácia no tratamento da DHGNA pediátrica (18,56). Entretanto, campo dos nutracêuticos, há referência ao uso de probióticos para tratar as doenças hepáticas, inclusive a DHGNA como uma intervenção promissora(30).

Probióticos são definidos pela OMS como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro(109). Para ser classificado como probiótico, o produto deve ser definido taxonomicamente (gênero, espécie e nível de cepa), e os benefícios de segurança e saúde devem ser apoiados por dados de estudos reproduzíveis em humanos (109).

Em estudos variados em modelos animais, são descritos efeitos benéficos do uso de probióticos na perda ponderal, na resistência à insulina e gerenciamento de hiperlipidemia. Conforme descrevemos anteriormente, essa atuação da microbiota intestinal tem habilidade potencial para hidrolisar sais biliares, reduzir o acúmulo de gordura e a inflamação sistêmica, diminuir a leptina plasmática, além de atuar melhorando a evolução da DHGNA(56,110). Existem amplas variedades de espécies de bactérias e os estudos são bastante heterogêneos no que diz respeito aos gêneros utilizados, às doses e ao tempo de intervenção (114,115). As bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Bifidobacterium*, são os probióticos mais frequentemente utilizados, por integrarem o microambiente normal do intestino humano e pelos achados de literatura que apoiam a utilização mais frequente desses gêneros (113,114).

Kobyliak, N *et al.*, (2018) (115) em um ensaio clínico randomizado, duplo cego e placebo controlado, no qual avaliou 58 adultos obesos com DHGNA, e cuja intervenção durou 8 semanas, com um *mix* multicepas com 14 espécies (Gêneros: Lactobacillus + Lactococcus, Bifidobacterium, Propionobacterium e Acetobacter), demonstrou resultados estaticamente significativos entre os grupos favoráveis ao uso de probióticos, avaliando a rigidez hepática por elastografia, níveis de AST e GGT, TNF alfa e IL-6(115). Outro estudo de intervenção em adultos obesos com DHGNA, realizado por Ahn, SB *et al.* (2019) no qual o desfecho principal foi a redução do PDFF à RNM de fígado, utilizou uma mistura com 6 espécies de probióticos por 12 semanas, demonstrou uma redução estatisticamente significativa de gordura hepática no grupo que utilizou probióticos no grupo placebo, além da redução do peso corporal e a gordura corporal, que só ocorreram no grupo que utilizou probióticos(116).

Com base em resultados descritos em estudo de revisão sistemática com metanálise e, em virtude de não existir nenhum tratamento descrito como efetivo para o tratamento da DHGNA, a utilização de probióticos tem sido uma estratégia promissora para tratar a obesidade e DHGNA(93).

Revisão da colaboração Cochrane e outra revisão sistemática com meta-análise, com estudos na faixa etária pediátrica, relatam que o tratamento com probióticos em pacientes com DHGNA e NASH, não poderia ser recomendado devido à falta de ensaios clínicos randomizados (30,117), associados à grande heterogeneidade metodológica observada no que diz respeito aos probióticos utilizados, tempo de uso, dose utilizada e perfil dos indivíduos avaliados (118). Revisões de literatura realizadas mais recentemente, descrevem um efeito promissor do uso de probióticos para tratar DHGNA (119,120).

A maioria dos estudos de revisão sobre obesidade, resistência à insulina e DHGNA na faixa etária pediátrica, descreve, baseado em dados prévios de estudos em animais e adultos, a terapia com probióticos como uma alternativa promissora, uma vez que as mudanças de estilo de vida, na grande maioria dos casos, não se mostram sustentáveis em médio e longo prazo(27).

Em um estudo de revisão de ensaios clínicos envolvendo probióticos, simbióticos e prebióticos no tratamento da obesidade e pré-diabetes, Barendolts *et al.* (2016) ao descreverem as características principais deles, concluíram que a maioria dos ensaios clínicos eram pequenos

(<100 participantes), com curto período de intervenção ( $\leq 12$  semanas) e usavam iogurte ou cápsulas contendo probiótico. Os resultados mostraram alterações de pequena monta e sem significância estatística no peso corporal, pressão arterial, hemoglobina glicada e outros biomarcadores, incluindo desfechos antropométricos e metabólicos, tais como, circunferência da cintura, gordura visceral, taxa metabólica basal, perfil lipídico, HOMA-IR, índice de sensibilidade à insulina e marcadores inflamatórios (proteína C reativa, IL-6, TNF-alfa)(110).

Sharpton *et al.*, em estudo de revisão sistemática, com meta-análise e metarregressão, em que foram avaliados 21 estudos (apenas 3 envolviam crianças e adolescentes), concluíram que o uso de probióticos/simbióticos foi associado à melhora nos marcadores específicos de inflamação hepática, nos níveis de rigidez hepática à elastografia e da esteatose em indivíduos com DHGNA. Esses mesmos autores descrevem os resultados como promissores, mas ressaltam a necessidade de ensaios clínicos bem desenhados a fim de definir a eficácia do tratamento por conta da heterogeneidade nas análises agrupadas(112).

Por fim, em revisão sistemática sobre tratamento da DHGNA na faixa etária pediátrica, escrita por Mann *et al.* (2019)., foram descritos apenas os três ensaios clínicos existentes com uso de probióticos, com 128 participantes, nos quais as formulações de probióticos eram diferentes, com intervenções variando entre 2 e 4 meses. Observou-se melhora dos níveis de ALT quando comparado ao placebo em todos os três estudos e, em dois deles, melhora ultrassonográfica da DHGNA, além da melhora da resistência à insulina e dos lipídios séricos(121). Os mesmos resultados foram descritos por Chaves *et al.* (2021) em revisão sistemática recente, avaliando apenas o uso de probióticos na faixa etária pediátrica, encontrando os únicos três estudos já citados nas demais revisões que o antecederam(122).

Embora ainda existam poucos ensaios clínicos que avaliem o tratamento da DHGNA na população pediátrica, esses apresentam algumas limitações metodológicas importantes. Pode-se citar a ausência de padronização dos critérios diagnósticos, ausência de randomização, ausência de grupo controle, diversidade de cepas utilizadas e tempos de intervenção variados. Sabe-se, ainda, que a realização de estudos que envolvem o tratamento da DHGNA na faixa etária pediátrica ainda é escassa e de difícil execução, uma vez que não existem ainda padronizados biomarcadores não invasivos validados para o diagnóstico da doença para essa faixa etária, e a biópsia hepática, descrita como padrão-ouro para o diagnóstico, é um método

invasivo e com potenciais complicações, limitando assim, uma avaliação mais acurada das intervenções.

Numa busca bibliográfica realizada em bases de pesquisa nos últimos 20 anos, envolvendo as palavras chaves "probiotics", "NAFLD", "Insulin resistance" e "Obesity", obtivemos um resultado de apenas cinco ensaios clínicos envolvendo crianças e adolescentes e destes, apenas três que utilizaram probióticos como a intervenção terapêutica estudada para tratamento da DHGNA (27,123,124). Vajro *et al.*, em artigo de revisão de literatura sobre as opções terapêuticas para tratar DHGNA na faixa etária pediátrica, evidenciaram que existe um crescente corpo de evidências sobre o papel da microbiota intestinal na DHGNA, e sobre dados conflitantes de literatura devido à escassez de ensaios clínicos randomizados, e relacionado às suas limitações metodológicas(120).

Os três ensaios clínicos randomizados, duplo cego e placebo controlados realizados na população pediátrica (27,123,124), usaram tempos de intervenção variando entre 2 e 4 meses, com desfechos avaliados com critérios ultrassonográficos e laboratoriais. As cepas utilizadas foram: *Lactobacillus GG* (123), PROKID (*Lactobacillus acidophilus ATCC B3208*, *Bifidobacterium lactis DSMZ 32269*; *Bifidobacterium bifidum ATCC SD6576*; *Lactobacillus rhamnosus DSMZ 21690*,) (124) e VSL#3(*Streptococcus thermophilus*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*; *Lactobacillus rhamnosus* strain *GG*)(27). Famouri *et al.*(124) avaliou a evolução e melhora dos estágios ultrassonográficos de esteatose hepática, e obteve redução desses achados radiológicos, até evolução para a normalidade no grupo que utilizou probióticos.

Alisi *et al.*, (27), encontrou resultados semelhantes, no seu estudo, o desfecho primário foi dado como melhora na taxa de progressão de estágios mais graves de esteatose hepática para estágios menos definitivos. Vajro *et al.*, utilizaram como desfecho primário a melhora/normalização dos níveis de ALT (<40UI/L), obtendo diferenças estatisticamente significantes entre os grupos probiótico e placebo(123).

Apesar de possuir algumas limitações, como a elevada heterogeneidade de marcadores nos estudos, associado ao reduzido número amostral, além da ausência de métodos radiológicos mais acurados para o diagnóstico da DHGNA, os resultados se mostram promissores para o uso de probióticos como intervenção terapêutica no tratamento da DHGNA. A recomendação da

literatura é de que sejam realizados estudos de intervenção com metodologias mais robustas, métodos diagnósticos mais acurados e com alguma padronização de tempo de intervenção e dos probióticos utilizados (18,122)

Diante dos dados de literatura, na população pediátrica, além do fato de que nenhum medicamento ou suplemento disponível até o momento é recomendado de forma sistemática para tratar a DHGNA, porque não ficou comprovado que algum deles beneficie a maioria dos pacientes com DHGNA(18), faz-se necessário a condução de mais ensaios clínicos na faixa etária pediátrica. , com objetivo de reforçar os poucos dados publicados .

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Desenho e população do estudo

O estudo desenvolvido em duas etapas: 1) etapa de triagem dos adolescentes para identificação daqueles com DHGNA, resultando na comparação entre os adolescentes com e sem DHGNA, definidos segundo o método diagnóstico ultrassonográfico; 2) etapa de realização do estudo de intervenção, com os resultados comparativos entre os momentos pré- e pós-intervenção dos adolescentes que tiveram o quadro de DHGNA confirmado com o método mais acurado, a ressonância nuclear magnética. Os pacientes incluídos na etapa 1 do estudo foram submetidos a todos os procedimentos padronizados na consulta da semana 1 (pré-intervenção) do ensaio clínico, exceto pela realização da ressonância nuclear magnética.

Trata-se de um estudo de intervenção, tipo ensaio clínico randomizado (ECR), paralelo, duplo cego, com grupo comparativo (placebo). O ECR foi registrado no ReBEC - Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos (<https://ensaiosclinicos.gov.br>), código UTN U1111-1249-3983.

Foram estudados adolescentes de 10 a 19 anos de idade, residentes do município de Salvador e região metropolitana que foram acompanhados no Ambulatório de Pediatria do Ambulatório Docente Assistencial de Brotas (ADAB), vinculado ao curso de graduação em Medicina da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP).

Os participantes foram provenientes do ambulatório de Obesidade Infanto-Juvenil, localizado no Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (Complexo HUPES) da Universidade Federal da Bahia (UFBA), e adicionalmente recrutados através de divulgação da realização da pesquisa em redes sociais e grupos assistenciais da rede pública.

#### 4.1.1 Cálculo e tamanho amostral

Para a primeira etapa do estudo a amostra foi de conveniência.

Para o cálculo amostral da segunda etapa (o ensaio clínico randomizado) foram definidos nível de confiança de 95% e poder de 80%. Com base em níveis médios (DP) de percentual de PDFF à ressonância nuclear magnética esperados de 18,3%(±7,6) (125), previamente descritos em adultos com DHGNA, e estimando um efeito de mudança (diferença) de média em 15%, obteve-se tamanho amostral mínimo de 14 pacientes em cada grupo (125).

#### **4.2 Aplicação dos critérios de elegibilidade e triagem ultrassonográfica**

Os interessados que compareceram ao ADAB provenientes do ambulatório de Obesidade Infanto-Juvenil, localizado no Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (Complexo HUPES) da Universidade Federal da Bahia (UFBA), após conhecimento do protocolo e assinatura do TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido), eram encaminhados diretamente para realização da USG (ultrassonografia) e consulta médico-nutricional, dado que eram comprovadamente obesos. Para aqueles recrutados em redes sociais e outros grupos assistenciais da rede pública, um formulário *on-line* foi encaminhado via WhatsApp, para preenchimento de dados de identificação, incluindo peso e altura, para confirmação do diagnóstico antropométrico de excesso de peso. Nesta primeira etapa foram avaliados 92 potenciais participantes, pacientes obesos na faixa etária entre 10 e 19 anos de idade. Nesta triagem foi orientado preparo para a realização da ultrassonografia de abdome superior, com jejum prévio de 4 horas. Do total de interessados, compareceram para consulta inicial e realização de USG, um total de 72 pacientes.

Todos foram classificados como tendo excesso de peso e, atendendo ao chamamento da pesquisa, após conhecimento do protocolo e assinatura do TCLE, os pacientes realizaram uma triagem ultrassonográfica para pesquisa de DHGNA, consulta médica, nutricional, avaliação antropométrica clínica, avaliação da composição corporal e através de Bioimpedância, além de coleta de exames laboratoriais.

Posteriormente, todos os adolescentes avaliados foram divididos em dois grupos: 1) com diagnóstico ultrassonográfico de DHGNA; e, 2) sem diagnóstico ultrassonográfico de DHGNA. Aqueles pertencentes ao primeiro grupo, foram convidados a continuar no estudo, sendo encaminhados para continuação do protocolo, com a aplicação dos critérios de inclusão, conforme descrito adiante. Os demais permaneceram ou foram encaminhados para acompanhamento clínico no ambulatório de Obesidade Infanto-Juvenil, localizado no Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (Complexo HUPES).

#### **4.3 Critérios de inclusão e exclusão e seleção da amostra final do ECR**

Foram critérios de inclusão para o estudo de ECR:

- 1) apresentar achado ultrassonográfico compatível com presença de esteatose hepática de qualquer grau;
- 2) ter confirmação de qualquer grau de obesidade, baseado no indicador IMC/idade acima de +2 escores z da curva da OMS. Para esses cálculos utilizou-se do software anthro(126) da Organização Mundial da Saúde (OMS) (45);
- 3) Ser residentes da região metropolitana e de Salvador, para minimizar o risco de ausência às consultas de avaliação;
- 4) Assinatura do TCLE por um genitor ou responsável legal;
- 5) Assinatura do Termo de Assentimento (TA) pelo adolescente participante.

Aqueles que consentiram em participar do estudo, mediante assinatura do TCLE e TA (Apêndices A e B), foram submetidos à avaliação laboratorial, descrita detalhadamente no tópico 4.5.8 Avaliações Laboratoriais. Todos foram encaminhados para a realização de avaliação da presença de esteatose hepática, fibrose hepática e sobrecarga de ferro através da Ressonância Nuclear Magnética (RNM), conforme será detalhada posteriormente.

Após os resultados laboratoriais e a realização da RNM, foram aplicados, em consulta de avaliação médico-nutricional os critérios de exclusão, conforme descritos:

- 1) Apresentarem diabetes mellitus, definida como glicemia de jejum acima de 100 mg/dl(127);
- 2) Apresentarem obesidade de etiologia endógena, comorbidade psiquiátrica ou doença que interferia diretamente na evolução ponderal, conforme avaliação da médica pesquisadora (JB);
- 3) Estar em uso de medicações como metformina, estatinas, laxantes, antibióticos, antidepressivos, corticoides, ansiolíticos e/ou qualquer outra medicação que pudessem interferir na microbiota intestinal ou causar dano hepático como reação adversa;
- 4) Fossem classificados como PIGs (pequenos para idade gestacional) ao nascimento;
- 5) Não apresentassem diagnóstico de DHGNA após a avaliação realizada pela RNM, conforme critérios diagnósticos detalhados no tópico 4.5.7 B, Ressonância nuclear magnética de fígado.



Os pacientes portadores de DHGNA confirmados pela RNM foram convidados a participar do ensaio clínico e estes foram alocados, aleatoriamente, no grupo intervenção ou grupo comparativo.

#### **4.4 Procedimentos de Randomização e Alocação**

A randomização foi feita em “blocos” aleatórios de 4 ou 6 participantes, na proporção 1:1, aleatoriamente distribuídos em cada bloco, sendo realizados 2 blocos de seis e 4 blocos de 4 participantes. O processo de randomização foi realizado utilizando o sítio eletrônico <https://www.random.org> (128). Os códigos atribuídos a cada participante foram utilizados no processo de randomização, e somente ao coordenador geral do estudo e professor orientador foi franqueado acesso ao processo, mantido em sigilo em ambiente na nuvem.

O sigilo de alocação foi mantido mediante a codificação dos sachês contendo o produto de intervenção e o placebo, sendo que somente o coordenador geral do estudo tinha conhecimento sobre em que grupo cada participante foi alocado. Os pesquisadores que conduziram o acompanhamento dos participantes durante o estudo e das aferições dos desfechos não tiveram acesso ao processo de alocação.

O sigilo de alocação foi garantido com a utilização de envelopes opacos azuis, selados com identificação externa com o nome do participante, cujo código numérico gerado que identificava o participante e o grupo em que foi randomizado, só estaria disponível no momento da entrega da caixa do suplemento durante a consulta, a qual estava marcada com os mesmos números presentes na lista de randomização. Diante do número presente no envelope, a equipe de campo, acessava a caixa lacrada com o mesmo número retirado do envelope, contendo os sachês com o probiótico ou com o placebo. Apenas o coordenador da pesquisa teve acesso a essas informações.

#### **4.5 Protocolo de intervenção, instrumentos e procedimentos de coleta**

##### **4.5.1 Caracterização da Intervenção e do Placebo**

A intervenção consistiu na administração da combinação dos probióticos *Lactobacillus acidophilus* LA-5® e *Bifidobacterium lactis* BB-12®, contendo  $1 \times 10^9$  Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de cada um dos probióticos, na forma de pó liofilizado conforme laudo de especificações do fabricante (Anexo A), administrado por via oral, uma vez ao dia, acondicionados em sachês a serem consumidos diluídos em água em temperatura ambiente. Como o produto utilizado está disponível comercialmente, todos os sachês foram embalados em etiquetas adesivas de alto poder de colagem, opacas, de modo a não ser possível o reconhecimento da embalagem pelos participantes e pela equipe de condução dos procedimentos do ECR. O acondicionamento dos sachês nas caixas codificadas foi realizado pelo coordenador do estudo, que não participou de nenhuma das etapas de coleta de dados conforme ilustrados na Figura 2.

O grupo placebo recebeu sachês com a mesma embalagem, também adesivadas com etiquetas de alto poder de colagem, opacas, contendo 1g de celulose anidra, na mesma posologia e seguindo as mesmas orientações, conforme laudo e especificações do fabricante (Anexo B).

**Figura 2** - Apresentação dos sachês de probióticos e placebos entregue aos pacientes



2.1 Caixas com identificação para distribuição



2.2 Sachês de placebo



2.3 Sachês de probióticos

2.1 Caixas numeradas conforme randomização entregue com a quantidade exata para uso, 2.2 e 2.3: Aparência dos sachês placebo e Probiótico, respectivamente.

#### 4.5.2 Descrição do protocolo para uso dos sachês

Os participantes foram notificados diariamente em horário padrão, via mensagens telefônicas para lembrar de fazer uso do produto. Durante a consulta inicial foi demonstrado como utilizar o produto, como acondicioná-los e foi fornecido um folheto com orientações (Apêndice C), com ilustrações para orientação sobre o uso. Além de ter sido enviado via mensagem telefônica, um vídeo explicativo, demonstrando a utilização do produto, foi confeccionado para evitar erros durante o processo de uso dos sachês.

#### 4.5.3 Descrição dos procedimentos realizados antes, durante e nos intervalos das visitas de avaliação

Todos os agendamentos das visitas para avaliação médica, nutricional, laboratorial e/ou radiológica foram realizados via contato telefônico com antecedência e, envio de, no mínimo, quatro mensagens telefônicas lembrando a data da consulta e/ou da coleta de exames, com as orientações devidas. As mensagens foram enviadas duas semanas antes da data agendada, uma semana antes da data agendada, 48h e 24h antes da data da consulta de avaliação. A exceção dos exames de RNM, todas as outras avaliações foram realizadas no Centro de Pesquisa, no ADAB.

Os participantes que não puderam comparecer na data prevista tinham suas consultas reagendadas com proximidade de pelo menos 48h da data prevista, com o objetivo de manter o número de dias de observação próximo ao padrão previamente definido.

Cada participante recebeu, na primeira consulta, um manual explicativo (Apêndice D) sobre a doença, sobre o uso do produto em teste, com uma tabela de controle de peso, reações adversas e as datas de consultas e coletas de exames programadas para serem realizadas durante o protocolo. Foram orientados a levar o manual em todas as consultas.

Durante todo o período de intervenção, sempre no mesmo horário, diariamente, os adolescentes e/ou responsáveis recebiam uma mensagem com um cartão digital (*card*) lembrando da utilização do produto em teste, independente do grupo ao qual foram alocados.

Os dois grupos foram avaliados, de modo similar, em quatro visitas e, no momento de admissão nas 3 primeiras, recebiam as caixas com sachês de probióticos ou placebo, nas semanas 1,6,12 e 16, eram submetidos à avaliação da composição corporal através da Bioimpedância, avaliação

antropométrica e consulta nutricional e médica, além da aplicação do IPAQ-C (International Physical Activity Questionnaire - questionário internacional de atividade física para crianças) ou IPAQ-A (International Physical Activity Questionnaire -questionário internacional de atividade física para adultos) e realização do recordatório alimentar de 24 h. Nas semanas 1 e 4 a aferição de dobras cutâneas foram realizadas, quando anatomicamente possível. Nas semanas 6, 12 e 16 eram realizadas as contagens de sachês utilizados e pesquisa de reações adversas. A coleta de exames laboratoriais foi realizada nas semanas 1 e 16. Os avaliadores (médica e nutricionista) não tinham conhecimento sobre em qual grupo o paciente estava alocado. As avaliações foram realizadas em grupos de 8 a 10 participantes a cada semana, para operacionalizar a realização de todo o protocolo dentro dos prazos estabelecidos.

Os pacientes foram orientados a utilizar o contato telefônico recebido e de uso restrito e dedicado ao protocolo para registrar qualquer sintomatologia relacionada ao uso do produto, bem como relatar sobre adoecimento, internações ou uso de medicamentos de qualquer natureza.

Em todas as visitas foram realizadas anamnese direcionada, exame clínico e avaliação nutricional. Durante a entrevista, em cada visita, o paciente ou responsável era interrogado sobre esquecimento de uso, número de dias sem utilização e qual o motivo. Todos os dados foram registrados nos respectivos CRFs(*Case Report Forms*)(Apêndice E), no qual existia uma lista de checagem de procedimentos para cada consulta, para evitar quebras de protocolo.

Adicionalmente, em cada visita, os participantes recebiam orientações médicas e nutricionais de rotina, durante o atendimento, devolveram os sachês utilizados para contagem e recebiam novas caixas codificadas contendo os sachês envelopados, a serem utilizados no domicílio.

#### 4.5.4 Avaliação Médica

Durante a consulta clínica era aplicado questionário padrão sobre sinais e sintomas relacionados à obesidade e gerais de todos os sistemas corporais, bem como uso de medicamentos no intervalo das visitas, mediante o preenchimento do CRF, mostrado no Apêndice E, preenchido pelo mesmo examinador em todas as visitas (JB). Dados sobre o adoecimento no período, uso de medicações sobretudo corticoides e antibióticos foram interrogados. Alterações relacionadas ao ritmo intestinal foram questionadas e registradas. O exame físico geral e dos órgãos e

sistemas foi realizado pelo mesmo examinador em todos os participantes e visitas (JB) e os dados registrados no CRF.

#### 4.5.5 Avaliação Nutricional

A consulta com nutricionista (CF) consistiu na realização da avaliação antropométrica e com bioimpedância, aplicação do recordatório alimentar de 24h e orientações dietéticas padronizadas para todos os participantes, de acordo com a faixa etária (pré-púbere e pós-púbere) através da disponibilização de um cardápio de reeducação alimentar (Apêndices F e G).

##### *A) Avaliação antropométrica e de composição corporal*

Os dados antropométricos avaliados em todas as consultas foram realizados pelo mesmo examinador (CF). Foram obtidos peso, estatura, circunferência abdominal e pregas cutâneas. Com jejum mínimo de 2 horas, todos os participantes, em todas as visitas do protocolo, tiveram o peso aferido utilizando a balança de bioimpedância tetrapolar modelo Inbody 520® (Biospace Co., Ltd.USA) devidamente calibrada por empresa especializada, segundo critérios do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). Para determinação do peso corporal, o participante em trajes de banho, previamente orientado pela equipe do estudo, foi posicionado em pé, no centro da plataforma da balança, com os pés localizados nos eletrodos distais (piso da balança). Posteriormente, com os braços abertos e segurando as hastes contendo os eletrodos próximos ao corpo, foram orientados a evitar qualquer movimento, a fim de que se pudesse obter a medida mais precisa.

Concomitantemente à obtenção do peso, realizou-se a avaliação da composição corporal, por meio da bioimpedância, segundo procedimento já citado. Após o comando emitido pelo equipamento, uma corrente de baixo estímulo de intensidade e indolor foi induzida passando do eletrodo fonte para o eletrodo de captação. A queda de voltagem percebida por este último eletrodo é registrada e através de equações previamente validadas, o próprio analisador disponibiliza os valores e os respectivos referenciais de acordo com a faixa etária, sexo e peso corporal, fornecendo os seguintes dados mensurados: peso (em Kg) , IMC (em Kg/m<sup>2</sup>), água corporal total (litros), proteína (em Kg), massa mineral (em kg), massa muscular esquelética (em Kg), massa gorda (em Kg), percentual de gordura corporal (em %), relação cintura quadril (RCQ), taxa metabólica basal (em Kcal) e o balanço de massa magra segmentar em Kg e

percentual, para membro superior e inferior direito, esquerdo e tronco, além dos valores de impedância para cada segmento avaliado nas frequências de 5kHz, 50 kHz e 500 kHz. O relatório emitido pelo equipamento com todos esses dados está mostrado no anexo C.

Para a aferição da estatura, foi utilizado estadiômetro modelo portátil SECA 206® (SECA Medical Measuring Systems and Scales, Deutschland) com precisão de 0,1 cm e capacidade de 200 cm. O participante foi avaliado descalço, em posição ereta, com os pés unidos, calcanhares, nádegas, costas e parte posterior da cabeça em contato com a escala. Através do cursor, foi registrada a medida da estatura, compreendida entre a distância da planta dos pés e ponto mais alto da cabeça, estando o adolescente em estado de expiração máxima. O índice de massa corporal (IMC) foi calculado através da razão entre o peso (em kg) e o quadrado da altura (em metros). A circunferência da cintura (CC) foi medida utilizando uma fita métrica não elástica milimetrada, sendo o referencial o ponto médio entre a crista ilíaca e a última costela.

As dobras cutâneas tricipital (DCT), subescapular (DCS) e a circunferência do braço (CB) foram aferidas, quando anatomicamente possível, nas semanas 1 e 16. A circunferência do braço (CB) foi aferida no braço direito, em posição relaxada e flexionada em direção ao tórax, formando um ângulo de 90 graus, para identificação do ponto médio entre o acrômio e o olécrano. Após, a CB foi medida no ponto marcado, no contorno do braço, estando este, relaxado ao longo do corpo e com a palma da mão voltada para a coxa, com auxílio de uma fita métrica inelástica milimetrada. Para aferir a dobra cutânea tricipital (DCT) foi utilizado como referencial o mesmo ponto médio da aferição da circunferência do braço, estando o braço relaxado e solto ao lado do corpo, formando um ângulo reto, separando levemente a dobra cutânea (pele mais gordura subcutânea), desprendendo-a do tecido muscular. Foi utilizado o adipômetro Científico Tradicional, marca Cescorf® (Cescorf, Equipamentos Antropométricos, Porto Alegre, RS), aplicado a uma pressão constante de  $10\text{g/mm}^2$ , com sensibilidade de aferição de 0,1 mm. Para aferir a dobra cutânea subescapular (DCS) foi marcado um ponto imediatamente abaixo do ângulo inferior da escápula, levantou-se a pele cerca de 1,0 cm abaixo de seu ângulo inferior, de tal forma que se pudesse observar um ângulo de  $45^\circ$  entre esta e a coluna vertebral. O adipômetro foi aplicado estando o paciente com braços e ombros relaxados.

A aferição sequencial das variáveis descritas nos itens 4.5.5, 4.5.6 e 4.5.7, teve como objetivo principal controlar a influência das suas variações na mudança do desfecho principal, causando confundimento.

### ***B) Avaliação do consumo alimentar***

O consumo alimentar foi avaliado através de quatro recordatórios de 24 horas realizados nas semanas 1, 6, 12 e 16. Nestas visitas, obteve-se informações verbais sobre a ingestão alimentar das últimas 24 horas, com dados sobre os alimentos consumidos e informações sobre peso/tamanho das porções que foram consumidas. Um manual fotográfico de quantificação alimentar(129), com modelos de porções foi utilizado para quantificar as porções de todas as refeições realizadas pelo adolescente nas últimas 24h que precederam a visita ao centro. Foi utilizado formulário padrão para preenchimento (Apêndice H) e os dados para cálculos do consumo alimentar estimado de macro e micronutrientes foram realizados utilizando o software Dietbox, versão 2020 (<https://dietbox.me/pt-BR>)(130).

Em relação ao consumo alimentar, os parâmetros avaliados foram: consumo energético total (kcal/dia), percentual de adequação do consumo energético (%), consumo de proteína (g/dia), consumo de proteína por quilo de peso (g/kg/dia), percentual de proteína na dieta (%), consumo de carboidrato (g/dia), percentual de carboidrato na dieta (%), consumo de lipídio (g/dia), percentual de lipídio na dieta (%), consumo de gordura saturada (g/dia), percentual de consumo de gordura saturada na dieta (%), consumo de gordura trans (g/dia), percentual de gordura trans na dieta (%), consumo de fibras (g/dia) e percentual de fibras na dieta (%).

#### 4.5.6 Avaliação da prática de atividade física

Em todas as visitas ao centro, para avaliação padronizada da prática de atividade física, foram aplicados, ao participante, o Questionário Internacional de Atividade Física (International Physical Activity Questionnaire - IPAQ), na versão curta, de acordo com a faixa etária. Usou-se o IPAQ-A (Anexo D) para adolescentes de 14 a 20 anos e o IPAQ-C (Anexo E), para menores de 14 anos(131).

#### 4.5.7 Avaliações Radiológicas

As avaliações radiológicas foram realizadas com a ultrassonografia (USG) de abdome superior, para investigação da elegibilidade para o ECR, enquanto a Ressonância Nuclear Magnética (RNM), foi utilizada para confirmar a presença de esteatose hepática, mediante a quantificação de gordura, e avaliação do efeito da intervenção nos desfechos primários.

##### **A) Ultrassonografia de abdome total**

O exame foi realizado pelo mesmo avaliador, utilizando o aparelho Canon, modelo Xario 100 Platinum® (Canon Medical Systems Corporation, 1385, Shimoishigami, Otawara-Sri Tochigi-Ken 324-8550-Japão) com o transdutor convexo de 2 a 5 MHz. Foi pesquisada a presença de esteatose hepática e, quando presente, a classificação desta em graus I, II e III, baseando-se na alteração da ecogenicidade hepática, na identificação dos vasos intra-hepáticos e do diafragma, segundo critérios descritos por Hamaguchi *et al.*(132). Todos os exames ultrassonográficos foram realizados na instituição de pesquisa.

##### **B) Ressonância nuclear magnética de fígado**

Na semana 1 (pré-intervenção) e semana 16 (pós-intervenção), foram realizadas as ressonâncias nucleares magnéticas (RNM) hepáticas. O estudo foi empregado para avaliação da rigidez hepática através da sequência de elastografia guiada por RM com uso do aparelho GE Optima 360W, de 1,5T, sem a injeção do meio de contraste. Foram realizadas ainda, sequências adicionais para quantificação de gordura hepática, através da medida da fração média de gordura pela técnica de densidade de prótons (PDFF) utilizando como valores de referência para classificação do grau de esteatose conforme descrição no quadro1 (133, 134).

#### 4.5.8 Avaliações Laboratoriais

Nas semanas 1 (pré-intervenção) e 16 (pós-intervenção), após jejum mínimo de 8 horas, foram coletadas, por venopunctura, em tubos de coleta a vácuo, amostras de 20 ml de sangue de cada participante, distribuídas em duas alíquotas. As amostras foram centrifugadas usando centrífuga de mesa padrão, para a separação de soro, usando técnicas laboratoriais padronizadas. A primeira alíquota foi encaminhada para dosagens de estimativas bioquímicas de glicemia,

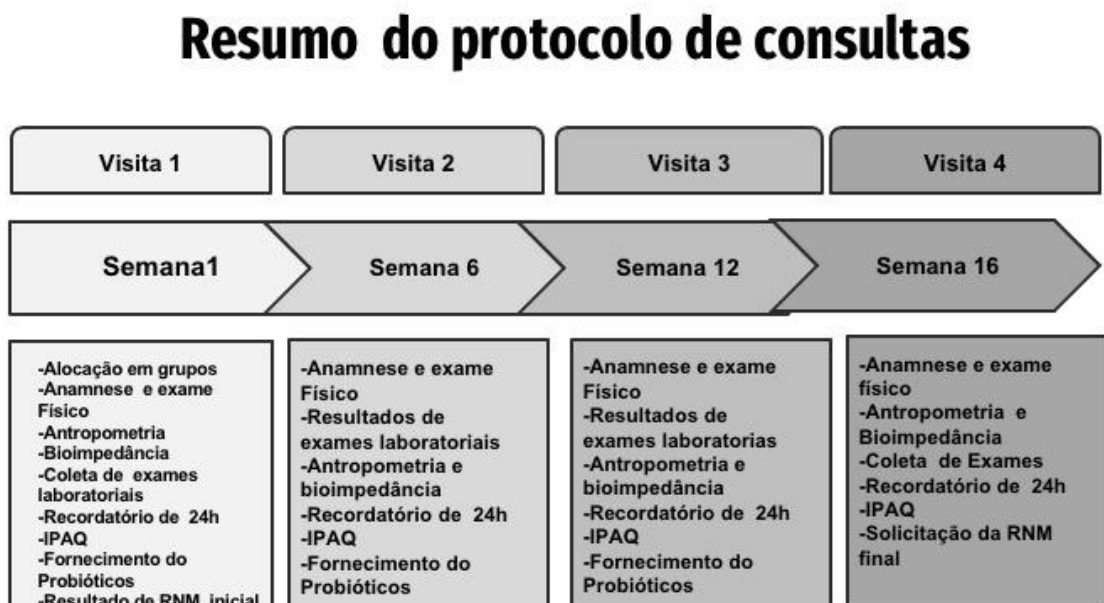


insulinemia, aminotransferases, creatinina, ureia, T4 livre e TSH, ferritina, gama-glutamil transferase, fosfatase alcalina, bilirrubina, proteína C reativa ultrasensível, vitamina D (25-OH) e perfil lipídico. O perfil bioquímico foi analisado com analisador bioquímico automatizado (Konelab 20®, Thermo-Fischer, Espoo, Finlândia). Método padrão de glicose-oxidase-peroxidase (GOD-POD) foi usado para avaliar a glicose em jejum (catálogo # 981379 da Thermo-Fischer). Kit comercial da Multiplex (Luminexcorp®, Austin, TX, EUA) foi usado para avaliar os níveis de insulina em jejum. A dosagem de 25-OH-vitamina D foi realizada no soro, através do método de quimioluminescência.

A segunda alíquota, coletada em tubos contendo EDTA foi submetida a processo de centrifugação sob resfriamento a  $-4^{\circ}\text{C}$ , para obter o plasma. Neste material foram dosados os níveis plasmáticos de fator de transformação de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e heme oxigenase-1 (HO-1), utilizando ensaio imunoenzimático único (ELISA Systems, Minneapolis, Minnesota), conforme as instruções do fabricante.

Na figura 3 encontra-se ilustrado o resumo de protocolo das consultas. Todos os pacientes que participaram da etapa 1, realizaram os procedimentos da visita 1, exceto a RNM, as demais consultas descrevem o seguimento dos pacientes que participaram do ECR (etapa 2).

**Figura 3 Protocolo de consultas do ensaio clínico randomizado**



## 4.6 Definição dos desfechos e variáveis do protocolo do ECR

### 4.6.1 Desfechos Clínicos

Para aferição da pressão arterial utilizou-se tensiômetro digital OMRON modelo HEM-7122® (OMRON, USA), previamente validado para uso em adolescentes brasileiros utilizando-se manguitos apropriados para a idade, conforme preconizado. A hipertensão arterial foi definida como normal, a PAS e a PAD em níveis abaixo do percentil 90 em crianças entre 1 e 13 anos e abaixo de 120/80 mmHg em maiores de 13 anos. O termo pré-hipertensão foi considerado quando PAS e PAD maior ou igual ao percentil 90 e menor que o percentil 95 em crianças de 1 a 13 anos. Em maiores de 13 anos foi definida acima de 120/80 mmHg e menor que 129/80 mmHg.(135)

Os hipertensos, também foram classificados em estágio 1 e 2 conforme o Quadro 1.

**Quadro 1** - Categorias de pressão arterial

	<b>Crianças entre 1 e 13 anos</b>	<b>Crianças com 13 anos ou mais</b>
Normal	< percentil 90	< 120/80 mmHg
Elevada	≥ percentil 90 e < percentil 95 ou 120/80 mmHg e < 95 percentis (o que for mais baixo)	120/<80 mmHg até 129/<80 mmHg
Estágio 1	≥ 95 percentil e < 95 percentil + 12 mmHg ou 130/80 mmHg até 139/89 mmHg (o que for mais baixo)	130/80 mmHg até 139/89 mmHg
Estágio 2	≥ percentil 95 + 12 mmHg ou ≥ 140/90 mmHg (o que for mais baixo)	≥ 140/90 mmHg

Fonte: Adaptado de Flynn JT, *et al.*, 2017 (135)

Considerou-se reação adversa, qualquer sinal ou sintoma relatado durante as consultas médicas de avaliação, sendo analisado pelos pesquisadores médicos do estudo (JB e NBS) se estas se relacionavam ao uso do probiótico. Sintomas gastrointestinais, especialmente alterações no padrão de dejeções, flatulência, distensão e dor abdominal foram rigorosamente questionados. Entre as visitas ao centro do estudo, o ADAB, os familiares e adolescentes poderiam relatar quaisquer eventos, independente da origem, mediante o telefone do protocolo.

Especificamente em relação ao ritmo intestinal, o diagnóstico de constipação intestinal foi realizado através da utilização dos critérios de ROMA IV (136) e a descrição da consistência das fezes foi registrada utilizando a classificação de Bistol(137), apresentadas no anexo F.

#### 4.6.2 Desfechos Antropométricos e Nutricionais

Sobrepeso, obesidade e obesidade grave foram considerados como presentes, entre os indivíduos de 5 a 19 anos, quando o indicador IMC/I foi  $> +1$ ,  $> +2$  e  $> +3$  escores z, respectivamente, tendo como referência a curva da OMS (40, 41).

A classificação da circunferência da cintura (CC), para jovens de 5 a 17 anos, seguiu os critérios propostos por Freedman *et al.* (138), considerando-se aumentada quando a medida situava-se acima do percentil 90 em relação ao gênero e idade. Para aqueles com 18 anos de idade em diante, seguiu-se a classificação utilizada pela OMS para adultos, que considera, para as mulheres, CC aumentada quando os valores são acima de 80,0 cm e, para os homens, acima de 94,0 cm (33).

Os referenciais para medidas das dobras cutâneas tricipital (DCT), subescapular (DCS) e da circunferência do braço (CB) utilizados foram descritos por Frisancho, 1990 (139), nos quais os valores acima do percentil 95 representam risco de doenças relacionadas ao excesso de peso. Valores acima do p95 foram classificados como excesso de gordura.

#### 4.6.3 Desfechos de Atividade Física

Para classificar o padrão de atividade física, de acordo com a padronização do IPAQ, foram utilizados os seguintes critérios:

- 1) Sedentário, para aquele adolescente que não realiza nenhuma atividade física por pelo menos 10 minutos contínuos durante a semana;
- 2) Insuficientemente Ativo A, para aquele adolescente que realiza 10 minutos contínuos de atividade física, seguindo pelo menos um dos critérios citados: frequência de cinco dias/semana ou duração 150 minutos/semana;
- 3) Insuficientemente Ativo B, para aquele que não atinge nenhum dos critérios da recomendação citada nos indivíduos insuficientemente ativos A;
- 4) Ativo, para aquele adolescente que cumpre as seguintes recomendações: a) atividade física vigorosa  $\geq 3$  dias/semana e  $\geq 20$  minutos/sessão; b) moderada ou caminhada  $\geq 5$  dias/semana e  $\geq 30$  minutos/sessão; c) qualquer atividade somada:  $\geq 5$  dias/semana e  $\geq 150$  min/semana;
- 5) Muito Ativo, para aquele adolescente que cumpre as seguintes recomendações: a) vigorosa  $\geq 5$  dias/semana e  $\geq 30$  min/sessão; b) vigorosa  $\geq 3$  dias/semana e  $\geq 20$  min/sessão + moderada e ou caminhada  $\geq 5$  dias/semana e  $\geq 30$  min/sessão.

#### 4.6.4 Desfechos Radiológicos

A presença de DHGNA foi baseada na quantificação de gordura hepática, através do método de redução da fração média estimada de gordura pela técnica de densidade de prótons (PDFF - *Proton Density Fat Fraction*), utilizando como valores de referência para classificação de esteatose, o descrito no quadro 2.

**Quadro 2** - Classificação de esteatose hepática baseada nos valores de PDFF

<b>Classificação</b>	<b>Valores de PDFF</b>
0 (Normal)	$\leq 5,1 \%$
1 (Leve)	5,1-14%
2 (Moderada)	14,0-28,0%
3 (Acentuada)	$> 28\%$

Fonte: Adaptado de Kühn *et al.*, 2012 e Kühn *et al.*, 2017 (133, 134).

A elastografia foi utilizada para avaliar a presença de rigidez hepática e, conseqüentemente, graus de fibrose, sendo descrita por valores em quilopascal (kPa), estimados no exame. Os valores de referência utilizados para classificar a presença de fibrose e a gravidade do comprometimento foram os descritos no quadro 3.

**Quadro 3** - valores de referência, em kPa, da elastografia por RNM para identificação de classificação de fibrose

<b>Valores de kPa</b>	<b>Classificação</b>
$< 2,5$ kPa	Normal
2,5-2,9 kPa	Normal ou Inflamação
2,9-3,5 kPa	F1/F2
3,5-4,0 kPa	F2/F3
4,0-5,0 kPa	F3/F4
$> 5,0$ kPa	F4

Fonte: Adaptado de Venkatesh *et al.*, 2014(140).

Foi avaliada ainda a quantificação de ferro no parênquima hepático através de software Ideal/IQ R, classificando-se como presença de sobrecarga de ferro se  $T2^* < 16\text{ms}$  e  $R2^* > 60$ .

A avaliação multiparamétrica do fígado possibilitou então, através do método de PDFF - *Proton Density Fat Fraction*, da medida do R2 e  $T2^*$  e da elastografia hepática, avaliarmos a presença de gordura, ferro e de fibrose no parênquima hepático, num exame de curta duração e sem utilização de contraste ou radiação ionizante. O exame foi realizado na clínica de imagem Delfin Medicina Diagnóstica, (localizada na Avenida Antônio Carlos Magalhães, 442 - Itaigara, Salvador, BA, 41800-700, Salvador-Bahia) e todos os laudos foram realizados por 2 radiologistas experientes em ERM. Anexo G, laudo do exame.

#### 4.6.5 Desfechos Laboratoriais

Nas semanas 1 (pré-intervenção) e 16 (pós-intervenção), após jejum mínimo de 8 horas, foram coletadas, amostras de sangue de cada participante, para dosagens de estimativas bioquímicas de glicemia, insulinemia, aminotransferases, creatinina, ureia, T4 livre e TSH, ferritina, gama-glutamil transferase, fosfatase alcalina, bilirrubina, proteína C reativa ultrasensível, vitamina D (25-OH) perfil lipídico e níveis plasmáticos de fator de transformação de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e heme oxigenase-1 (HO-1), excetuando-se os dois últimos parâmetros apenas dosados no grupo comparativo na triagem inicial.

Os valores foram descritos em média e interquartis, bem como as diferenças de valores entre as semanas 1 e 4 foram calculadas e comparadas entre os grupos.

Para glicemia, considerou-se alterada quando apresentava valores superiores a 100mg/dl (128), considerou-se hiperinsulinemia, os valores de insulina e HOMA-IR alterados, quando eram superiores aos valores de normalidade para cada faixa etária e sexo, acrescidos de dois desvios padrão, descritos por Almeida *et al.* 2008, Quadros 4 e 5 (141).

**Quadro 4** - Média e desvio padrão dos valores de insulinemia de jejum medidos em meninos e meninas de acordo com a faixa etária

Média e desvio padrão dos valores de insulinemia de jejum medidos em meninos e meninas de acordo com a faixa etária					
Idade	Insulinemia ( $\mu$ UI/mL)				p*
	Meninos		Meninas		
	n	Média (DP)	n	Média (DP)	
7 a 8,9 anos	30	3,08 (2,42)	39	3,14 (1,78)	0,51
9 a 10,9 anos	32	4,21 (2,24)	50	5,49 (3,25)	0,081
11 a 12,9 anos	37	4,64 (3,77)	62	6,50 (3,38)	0,0013
13 a 14,9 anos	58	6,82 (3,46)	66	7,71 (3,57)	0,11
15 a 17,9 anos	26	4,67 (2,80)	47	6,75 (3,19)	0,0015
p†		0,0001		0,0001	

DP = desvio padrão.  
 \* Teste de Mann-Whitney.  
 † Teste de Kruskal-Wallis para comparação simultânea de mais de dois grupos.

Fonte: Almeida *et al.*, 2008(141)

**Quadro 5** - Média e desvio padrão dos valores de HOMA IR de jejum medidos em meninos e meninas de acordo com a faixa etária

Idade	HOMA				p*
	Meninos		Meninas		
	n	Média (DP)	n	Média (DP)	
7 a 8,9 anos	30	0,68 (0,54)	39	0,65 (0,37)	0,91
9 a 10,9 anos	32	0,93 (0,52)	50	1,20 (0,71)	0,086
11 a 12,9 anos	37	1,03 (0,81)	62	1,44 (0,79)	0,0032
13 a 14,9 anos	58	1,57 (0,82)	66	1,72 (0,87)	0,29
15 a 17,9 anos	26	1,05 (0,67)	47	1,49 (0,70)	0,0035
p†		0,0001		0,0001	

DP = desvio padrão; HOMA = homeostasis model assessment.  
 \* Teste de Mann-Whitney.  
 † Teste de Kruskal-Wallis para comparação simultânea de mais de dois grupos.

Fonte: Almeida *et al.*, 2008(141)

Para os referenciais de valores do perfil lipídico seguiu-se as diretrizes da Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – 2017 conforme o Quadro 6 (142).

**Quadro 6** - Referência de valores para colesterol total e frações e triglicérides na faixa etária pediátrica.

Lipídios	Em jejum	Sem jejum
	Nível aceitável (mg/dL)	Nível aceitável (mg/dL)
<b>Colesterol total</b>	< 170	< 170
<b>LDL colesterol</b>	< 110	< 110
<b>HDL colesterol</b>	> 45	> 45
<b>Triglicérides</b>		
<b>-0-9 anos</b>	< 75	< 85
<b>- 10-19 anos</b>	< 90	< 100
<b>Não-HDL-C</b>	< 120	—
<b>Apolipoproteína B</b>	< 90	—

Fonte: Adaptado, de Faludi, AA *et al.*, 2017 (142)

Níveis de AST e ALT descritos como elevados foram considerados superiores a 22 U / L para meninas e 26 U / L para meninos, segundo as recomendações da NASPGHAN Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children(18).

Para 25OH vitamina D, considerou-se como referencial os valores recomendados pela *Global Consensus Recommendations on Prevention and Management of Nutritional Rickets*, que considera suficiência valores acima de 20ng/m, insuficiência de 2-20ng/mL e deficiência abaixo de 12 ng/mL (143).

Os valores de normalidade descritos pela técnica bioquímica empregada nas dosagens para Ferritina (feminino: 10-291 e masculino: 22-322ng/mL) e para PCR ultrasensível: baixo risco <0,1; médio risco 0,1-0,2, alto risco >0,2. e muito alto risco >1mg/dL(142)



## 4.7 Análise dos dados

### 4.7.1 Triagem e comparação entre os grupos com e sem DHGNA(Etapa1)

As variáveis contínuas foram testadas para distribuição Gaussiana usando o teste D'Agostino-Pearson. Nenhuma variável exibiu distribuição normal. Os valores medianos com intervalos interquartílicos foram usados como medidas de tendência central e dispersão, respectivamente. O teste U de Mann-Whitney (comparando 2 grupos) ou o teste de Kruskal-Wallis com os testes ad hoc de comparação múltipla ou de tendência linear não paramétrica de Dunn (para mais de 2 grupos) foram usados para comparar variáveis contínuas, enquanto o qui-quadrado de Pearson teste foi usado para comparar as variáveis apresentadas como porcentagens. Análises de agrupamento hierárquico (método de Ward) de log<sub>10</sub> transformado e dados normalizados de pontuação z foram empregados para representar o perfil de expressão geral dos marcadores bioquímicos indicados nos subgrupos de estudo. Todas as comparações foram pré-especificadas e bicaudais. As diferenças com valores de p abaixo de 0,05 após o ajuste de Holm-Bonferroni para comparações múltiplas foram consideradas estatisticamente significativas. Os perfis de correlação entre os parâmetros bioquímicos foram examinados usando a análise de rede das matrizes de correlação de Spearman. Correlações com valor de p <0,05 foram incluídas na visualização da rede. Os valores de classificação de Spearman (rho) foram usados para descrever a força das correlações entre o grau / gravidade da esteatose hepática e as concentrações circulantes dos parâmetros bioquímicos.

Um modelo discriminante usando análise de correlação canônica esparsa (CCA) foi empregado para avaliar se uma combinação de biomarcadores circulantes poderia discriminar indivíduos com esteatose hepática daqueles sem esta condição. Foram empregadas, basicamente, dois tipos de análises: uma baseada em valores de concentração individuais e outra explorando o perfil de correlações entre vários marcadores em cada grupo clínico. O modelo discriminante utilizado na exploração dos dados foi baseado no CCA. Nesta análise, a forma como cada biomarcador se correlaciona entre si, ao invés de seus valores de concentração, é usada para inferir diferenças entre os grupos de estudo(144,145). Este modelo não é baseado no número de correlações, mas a qualidade (se a correlação é positiva ou negativa) e a força (valor de rho) são calculadas para testar as diferenças entre os grupos.

O grau de perturbação molecular (MDP) foi calculado usando valores dos parâmetros bioquímicos para inferir o grau de perturbação bioquímica (DBP) associado à esteatose hepática. Este método foi usado e detalhado anteriormente (144-146). No presente estudo, “Sem esteatose” foi definida como o grupo “referência”, e o nível médio e o desvio padrão desse grupo de referência foram calculados para as concentrações plasmáticas de cada marcador inflamatório. O escore PAD de um marcador individual em uma determinada amostra “s” foi definido pela diferença no nível de concentração na amostra “s” da média do marcador no grupo de referência dividido pelo desvio padrão correspondente. Assim, a pontuação do PAD representa o número de desvios padrão da referência. Indivíduos que apresentaram valores de PAD acima de dois desvios-padrão do valor médio dos controles foram considerados bioquimicamente perturbados.

Um modelo de regressão multivariável utilizando variáveis com p-valor univariado  $<0,2$  foi realizado para avaliar as razões de chance (OR) e intervalos de confiança de 95% (ICs) das associações entre os valores dos parâmetros indicados e a ocorrência de esteatose hepática. A análise da curva Receiver Operator Characteristics (ROC) foi empregada para testar o desempenho dos níveis plasmáticos de TGF- $\beta$  para distinguir pacientes com ou sem esteatose hepática.

As análises estatísticas foram realizadas usando GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA), STATA 11 (StataCorp, College Station, TX, EUA), JMP 14.0 (SAS, Cary, NC, EUA) e software estatístico R.

#### 4.7.2 Ensaio clínico randomizado

As variáveis quantitativas foram descritas com mediana (intervalos interquartis) e medidas de frequência simples e relativas foram utilizadas para descrever as variáveis categóricas. Para comparar os exames laboratoriais e os parâmetros antropométricos entre as visitas 4 e 1 será utilizado o teste t para amostras pareadas ou o teste não paramétrico de Wilcoxon, se indicado. A avaliação da variação do peso, IMC e CA e composição corporal através da bioimpedância entre as visitas 1,2,3 e 4 foi calculada pela análise de variância de medidas repetidas (MANOVA). O programa Stata 11.0 foi utilizado para realizar as análises. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes.

As análises estatísticas foram realizadas usando GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA), STATA 11 (StataCorp, College Station, TX, EUA), JMP 14.0 (SAS, Cary, NC, EUA) e software estatístico R.

#### **4.8 Questões éticas**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, sob o número de parecer (Anexo H). Todos os participantes da pesquisa foram esclarecidos quanto aos seus objetivos e só foram avaliados após a assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) por um dos genitores ou responsável legal, e pelo Termo de Assentimento (TA) assinado pelo próprio adolescente, dentro dos termos exigidos pela resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

O projeto foi realizado no Ambulatório Docente Assistencial de Brotas, Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP), no ambulatório de obesidade. Foram descritas as etapas do projeto e da intervenção, o caráter cego e o uso de placebo com a possibilidade do participante ser alocado, de maneira randômica, no braço probiótico ou placebo, bem como os possíveis benefícios e riscos da intervenção. A participação foi voluntária. Os dados foram mantidos sob sigilo, tendo acesso às informações apenas o grupo de trabalho, que manteve sigilo absoluto, conforme termo de sigilo assinado previamente por todos os pesquisadores (Apêndice G), não sendo fornecidos os dados individuais para outros profissionais ou instituições.

Os adolescentes e um dos genitores ou responsável legal, após o término do protocolo, foram reavaliados e tiveram os resultados do estudo informados. Para aqueles com indicação de introdução de farmacoterapia, foram prescritos conforme indicação clínica pelos dois pesquisadores médicos do protocolo (JB e NBS), respectivamente, no Ambulatório de Pediatria do Ambulatório Docente Assistencial de Brotas (ADAB), vinculado ao curso de graduação em Medicina da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP) e no Ambulatório de Obesidade Infante-Juvenil, localizado no Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (Complexo HUPES) da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

## 5 RESULTADOS

O estudo desenvolvido tem seus resultados apresentados em duas etapas: 1) etapa de triagem dos adolescentes para identificação daqueles com DHGNA, resultando na comparação entre os adolescentes com e sem DHGNA, definidos segundo o método diagnóstico utilizado na triagem – a ultrassonografia; 2) etapa de realização do estudo de intervenção, com os resultados comparativos entre os momentos pré- e pós-intervenção dos adolescentes que tiveram o quadro de DHGNA confirmado com o método mais acurado, a ressonância nuclear magnética.

### 5.1 Comparação dos grupos com e sem DHGNA (Etapa 1)

#### 5.1.1 Características dos participantes

Noventa e dois adolescentes com sobrepeso e obesidade foram triados utilizando a ultrassonografia de abdome, dos quais 72 participantes foram incluídos na 1ª etapa, sendo 36 sem esteatose hepática e 36 com esteatose hepática.

A mediana (p25-p75) de idade foi menor ( $p=0,010$ ) em indivíduos sem esteatose (12,0; 10,2–14,7 anos) do que naqueles com esteatose (14,0; 12,0–16,0 anos), conforme mostrado na Tabela 1.

De modo similar, também se observou maiores valores medianos (p25 - p75) do indicador índice de massa corporal para idade - IMC/idade (2,59; 2,17-3,14 vs. 3,01; 2,57-3,44;  $p=0,012$ ) e da circunferência da cintura (87,8 (82,3 – 97,5 vs. 101,0 92,5 – 110,1;  $p=0,0003$ ) em adolescentes com esteatose, mas não a frequência de obesidade abdominal ( $p=0,245$ ). Esses adolescentes com esteatose também tinham hipertensão e síndrome metabólica com mais frequência do que aqueles do grupo comparativo (Tabela 1).

**Tabela 1 - Características dos 72 adolescentes participantes da triagem inicial do estudo, atendidos no ambulatório Docente Assistencial da Escola Bahiana de Medicina, cidade de Salvador, Bahia**

Características	Sem DHGNA	com DHGNA	P
	(N=36)	(N=36)	
	N (%)	N (%)	
<b>Idade(anos)*</b>	12,5 (10,2-14,7)	14,0 (12,0-16,0)	<b>0,010</b>
<b>Sexo masculino</b>	16 (44.4)	20 (55.7)	0,480
<b>Síndrome metabólica</b>	2 (5.6)	8 (22.2)	0,085
<b>Obesidade grave</b>	12 (33.3)	19 (52.8)	0,153
<b>IMC/Idade (Z- escore)*</b>	2.59 (2.17 – 3.14)	3.01 (2.57 – 3.44)	<b>0,012</b>
<b>Circunferência cintura &gt; p90</b>	26 (72.2)	31 (86.1)	0,245
<b>Circunferência cintura (CC)*</b>	87.8 (82.3 – 97.5)	101.0 (92.5 – 110.1)	<b>0,0003</b>
<b>Hipertensão arterial</b>	2 (5,6)	10 (27,8)	<b>0,024</b>
<b>PAS (mmHg)*</b>	115.5 (107.5 – 121.5)	114.5 (105.5 – 123.0)	0,879
<b>PAD (mmHg)*</b>	70.0 (64.5 – 73.5)	70.0 (62.5 – 79.5)	0,561

IMC: Índice de Massa Corporal; PAS: Pressão Arterial Sistólica; PAD: Pressão Arterial Diastólica.

\* Os dados representam mediana e intervalo interquartil. Os demais estão expressos em frequência absoluta (%). O teste U de Mann-Whitney foi usado para comparar a idade, os dados antropométricos e a distribuição da pressão arterial entre os grupos e o teste exato de Fisher foi usado para comparar a frequência de indivíduos do sexo masculino e a frequência de comorbidades entre os grupos. Os valores *p* em negrito são estatisticamente significativos.

### 5.1.2 Comparação dos parâmetros bioquímicos do sangue periférico entre participantes com e sem esteatose hepática

Foram examinadas a expressão de 25 parâmetros no sangue periférico para comparar os perfis bioquímicos e inflamatórios dos adolescentes com ou sem esteatose hepática.

A Tabela 2 mostra as comparações destes parâmetros entre os grupos com e sem esteatose hepática diagnosticada pela ultrassonografia.

**Tabela 2** - Comparação dos marcadores bioquímicos e inflamatórios entre os 72 participantes da triagem inicial, identificados com e sem DHGNA, por via ultrassonográfica, atendidos no ambulatório Docente Assistencial da Escola Bahiana de Medicina, na cidade de Salvador, Bahia

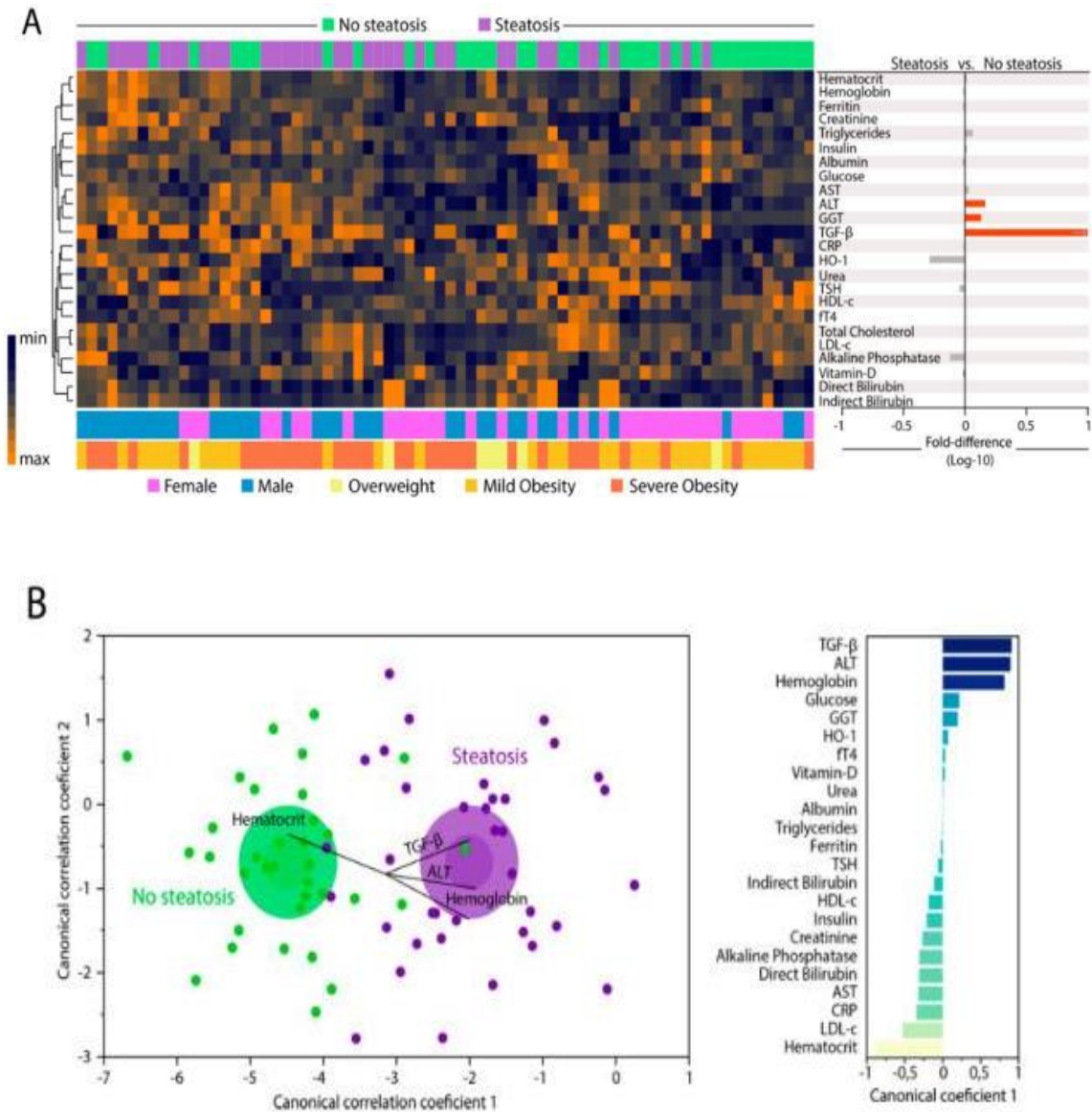
<b>Marcadores bioquímicos</b>	<b>Unidade</b>	<b>Sem DHGNA</b>	<b>Com DHGNA</b>	<b>P</b>
Hematócrito	%	38,9 (36,5-40,4)	38,8 (37,5-41,5)	0,4014
Hemoglobina	g/dL	13,1 (12,3-13,8)	13,2 (12,7-14,2)	0,1969
Glicose	mg/dL	87,3 (84,1-91,8)	87,3 (84,4-91,5)	0,9282
Insulina	UI/mL	15,2 (9,4-24,0)	16,1 (9,5-22,4)	0,7270
Homa-IR	-	3,4 (2,2 – 4,9)	3,5 (2,1 – 4,5)	0,6769
Colesterol total	mg/dL	159,0 (140,5-180,0)	157,5 (123,5-181,5)	0,2414
HDL-c	mg/dL	41,0 (37,2-47,0)	39,35 (33,0-45,7)	0,0953
LDL-c	mg/dL	89,6 (79,8-113,5)	91,5 (71,0-108,3)	0,3440
Triglicérides	mg/dL	82,5 (71,0-124,3)	97,5 (79,0-145,5)	0,1990
Ureia	mg/dL	22,0 (19,0-26,7)	21,0 (18,0-25,5)	0,4428
Creatinina	mg/dL	0,63 (0,60-0,70)	0,64 (0,57-0,79)	0,6563
AST	U/L	19,1 (17,0-23,9)	21,0 (18,0-26,5)	0,3489
ALT	U/L	16,0 (12,2-21,8)	24,4 (18,4-33,6)	<b>0,0008</b>
GGT	U/L	18,0 (16,0-23,0)	25,0 (17,2-36,5)	<b>0,0185</b>
Fosfatase alcalina	U/L	256,2 (134,3-327,5)	189,5 (89,5-264,8)	0,0514
Albumina	g/dL	4,4 (4,2-4,6)	4,45 (4,3-4,7)	0,3540
Bilirrubina direta	g/dL	0,16 (0,13-0,22)	0,16 (0,12-0,20)	0,4770
Bilirrubina indireta	g/dL	0,17 (0,10-0,24)	0,17 (0,10-0,29)	0,9955
TSH	μUL/ml	2,2 (1,6-3,0)	2,0 (1,45-3,23)	0,5246
T4 livre	ng/dL	1,2 (1,0-1,3)	1,16 (1,06-1,26)	0,5580
Ferritina	ng/mL	68,1 (43,7-81,9)	72,2 (42,4-108,5)	0,2771
25-OH Vitamina D	ng/mL	21,7 (19,1-24,8)	20,5 (18,1-24,3)	0,4850
PCR ultrasensível	mg/dL	0,25 (0,10-0,62)	0,25 (0,09-0,50)	0,9148
TGF-β	pg/mL	4,58 (0,11-15,3)	539,0 (31,3-706,1)	<b>0,0001</b>
HO-1	pg/mL	47,9 (12,1-98,4)	24,1 (11,1-68,9)	0,3384

O teste U de Mann-Whitney foi usado para comparar variáveis contínuas entre os grupos. Os valores de *p* em negrito foram estatisticamente significativos.

Os indivíduos com DHGNA exibiram uma tendência de diminuição dos níveis de HO-1 e fosfatase alcalina e aumento dos níveis de triglicerídeos, AST, ALT, GGT e TGF- $\beta$  (Figura 4A, painel esquerdo e Tabela 2). A análise de diferenças de vezes das concentrações circulantes de cada marcador bioquímico está resumida na Figura 3A, painel direito. Entre todos os marcadores, apenas os valores medianos de ALT, GGT e TGF- $\beta$  foram estatisticamente distintos entre os grupos de estudo, com valores mais elevados sendo detectados no grupo de participantes com DHGNA (todos com p-valor ajustado  $<0,05$ ).

Empregou-se modelo discriminante usando análise de correlação canônica esparsa (CCA), observou-se que os pacientes com DHGNA podem ser distinguidos daqueles sem esteatose com alto grau de precisão (área sob a curva (AUC) da curva de características do operador do receptor (ROC) = 0,97 (IC: 0,85-1,0), sensibilidade 91% (IC: 77,0–96,7), especificidade 86% (72,0–94,0);  $p < 0,0001$ , Figura 3B, painel esquerdo). A avaliação dos valores dos coeficientes canônicos do modelo CCA revelou que os marcadores mais significativos responsáveis pela discriminação entre indivíduos com ou sem DHGNA foram LDL-c, triglicerídeos, TGF- $\beta$ , ALT, HDL-c e hematócrito (Figura 4B, direita painel).

**Figura 4** - Alterações nas proteínas bioquímicas do sangue periférico de pacientes com e sem esteatose hepática



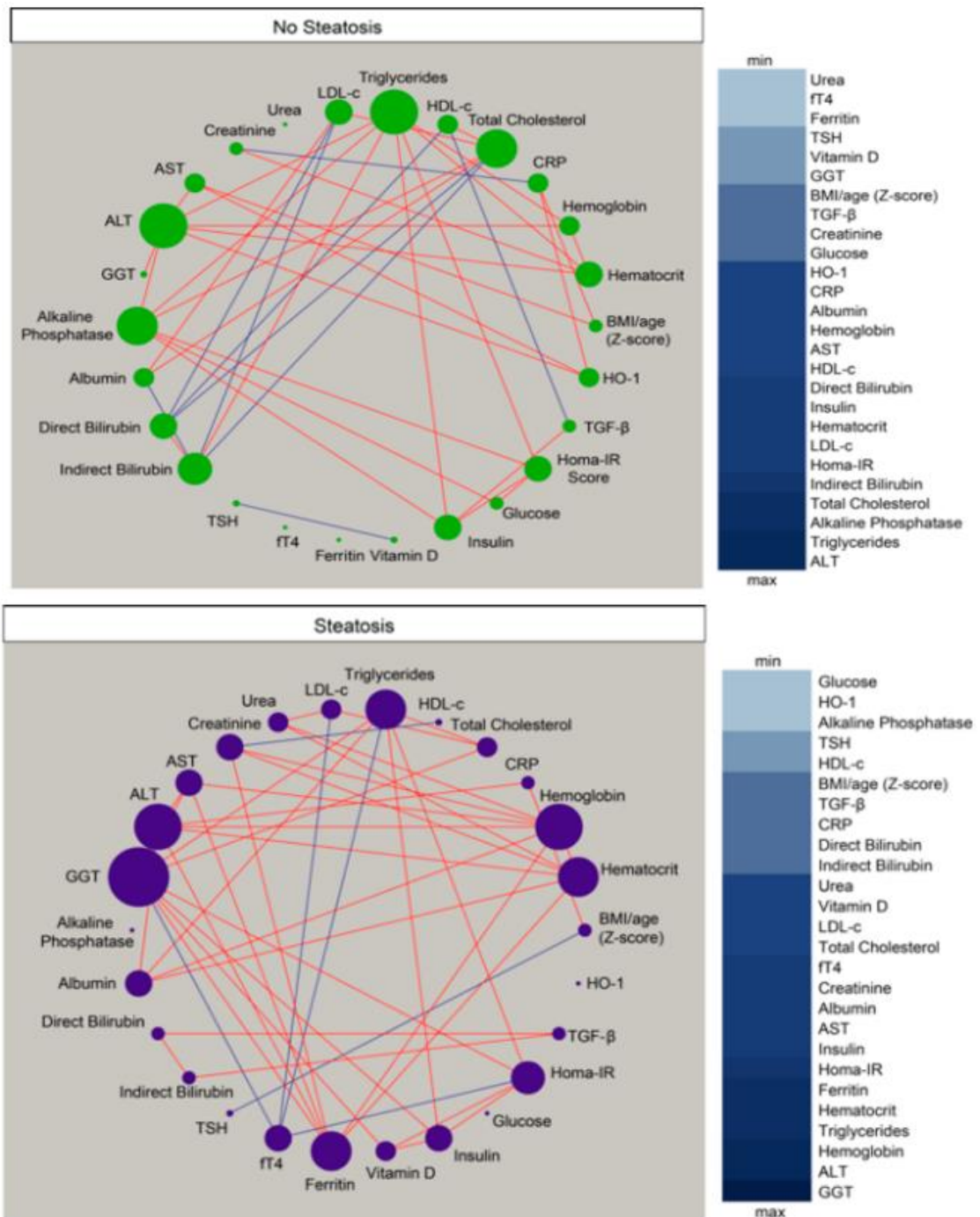
(A) Painel superior: Na análise de agrupamento hierárquico (método de Ward com bootstrap 100X) foi empregado para representar a expressão geral das proteínas plasmáticas na população do estudo. Painel direito: Valores médios de diferença nos níveis de proteínas plasmáticas para pacientes com esteatose hepática e grupo sem esteatose. As diferenças que alcançaram significância estatística com o teste U de Mann-Whitney ajustado para comparações múltiplas usando o método de Holm-Bonferroni ( $p$  ajustado  $< 0,05$ ) são representadas em barras coloridas. (B) Painel inferior: em uma abordagem exploratória, uma análise de correlação canônica esparsa (sCCA) foi empregada para testar se os grupos experimentais poderiam ser distinguidos com base nos perfis de correlação dos marcadores circulantes combinados. A análise vetorial foi usada para traçar a direção de influência dos parâmetros mais significativos no espaço canônico. Painel direito: os escores dos coeficientes canônicos foram calculados para identificar os biomarcadores responsáveis pela diferença entre os grupos no modelo sCCA. Abreviaturas (ordem alfabética): ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; PCR: proteína C reativa; ft4: tiroxina livre; GGT: gama-glutamil transferase; HDL-c: colesterol de alta densidade; HO-1: heme oxigenase-1; TGF- $\beta$ : fator transformador de crescimento  $\beta$ ; TSH: hormônio estimulador da tireoide.

### 5.1.3 Perfil de correlações entre os parâmetros bioquímicos do sangue e a presença de DHGNA



Empregando uma abordagem com análise de rede, em que as correlações de Spearman são visualizadas como conexões entre os parâmetros, para identificar a dinamicidade, força e qualidade das relações entre os valores dos marcadores bioquímicos e proteínas inflamatórias no plasma dos diferentes grupos de indivíduos, foi identificado que as redes dos grupos clínicos distintos exibiram diferenças na complexidade e na qualidade das interações estatísticas entre os marcadores bioquímicos (Figura 4).

**Figura 5** - Mudanças nas correlações entre as concentrações de proteínas plasmáticas nos pacientes com DHGNA



A análise de rede das matrizes de correlação de biomarcadores foi realizada com bootstrap (100  $\times$ ). Correlações significativas ( $p < 0,05$ ) são mostradas. Cada círculo representa um parâmetro diferente. O tamanho do círculo infere o número de correlações envolvendo cada parâmetro. As linhas representam os valores rho. A cor vermelha infere correlação positiva, enquanto a cor azul denota correlações negativas. O mapa de calor de análise de nó mostra o número de correlações estatisticamente significativas envolvendo cada marcador por grupo clínico. Abreviaturas (ordem alfabética): ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; IMC: índice de massa corporal; PCR: proteína C reativa; ft4: tiroxina livre; GGT: gama-glutamil transferase; HDL-c: colesterol de alta densidade; HO-1: heme oxigenase-1; Homa-IR: avaliação do modelo homeostático; TGF- $\beta$ : fator transformador de crescimento  $\beta$ ; TSH: hormônio estimulador da tireoide.

Independentemente do grupo clínico, a maioria das correlações relevantes foi positiva, o que significa que os aumentos nos valores de um determinado marcador foram seguidos por concentrações elevadas de outros parâmetros bioquímicos. É importante ressaltar que a densidade das redes (relacionada ao número de correlações estatisticamente significativas) foi maior no grupo de pacientes com DHGNA.

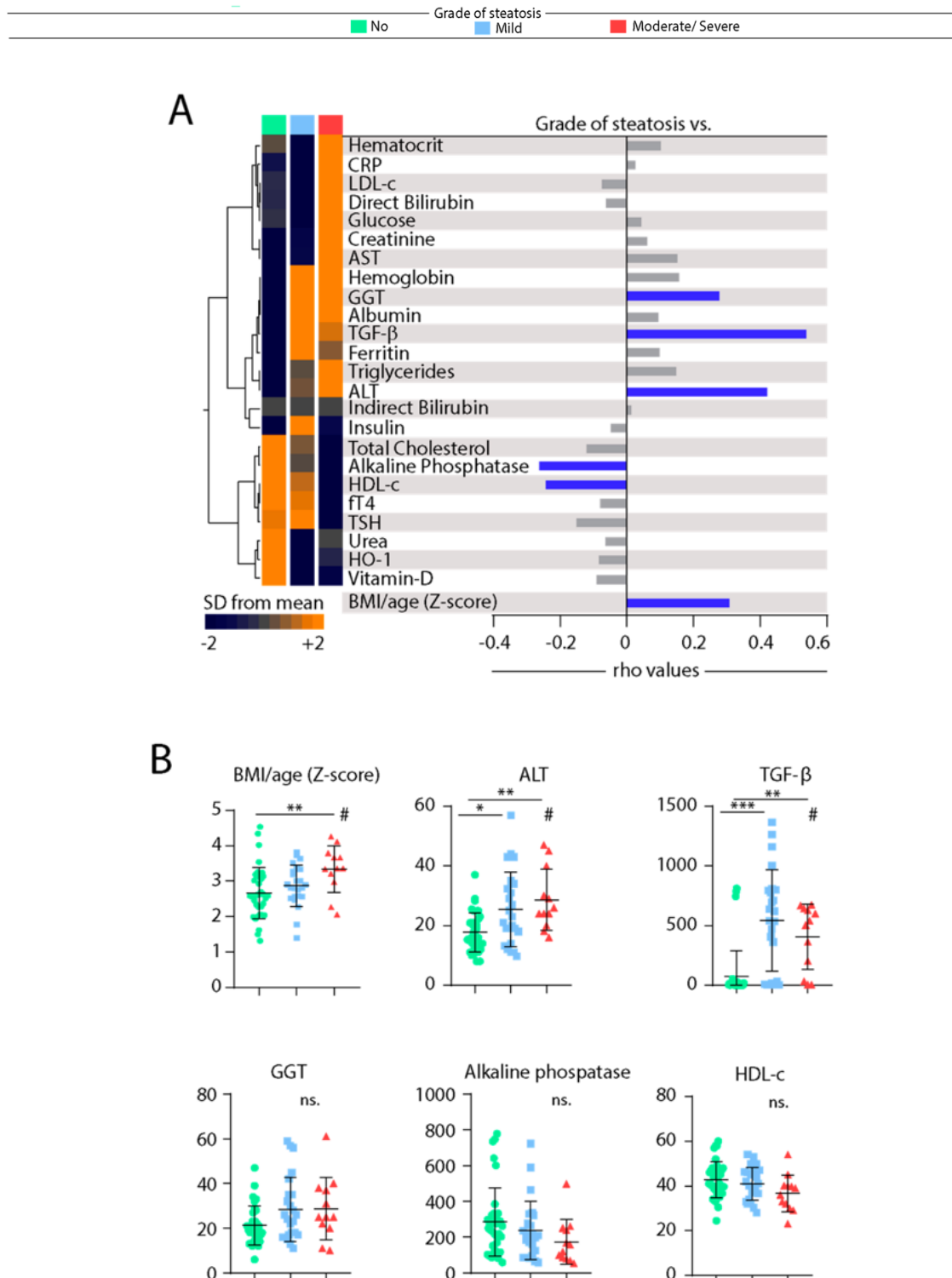
No grupo de participantes sem DHGNA, foram detectadas oito correlações significativas negativas enquanto no grupo com DHGNA foram observadas seis correlações negativas, destacando-se o T4 livre, que exibiu apenas interações negativas com os valores de Homa-IR, triglicérides, LDL-c e GGT. Digno de nota, os marcadores que exibiram o maior número de relações significativas no grupo de indivíduos sem DHGNA foram fosfatase alcalina, ALT e triglicérides (Figura 5, painel superior), enquanto no grupo de pacientes com DHGNA, GGT, ALT e hemoglobina foram os marcadores com maior conectividade nas redes (Figura 5, painel inferior). As análises também revelaram que o TGF- $\beta$  não foi o marcador com maior número de correlações nas distintas matrizes. No entanto, tal marcador estava relacionado com diferentes parâmetros nas redes e com perfis de correlação distintos (correlações positivas vs. negativas) (Figura 5), o que explica em parte porque o TGF- $\beta$  foi relevante para explicar as diferenças entre os grupos de estudo descritos em o modelo discriminante com base nas correlações descritas na Figura 5B.

#### 5.1.4 Associações entre o grau de DHGNA e os valores dos parâmetros bioquímicos no sangue periférico

Testou-se se aumentos graduais na gravidade da esteatose hepática seriam proporcionais às mudanças nos valores dos parâmetros bioquímicos no sangue. Foram calculados os valores medianos de cada parâmetro bioquímico por grupo de indivíduos estratificados de acordo com o grau de esteatose hepática (Tabela 3). Esses valores foram transformados em  $\log_{10}$  e o escore z normalizado para construir um mapa de calor para ilustrar as tendências na variação dos dados (Figura 6A, painel esquerdo). Esta análise revelou que os indivíduos estratificados com base no grau de esteatose apresentam um perfil de expressão distinto dos parâmetros bioquímicos. O agrupamento hierárquico dos parâmetros bioquímicos pôde identificar três agrupamentos principais. O primeiro cluster exibiu valores relativamente mais altos de hematócrito, PCR, LDL-c, bilirrubina direta, glicose, creatinina e AST naqueles com diagnóstico ultrassonográfico

de esteatose moderada ou grave (Figura 6A, painel esquerdo). O segundo cluster exibiu marcadores que apresentaram níveis semelhantes entre os grupos com esteatose leve ou moderada / grave, com níveis aumentados de hemoglobina, GGT e albumina. Além disso, os níveis de TGF- $\beta$  foram relativamente maiores no grupo de doença leve, enquanto os valores de triglicérides e ALT foram maiores na esteatose moderada / grave (Figura 6A, painel esquerdo). O último cluster apresentou níveis aumentados de colesterol total, fosfatase alcalina, HDL-c, fT4, ureia, HO-1 e vitamina D no grupo de indivíduos sem esteatose hepática (Figura 6A, painel esquerdo).

**Figura 6** - Correlação de Spearman dos parâmetros bioquímicos no sangue dos pacientes de acordo com o grau de DHGNA



(A) Painel esquerdo: os dados de cada parâmetro foram transformados em Log10. Os valores médios para cada grupo clínico indicado foram normalizados com escore z e uma análise de agrupamento hierárquica foi realizada para ilustrar os perfis bioquímicos gerais de acordo com o grau das doenças. Painel direito: correlação entre o grau de DHGNA e os parâmetros bioquímicos. A análise de correlação de Spearman foi usada e os valores de rho são mostrados. As linhas azuis representam correlações com relevância estatística. (B) Gráficos de dispersão das

concentrações do parâmetro indicado cujos valores apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de estudo usando o teste de Kruskal-Wallis com teste ad hoc de comparações múltiplas de Dunn (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , ns: não significativo) # representa a significância estatística ( $p < 0,05$ ) do teste ad hoc de tendência linear não paramétrica. As barras representam os valores medianos, enquanto os bigodes representam os intervalos interquartis. Abreviaturas (ordem alfabética): ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; IMC: índice de massa corporal; PCR: proteína C reativa; fT4: tiroxina livre; GGT: gama-glutamil transferase; HDL-c: colesterol de alta densidade; HO-1: heme oxigenase-1; TGF- $\beta$ : fator transformador de crescimento  $\beta$ ; TSH: hormônio estimulador da tireoide.

**Tabela 3** - Concentração de marcadores bioquímicos de acordo com o grau de DHGNA, 36 adolescentes participantes da triagem inicial do estudo, atendidos no ambulatório Docente Assistencial da Escola Bahiana de Medicina, na cidade de Salvador, Bahia)

Marcador bioquímico	Unidade	DHGNA			Valor de <i>p</i>	Resultado do pós teste
		Ausente	Leve	Moderada/Grave		
<b>IMC</b>	Kg/m <sup>2</sup>	28.6 (26.2-33.2)	31.4 (28.6-34.9)	38.1 (35.1-40.1)	<b>0.0005</b>	<b>b</b>
<b>IMC/Idade</b>	escore Z	2.6 (2.2 – 3.1)	2.9 (2.6 – 3.3)	3.4 (3.1 – 3.7)	<b>0.0080</b>	<b>b</b>
<b>Hematócrito</b>	%	38.9 (36.5-40.4)	38.4 (37.4-41.9)	39.4 (37.8-40.9)	0.6665	ns
<b>Hemoglobina</b>	g/dL	13.1 (12.3-13.8)	13.2 (12.6-14.4)	13.2 (12.8-14.2)	0.3985	ns
<b>Glicose</b>	mg/dL	87.3 (84.1-91.8)	85.9 (83.8-90.5)	89.7 (86.5-91.8)	0.2948	ns
<b>Insulina</b>	UI/mL	15.2 (9.4-24.0)	16.8 (9.34-22.7)	15.4 (9.5-21.4)	0.8844	ns
<b>Homa-IR</b>	-	3.4 (2.2 – 4.9)	3.7 (2.1 – 4.8)	3.3 (2.6 – 4.5)	0.8574	ns
<b>Colesterol total</b>	mg/dL	159.0 (140.5-180.0)	157.5 (119.3-181.5)	154 (135.8-180.5)	0.4939	ns
<b>HDL</b>	mg/dL	41.0 (37.2-47.0)	40.5 (34.7-46.8)	37.5 (30.5-40.0)	0.0736	ns
<b>LDL</b>	mg/dL	89.6 (79.8-113.5)	86.5 (68.0-108.3)	95.5 (83.3-116.0)	0.4842	ns

**Tabela 3** - Concentração de marcadores bioquímicos de acordo com o grau de DHGNA, 36 adolescentes participantes da triagem inicial do estudo, atendidos no ambulatório Docente Assistencial da Escola Bahiana de Medicina, na cidade de Salvador, Bahia) (Continuação)

Marcador bioquímico	Unidade	DHGNA			Valor de <i>p</i>	Resultado do pós teste
		Ausente	Leve	Moderada/Grave		
<b>Triglicérides</b>	mg/dL	82.5 (71.0-124.3)	97.5 (74.5-195.8)	107.5 (81.0-134.3)	0.4278	ns
<b>Ureia</b>	mg/dL	22.0 (19.0-26.7)	21.0 (17.0-27.7)	21.5 (19.0-25.5)	0.6584	ns
<b>Creatinina</b>	mg/dL	0.63 (0.60-0.70)	0.63 (0.57-0.78)	0.69 (0.55-0.80)	0.8367	ns
<b>AST</b>	U/L	19.1 (17.0-23.9)	19.5 (17.0-27.7)	22.5 (20.2-24.7)	0.2614	ns
<b>ALT</b>	U/L	16.0 (12.2-21.8)	22.0 (15.0-33.6)	25.0 (21.0-37.5)	<b>0.0016</b>	<b>a; b</b>
<b>GGT</b>	U/L	18.0 (16.0-23.0)	25.0 (17.0-35.0)	25.0 (20.5-37.7)	0.0576	ns
<b>Fosfatase alcalina</b>	U/L	256.2 (134.3-327.5)	206.4 (104.0-310.8)	138.0 (81.0-248.5)	0.0662	ns
<b>Albumina</b>	g/dL	4.4 (4.2-4.6)	4.45 (4.30-4.70)	4.45 (4.15-4.60)	0.6382	ns
<b>Bilirrubina direta</b>	g/dL	0.16 (0.13-0.22)	0.15 (0.11-0.19)	0.17 (0.12-0.21)	0.7231	ns
<b>Bilirrubina indireta</b>	g/dL	0.17 (0.10-0.24)	0.17 (0.05-0.25)	0.17 (0.10-0.42)	0.8829	ns
<b>TSH</b>	μUL/mL	2.2 (1.6-3.0)	2.3 (1.8-3.35)	1.48 (1.35-1.71)	0.0730	ns
<b>T4 livre</b>	ng/dL	1.2 (1.0-1.3)	1.2 (1.05-1.28)	1.13 (1.07-1.21)	0.7506	ns
<b>Ferritina</b>	ng/mL	68.1 (43.7-81.9)	73.7 (44.9-120.0)	72.2 (41.2-101.8)	0.4829	ns

**Tabela 3** - Concentração de marcadores bioquímicos de acordo com o grau de DHGNA, 36 adolescentes participantes da triagem inicial do estudo, atendidos no ambulatório Docente Assistencial da Escola Bahiana de Medicina, na cidade de Salvador, Bahia) (Continuação)

Marcador bioquímico	Unidade	DHGNA			Valor de <i>p</i>	Resultado do pós teste
		Ausente	Leve	Moderada/Grave		
<b>25OHvitamina D</b>	ng/mL	21.7 (19.1-24.8)	20.5 (18.2-24.2)	20.6 (14.9-24.4)	0.7230	ns
<b>PCR ultrasensível</b>	mg/dL	0.25 (0.10-0.62)	0.20 (0.08-0.41)	0.46 (0.10-0.76)	0.5051	ns
<b>TGF-β</b>	pg/mL	4.58 (0.11-15.3)	579.6 (20.67-796.2)	521.8 (73.52-637.3)	<b>0.0001</b>	<b>a; b</b>
<b>HO-1</b>	pg/mL	47.9 (12.9-98.4)	22.0 (11.0-65.5)	30.32 (10.0-110.6)	0.5385	ns

Os dados representam medianas e intervalos interquartis. Os dados foram analisados usando o teste de Kruskal-Wallis com comparações múltiplas de Dunn. Os valores de *p* em negrito foram estatisticamente significativos. Comparações ad hoc com valor de *p* <0,05: a Sem esteatose vs. esteatose leve, b Sem DHGNA vs. DHGNA moderada / grave. ns: não significativo.

Os valores de concentração de cada biomarcador foram examinados para correlação direta com o grau de esteatose hepática usando o teste de correlação de Spearman (Figura 6A, painel direito). Os valores de GGT, TGF-β, ALT e IMC / idade apresentaram correlação positiva, enquanto os da fosfatase alcalina e HDL-c foram negativamente correlacionados, com o grau de esteatose hepática (Figura 6A, painel direito). A Figura 6B mostra gráficos de dispersão com distribuição dos seis parâmetros que foram estatisticamente associados à gravidade da esteatose hepática na análise de correlação. Observamos que os valores medianos de IMC, ALT e TGF-β aumentaram nos indivíduos com esteatose pelo teste de Kruskal-Wallis. Os valores medianos de GGT, fosfatase alcalina e HDL-c não exibiram uma variação clara após o DHGNA. Digno de nota, embora as concentrações de TGF-β fossem maiores em indivíduos com esteatose, os valores eram indistinguíveis entre pacientes com doença leve e aqueles com apresentação moderada / grave (Figura 6B). A figura 6 representa com mais detalhes as correlações entre os valores de IMC, ALT e TGF-β quando todos os participantes do estudo foram investigados como um único grupo, independentemente da esteatose. É importante ressaltar que a concentração de TGF-β e ALT foram positivamente correlacionados com os valores de IMC /

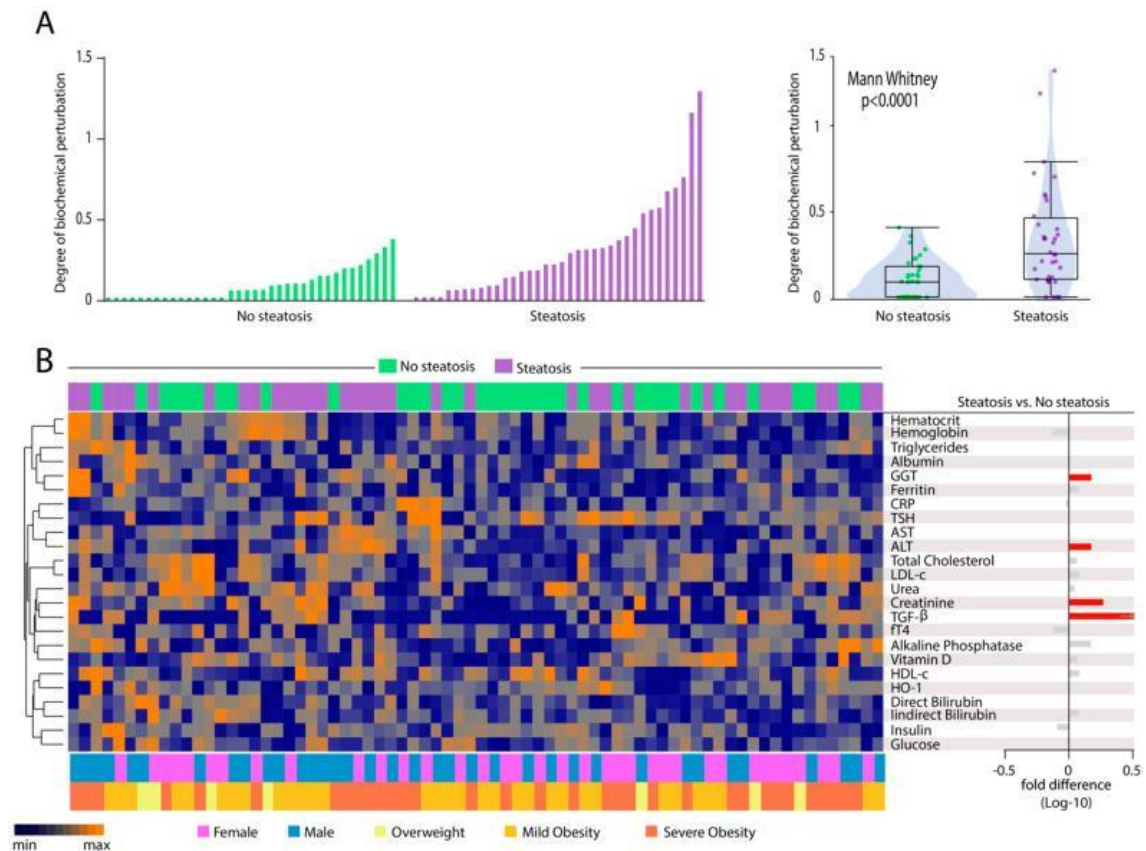


idade Z-score ( $r = 0,23$ ;  $p = 0,04$  e  $r = 0,34$ ;  $p = 0,003$ , respectivamente). Em análise semelhante também foi observada uma correlação positiva entre os níveis de TGF- $\beta$  e ALT ( $r = 0,31$ ;  $p = 0,0006$ ).

#### 5.1.5 DHGNA e grau de perturbação bioquímica no sangue periférico

A representação do Grau de Perturbação Bioquímica (PAD, conforme descrito em Métodos) está demonstrada na Figura 7A. Os pacientes com esteatose hepática exibiram aumento substancial nos valores de pontuação da PAD em comparação com aqueles sem esteatose ( $p < 0,0001$ ). Na análise de agrupamento hierárquico usando os valores PAD calculados para cada biomarcador (Figura 7B). Observou-se que embora os valores gerais de PAD fossem, em média, maiores em indivíduos com DHGNA, os valores de PAD individuais calculados para cada biomarcador não puderam distinguir claramente os subgrupos de participantes estratificados por ocorrência de esteatose (Figura 7B), grau de esteatose (Figura 6) ou grau de obesidade (Figura 4), bem como por sexo (Figura 7B). Apenas as perturbações de ALT, GGT, creatinina e TGF- $\beta$  foram estatisticamente maiores nos pacientes com esteatose (Figura 7B, painel direito).

**Figura 7** - Grau de perturbação bioquímica entre os grupos com e sem DHGNA



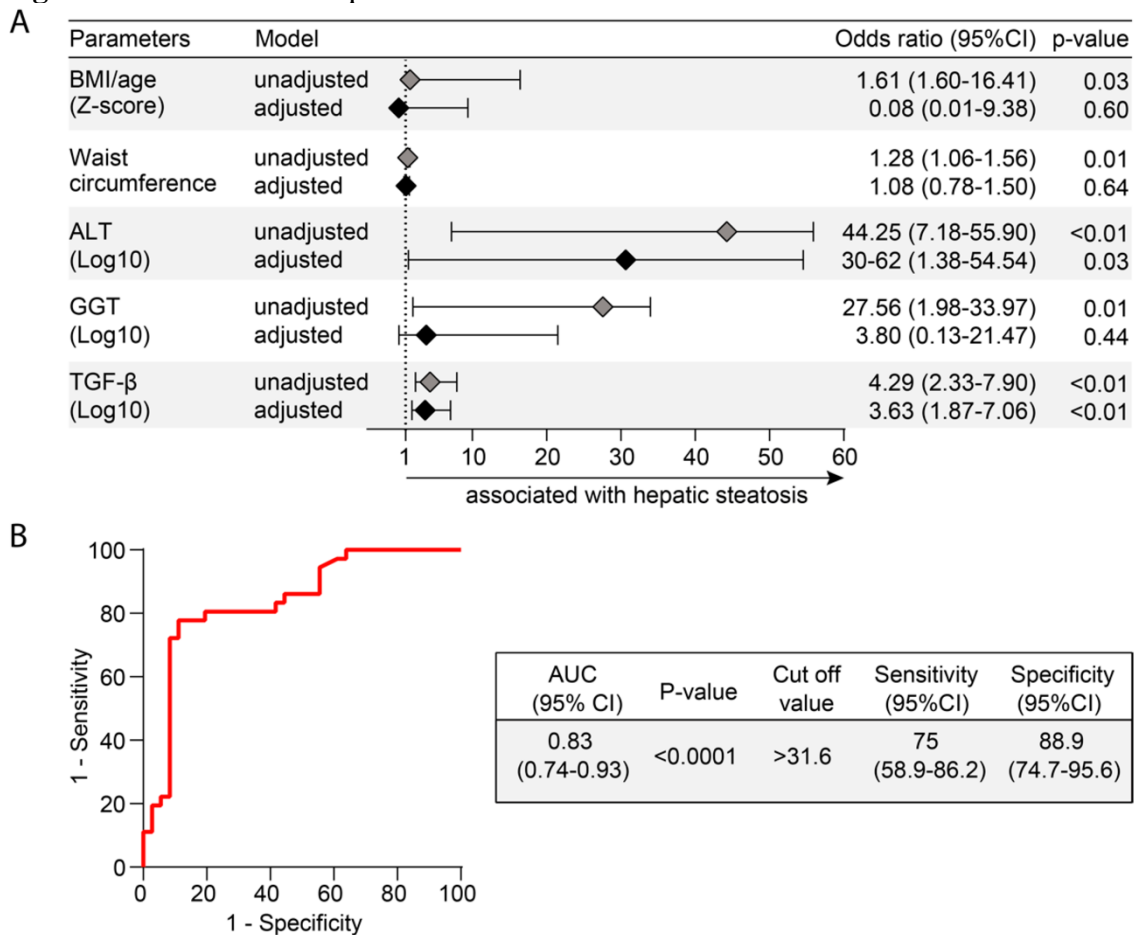
(A) Painel esquerdo: os histogramas mostram os valores de pontuação de grau de perturbação bioquímica (DBP) de amostra única em relação a cada grupo de estudo, conforme indicado. Painel direito: os gráficos em caixa representam a distribuição da PAD entre os grupos de estudo. Os valores foram comparados entre pacientes com e sem esteatose usando o teste U de Mann Whitney. (B) Painel esquerdo: uma análise de agrupamento hierárquico (método de Ward) foi empregada para mostrar o grau molecular de perturbação de cada marcador bioquímico. Painel direito: Valores médios de diferença na PAD para pacientes com esteatose hepática e grupo sem esteatose. Abreviaturas (ordem alfabética): ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; PCR: proteína C reativa; fT4: tiroxina livre; GGT: gama-glutamil transferase; HDL-c: colesterol de alta densidade; HO-1: heme oxigenase-1; TGF- $\beta$ : fator transformador de crescimento  $\beta$ ; TSH: hormônio estimulador da tireoide.

### 5.1.6 Associação entre DHGNA e níveis de TGF- $\beta$ e Hemeoxigenase

Empregou-se uma análise multivariada para identificar os parâmetros bioquímicos que poderiam estar independentemente associados à DHGNA. Os marcadores que apresentaram valor de  $p \leq 0,2$  em comparações univariadas entre os grupos de participantes com ou sem DHGNA foram incluídos no modelo multivariado (Tabelas 1 e 2 e Figura 8A). Após o ajuste para sexo, idade, IMC / escore z de idade e circunferência da cintura, aumentos em 1-log nas concentrações plasmáticas de TGF- $\beta$  foram associados a 3,63 maiores chances de DHGNA. Foi utilizada uma análise da curva ROC para calcular a precisão desse biomarcador potencial de

esteatose hepática. Descobriu-se que as concentrações plasmáticas de TGF- $\beta$  (valor de corte > 31,6 pg / mL) tiveram uma precisão total de 83% (área sob a curva (AUC) do ROC (IC de 95%) = 0,83 (0,74-0,93), com Sensibilidade de 75% e especificidade de 88,9% para diagnosticar esteatose hepática.

**Figura 8 - Parâmetros bioquímicos associados à DHGNA**



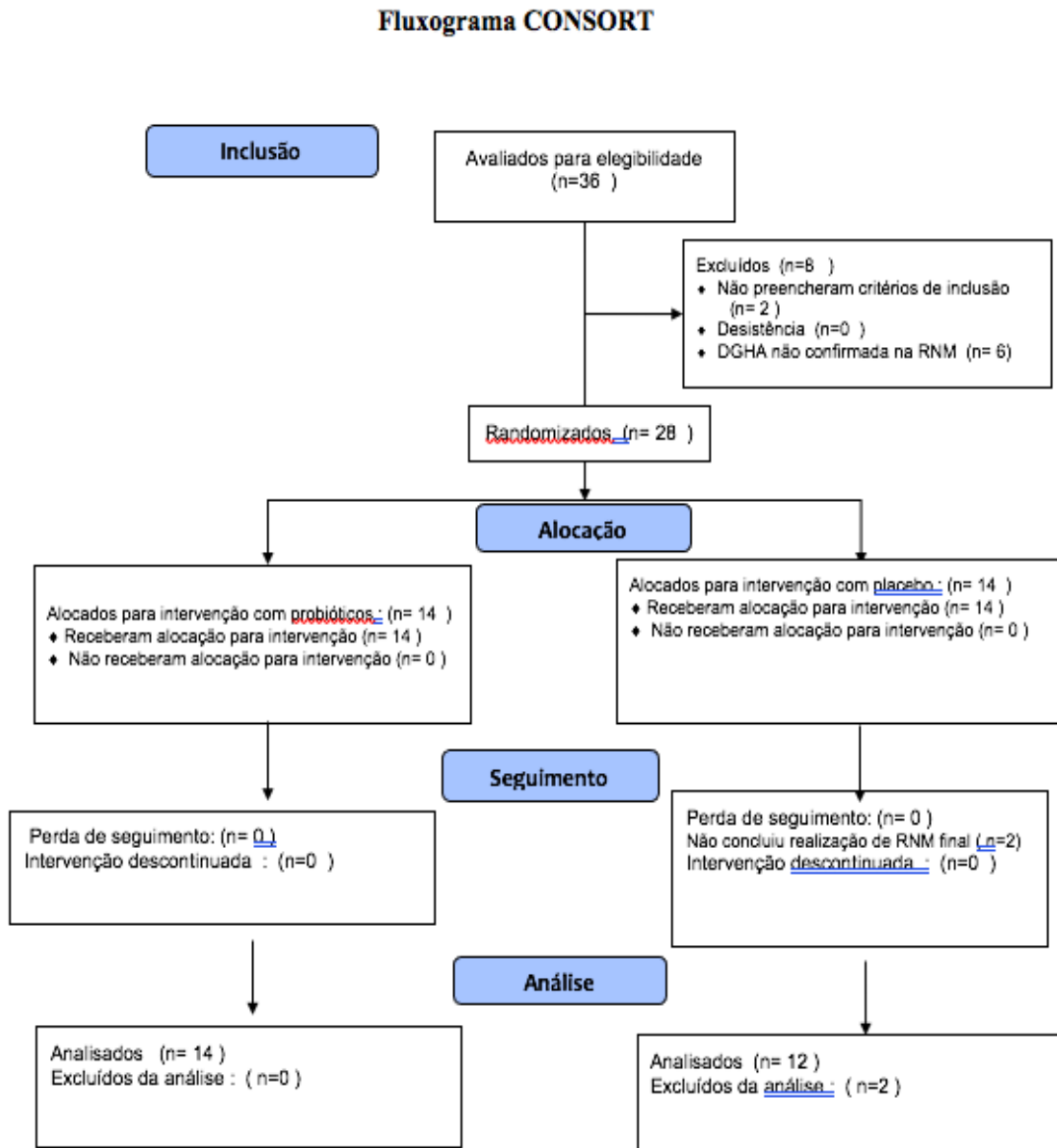
(A) Modelo de regressão multivariável de variáveis que foram estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em comparações univariadas (ver comparações univariadas nas Tabelas S1 e S2). (B) Curvas Receiver Operator Characteristic (ROC) foram empregadas para testar o desempenho do TGF- $\beta$  para distinguir pacientes com ou sem esteatose hepática. Abreviaturas (ordem alfabética): ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; AUC: área sob a curva; IMC: índice de massa corporal; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; GGT: gama-glutamil transferase; TGF- $\beta$ : fator transformador de crescimento  $\beta$ .

## 5.2 Ensaio Clínico Randomizado, Duplo-cego, Placebo controlado

Foram considerados elegíveis 36 pacientes com diagnóstico de DHGNA na ultrassonografia de triagem, os quais foram encaminhados para realizar a RNM. Neste grupo, foram excluídos dois

pacientes por possuírem transtornos psiquiátricos diagnosticados na consulta inicial e seis que não confirmaram a presença de DHGNA na RNM de abdome (Figura 9).

**Figura 9** - Fluxograma CONSORT do desenho do estudo



Para o estudo de intervenção foram arrolados 28 adolescentes entre 10 e 19 anos, com obesidade, segundo critérios antropométricos preconizados pela OMS e o Ministério da Saúde do Brasil (40). Todos apresentaram critério diagnóstico de DHGNA baseado nos dados do valor do PDFFF  $\geq 5,1\%$ . Dois participantes não completaram o protocolo para a avaliação radiológica

do efeito da intervenção na DHGNA, dado que não realizaram a segunda RNM (Figura 9). Assim, para os desfechos de PDFF e gravidade da DHGNA a amostra final foi de 26 adolescentes (14 no grupo Probiótico e 12 no grupo Placebo). Para os demais desfechos, a amostra final avaliada foi de 28 adolescentes.

### 5.2.1 Caracterização dos grupos intervenção e placebo na linha de base

As características demográficas, antropométricas e clínicas dos adolescentes com DHGNA no *baseline* estão descritas na Tabela 4.

**Tabela 4** - Comparação das características sociodemográficas, clínicas e antropométricas entre os grupos Probiótico (N=14) e Placebo (N=14), atendidos no ambulatório Docente Assistencial da Escola Bahiana de Medicina, na cidade de Salvador, Bahia)

Variáveis	Probiótico N (%)	Placebo N (%)	P
<b>Idade (anos)<sup>a</sup></b>	14,0 (12,0 - 16,2)	15,5 (12,0 - 16,2)	>0,999
<b>Sexo</b>			0,705
Masculino	08 (57,1)	07 (50,0)	
Feminino	06 (42,9)	07 (50,0)	
<b>Estrato sócio-econômico</b>			0,127
Estrato A e B	04 (33,3)	08 (66,7)	
Estrato C, D e E	10 (62,5)	06 (37,5)	
<b>Diagnóstico Antropométrico</b>			>0,999
Sobrepeso/obeso	5 (35,7)	5 (35,7)	
Obeso grave	9 (64,3)	9 (64,3)	
<b>Peso (kg)<sup>a</sup></b>	100,2(81,6-118,7)	102,7(76,9-110,3)	0,629
<b>Altura (cm)<sup>a</sup></b>	167,5(162,5-173,2)	166,5(163,2-173,2)	0,764
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)<sup>a</sup></b>	34,6(30,7-40,6)	34,7(29,1-37,6)	0,448
<b>IMC/idade (escore z)<sup>a</sup></b>	3,23(2,7-3,6)	3,11(2,4-3,4)	
<b>Circunferência da cintura</b>	105(95,4-114,5)	101,5(94-110,5)	0,462

**Tabela 4** - Comparação das características sociodemográficas, clínicas e antropométricas entre os grupos Probiótico (N=14) e Placebo (N=14), atendidos no ambulatório Docente Assistencial da Escola Bahiana de Medicina, na cidade de Salvador, Bahia)(Continuação)

<b>Variáveis</b>	<b>Probiótico N (%)</b>	<b>Placebo N (%)</b>	<b>P</b>
<b>Composição corporal</b>			
Percentual de gordura ( % )	46,1(41,3-51,8)	45,2(38,8-49,7)	0,338
Massa Gorda ( Kg )	46,2(35,9-57,8)	40,8(32,9-49,6)	0,206
Massa muscular esquelética( Kg)	29,3(25,9-31,9)	28,8(23,5-35,3)	0,783
RCQ			
Taxa metabólica basal ( Kcal)	0,94(0,89-0,97)	0,92(0,87-0,95)	0,289
	1515,5(1390,7-1598,5)	1499(1297-1726,7)	0,679
<b>DHGNA (Diagnóstico RNM)</b>			
<b>Leve</b>	9 (64,3)	9 (64,3)	>0,999
<b>Moderado</b>	5 (35,7)	5 (35,7)	
<b>Hipertensão</b>	1(7,1)	2(14,3)	0,538
<b>Síndrome Metabólica</b>	5(35,7)	2(14,3)	0,185
<b>Dislipidemia</b>	13(92,9)	11(78,6)	0,271
<b>Sedentarismo</b>	5 (35,7)	7 (50,0)	0,704

Os dados representam mediana e intervalo interquartil (variáveis contínuas) ou frequência (variáveis categóricas). O teste U de Mann-Whitney foi usado para comparar a idade, os dados antropométricos e a distribuição da pressão arterial entre os grupos e o teste exato de Fisher foi usado para comparar a frequência de indivíduos do sexo masculino e a frequência de comorbidades e sedentarismo entre os grupos.

Os grupos Probiótico e Placebo não apresentaram diferenças estatisticamente significantes quando comparadas todas as características clínicas, antropométricas e quanto a presença de comorbidades, conforme mostrado na Tabela 4.

A Tabela 5 compara os grupos intervenção e placebo em relação às características laboratoriais na linha de base. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes, exceto nos valores de colesterol total ( $p=0,041$ ). Os níveis médios de colesterol-LDL foram mais elevados na linha de base entre os adolescentes que receberam a intervenção com probióticos, de modo limítrofe ( $p=0,056$ ).

**Tabela 5** - Valores medianos (p25 – p75) dos parâmetros radiológicos e bioquímicos estudados entre os grupos probiótico (N= 14) e placebo (N=14) no baseline (pré-intervenção). ADAB, EBMSp, outubro de 2019 a fevereiro de 2020.

Variáveis	Probiótico	Placebo	Valor de P
	Mediana (p25 - p75)	Mediana (p25 - p75)	
PDFF (%)	9,8(7,2-18,1)	9,9(7,1-19,1)	0,783
Rigidez Hepática (kPa)	2,5(2,3-2,8)	2,5(2,3-2,7)	0,488
AST	21,0(18,7-28,2)	21,0(16,7-25,5)	0,730
ALT	25,0(19,0-40,7)	26,0(20,0-37,0)	0,713
GGT	30,5(20,7-48,0)	25,5(17,7-32,0)	0,214
Fosfatase alcalina	160,5(84,7-280,0)	159,5(85,0-222,5)	0,713
Relação ALT:AST	0,84(0,7-1,0)	0,78(0,65-0,92)	0,250
Glicemia (mg/dl)	86,3 (85,2-90,3)	88,1 (84,3-92,0)	0,748
Insulina (mUI/L)	17,3(11,4-23,8)	15,4 (8,8-21,7)	0,358
HOMA-IR	3,7 (2,3-5,1)	3,3 (2,1-4,5)	0,505
Colesterol Total	173,5 (134,0-189,0)	142(114,0-163,0)	<b>0,041</b>
HDL-colesterol	38,5(32,0-46,2)	39,5(33,0-47,7)	0,765
LDL-colesterol	102,5(83,0-123,7)	85,0 (59,0-101,5)	<b>0,056</b>
Triglicerídeos	115,0(85,5-220,0)	97(68,2-130,5)	0,198
Ferritina	74,1((43,5-163,6)	70,3(55,2-129,9)	0,963
PCR-US	0,4(0,2-0,5)	0,2(0,1-0,9)	0,748
Vitamina D	20,7(19,7-24,2)	19,3(14,5-25,2)	0,312

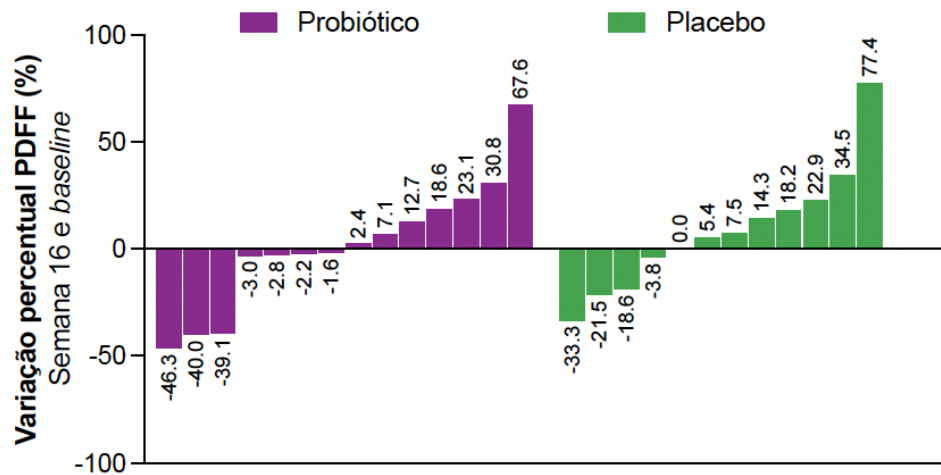
Os dados representam mediana e intervalo interquartil (variáveis contínuas). O teste U de Mann-Whitney foi usado para comparar os parâmetros bioquímicos entre os grupos. Os valores *p* em negrito são estatisticamente significativos.

### 5.2.2 Efeito do uso do probiótico nos valores de PDFF e Rigidez hepática obtidos na RNM

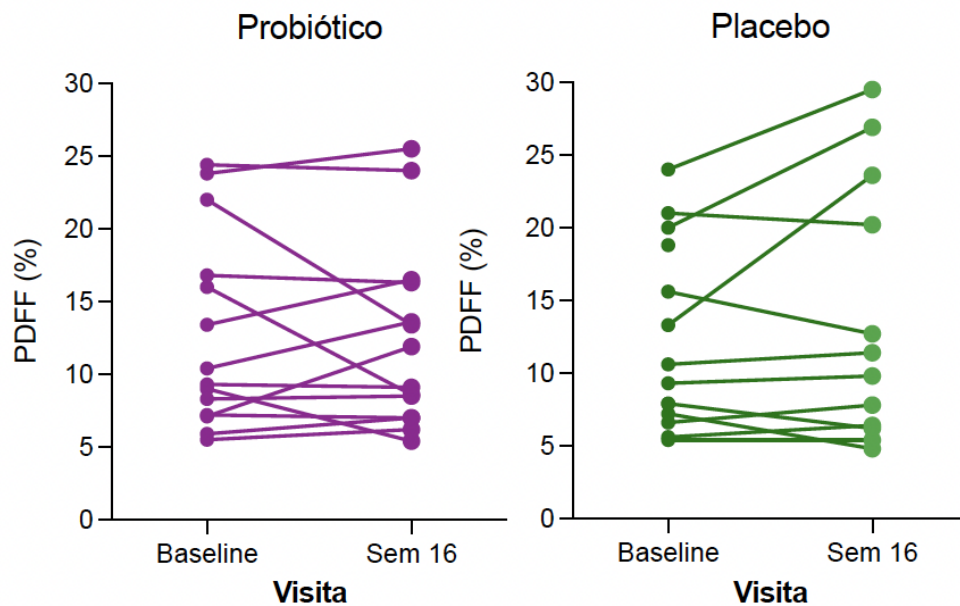
O efeito do uso do probiótico *Lactobacillus Acidophilus* LA-5® e *Bifidobacterium Lactis* BB-12® nos valores de PDFF obtidos na RNM estão descritos nos gráficos 1A e 1B.

**Gráfico 1 - 1A**– Variação percentual dos valores do PDFF entre o baseline e a semana 16 (Sem 16) para os grupos Probiótico e Placebo; **1B** – Variação dos valores absolutos de PDFF entre o baseline e a semana 16 (Sem 16). ADAB, EBMSP, outubro de 2019 a fevereiro de 2020

**A. Mudança relativa do percentual de gordura hepática após 16 semanas**



**B. Variação dos valores absolutos de PDFF entre o baseline e a semana 16**



Observou-se uma diferença percentual média (DP) positiva entre a semana 16 e a linha de base, em ambos os grupos, respectivamente, 1,97 (30,20) vs. 8,59(29,21), para os grupos Probiótico e Placebo, não significante ( $p=0,607$ ). Em termos de variação absoluta, a redução média (DP) do percentual de gordura hepática estimado pelo PDFF foi, respectivamente para os grupos Probiótico e Placebo, de -0,44(3,79) e +1,52(4,01) ( $p=0,504$ ). Conforme observado nos gráficos

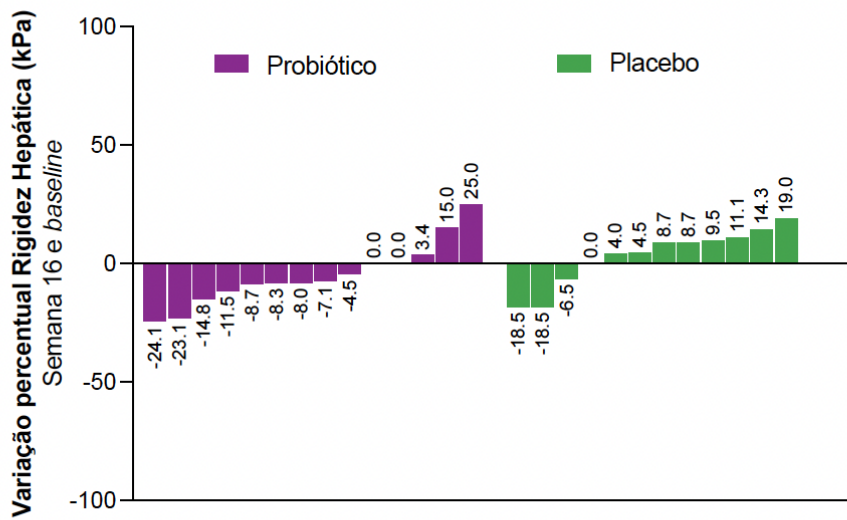


1A e 1B, houve muita diversidade nas respostas ao uso do probiótico e do placebo. Destaca-se que as três maiores reduções do percentual de esteatose hepática ocorreram no grupo Placebo.

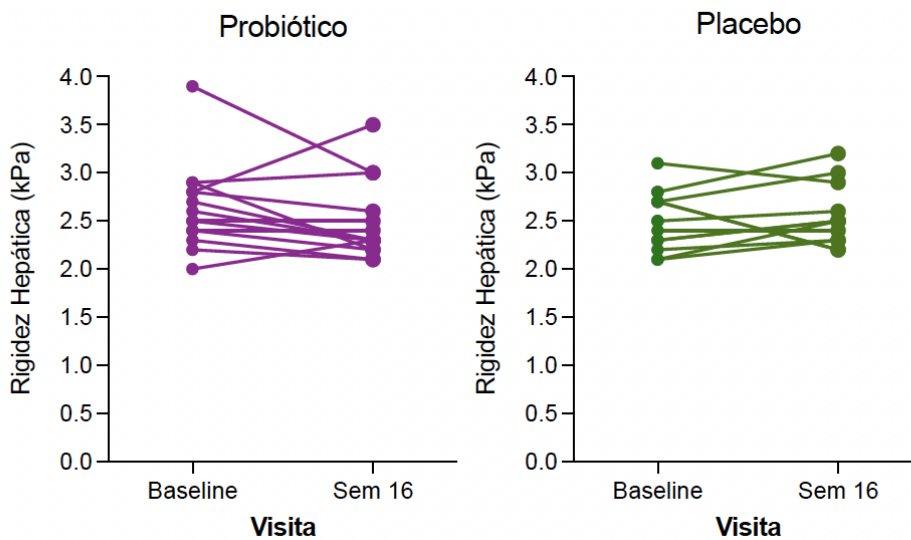
Os achados para a variação dos valores de rigidez hepática estão mostrados no gráfico 2A e 2B.

**Gráfico 2 - 2A**– Variação percentual dos valores de rigidez hepática entre o baseline e a semana 16 para os grupos Probiótico e Placebo. **2B** – Variação dos valores absolutos de rigidez hepática entre o baseline e a semana 16. ADAB, EBMS, outubro de 2019 a fevereiro

**A. Mudança relativa do percentual de rigidez hepática após 16 semanas**



**B. Variação dos valores de rigidez hepática entre o Baseline e a semana 16**



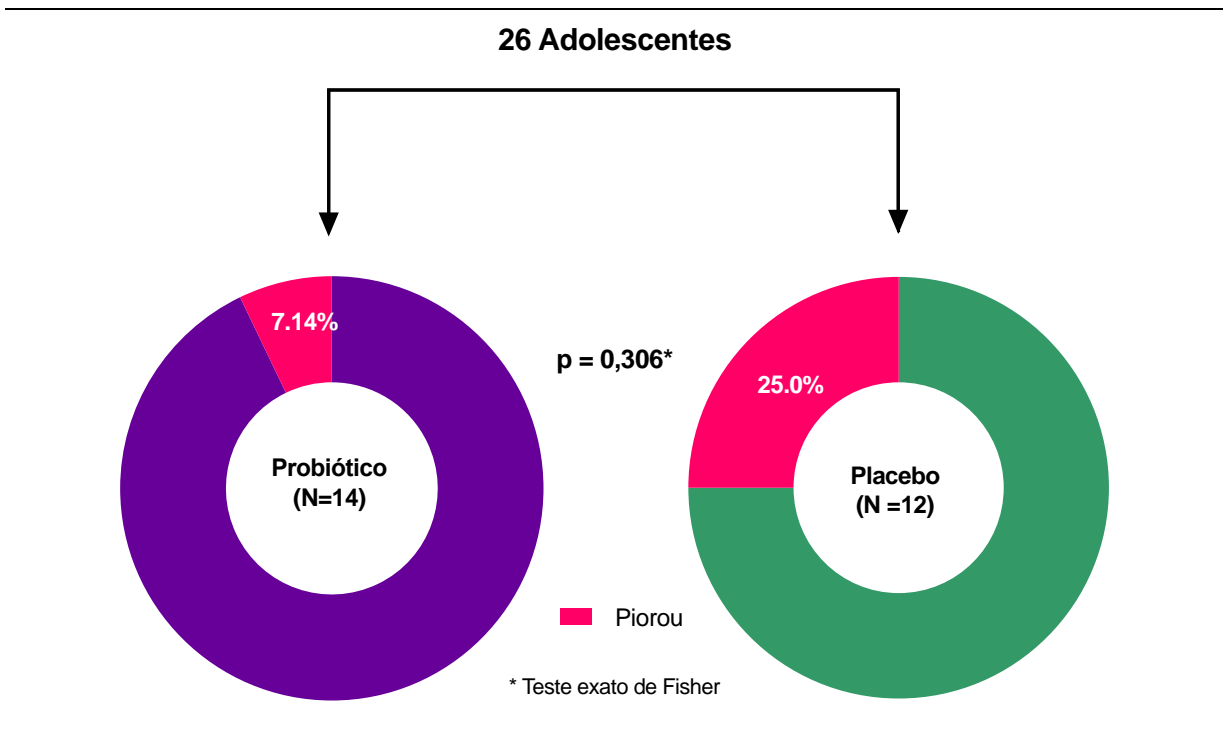
Para os valores de rigidez hepática, observou-se uma redução média da diferença percentual entre a semana 16 e a linha de base, para o grupo Probiótico, enquanto houve aumento médio

no grupo placebo (-4,77[13,28] vs. 3,03[12,01];  $p=0,045$ ). Em termos de variação absoluta, a redução média (DP) da rigidez hepática foi de -0,15(0,39), para o grupo Probiótico, e aumento médio de 0,06(0,31), entre os adolescentes que receberam o Placebo ( $p=0,045$ ).

### 5.2.3 Efeito do uso do probiótico na gravidade da DHGNA

Observou-se que, dentre os 12 adolescentes que foram alocados aleatoriamente no grupo placebo, três indivíduos (25,0%) apresentaram piora na classificação da gravidade da esteatose hepática. No grupo que recebeu a intervenção, dentre os 14 participantes, apenas um adolescente (7,1%) apresentou piora na classificação da esteatose hepática baseado na classificação de gravidade, segundo as faixas de valores do PDFF obtidos antes e depois, através da ressonância magnética (Gráfico 3).

**Gráfico 3** - Efeito do uso de Probiótico na gravidade da DHGNA (piora da classificação) entre os grupos probiótico (N=14) e placebo (N=12) após a intervenção. ADAB, EBMSP, outubro de 2019 a fevereiro de 2020.



#### 5.2.4 Efeito do uso do probiótico nos parâmetros bioquímicos hepáticos

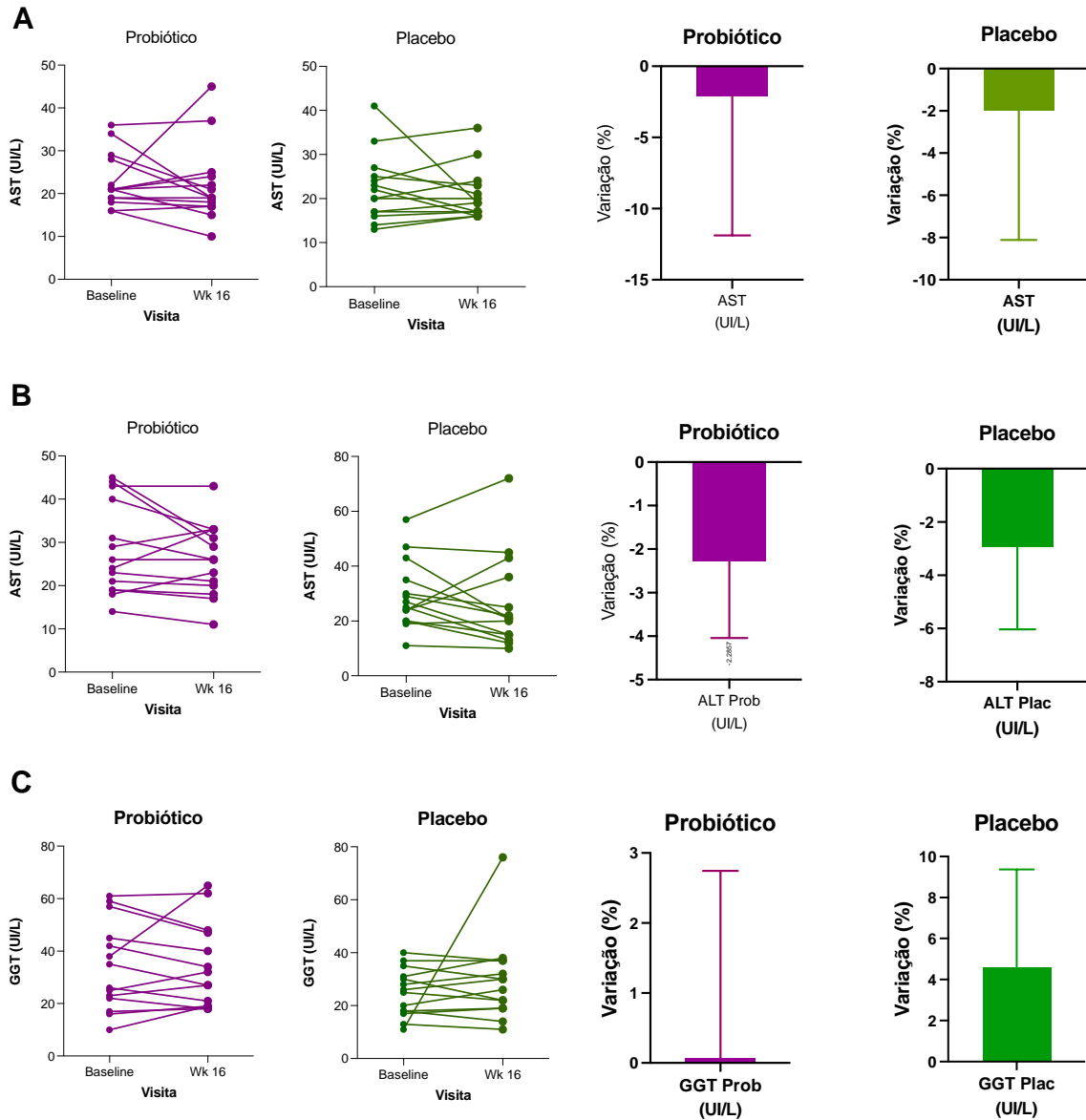
As diferenças absolutas e percentuais dos valores de AST, ALT, GGT, fosfatase alcalina e da relação AST/ALT entre a semana 16 (pós-intervenção) e o *baseline* (pré-intervenção) estão descritos na tabela 6 e no gráfico 4.

**Tabela 6** - Comparação das diferenças absolutas e percentuais (antes e após a intervenção) dos parâmetros bioquímicos hepáticos entre os grupos Probiótico (N=14) e Placebo (N=14). ADAB, EBMSp, outubro de 2019 a fevereiro de 2020

Parâmetros	Probiótico	Placebo	p
	Média (DP)	Média (DP)	
AST (U/L)			
Valor absoluto	-0,93 (8,72)	-1,5 (7,03)	0,518
% do <i>baseline</i>	-2,08 (36,72)	-1,98 (22,92)	0,358
ALT (U/L)			
Valor absoluto	-2,29 (6,58)	-2,93 (11,59)	0,519
% do <i>baseline</i>	-5,03 (20,39)	-10,14 (38,96)	0,270
GGT (U/L)			
Valor absoluto	0,07 (10,00)	4,57 (17,93)	0,381
% do <i>baseline</i>	7,58 (35,28)	0,76 (4,65)	0,923
Fosfatase alcalina (mg/dl)			
Valor absoluto	-2,79 (34,57)	-3,14 (53,62)	0,448
% do <i>baseline</i>	-0,51 (15,36)	-1,39 (29,11)	0,291
Relação AST/ALT			
Valor absoluto	0,01 (0,20)	0,16 (0,34)	0,312
% do <i>baseline</i>	1,99 (22,49)	22,21 (44,17)	0,291

Não foram observadas diferenças significativas na variação dos parâmetros bioquímicos hepáticos analisados entre o *baseline* (pré-intervenção) e a semana 16 (pós-intervenção). Adicionalmente, observa-se a amplitude das respostas obtidas entre os adolescentes estudados, caracterizada pelos elevados valores de desvio-padrão observados (gráfico 4).

**Gráfico 4 - A, B e C – Evolução dos valores de AST (U/L), ALT (U/L) e GGT (U/L) no baseline e semana 16, estratificado de acordo com o tipo de grupo de estudo (Probiótico e Placebo). ADAB, EBMSp, outubro de 2019 a fevereiro de 2020.**



As linhas dos gráficos de variação relativa indicam o desvio-padrão da média das diferenças relativas.

### 5.2.5 Efeito do uso do probiótico nos parâmetros bioquímicos do metabolismo glicídico

A Tabela 7 e o Gráfico 5 mostram, respectivamente, a variação absoluta e percentual dos valores de glicemia, insulina e HOMA-IR antes e após a intervenção e os valores obtidos no *baseline* e na semana 16.

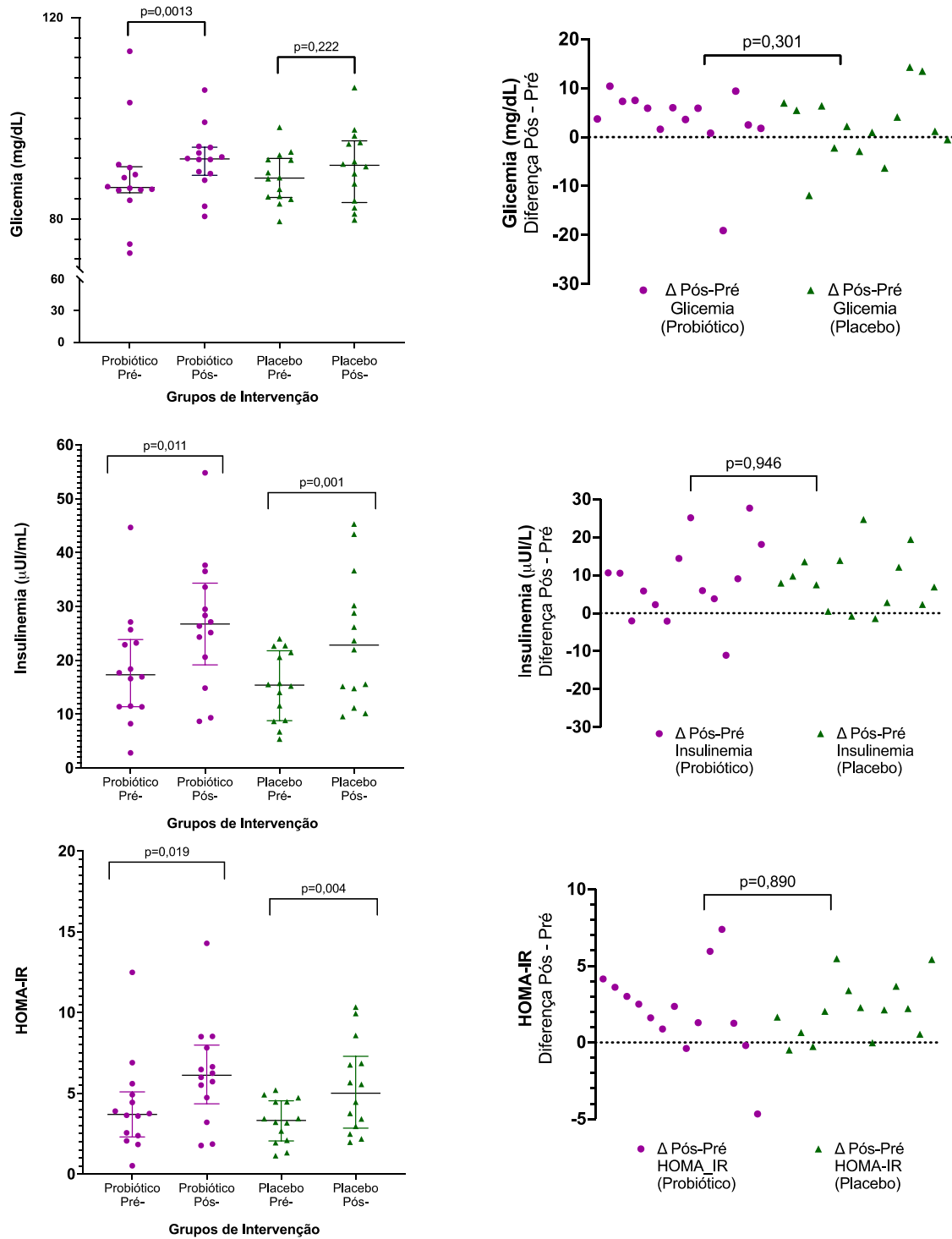
**Tabela 7** - Comparação das diferenças dos valores absolutos e percentuais de Glicemia, insulina e Homa-IR entre os grupos Probiótico (N=14) e Placebo (N=14), antes e após a intervenção. ADAB, EBMSP, outubro de 2019 a fevereiro de 2020.

Parâmetros	Probiótico	Placebo	P*
	Média (DP)	Média (DP)	
Glicemia (mg/dl)			
Valor absoluto	3,38 (7,10)	-4,85 (23,87)	0,089
% do <i>baseline</i>	4,44 (7,13)	2,68 (8,02)	0,301
Insulina (µUI/L)			
Valor absoluto	8,45 (10,60)	14,23 (23,67)	0,783
% do <i>baseline</i>	72,61 (86,28)	59,65 (52,43)	0,890
Homa-IR			
Valor absoluto	2,05 (2,92)	2,78 (3,69)	0,890
% do <i>baseline</i>	82,53 (91,85)	65,14 (58,55)	0,818

\* teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Após 16 semanas de intervenção, os valores finais da glicemia ( $p=0,043$ ), insulina ( $p<0,001$ ) e HOMA-IR ( $p<0,001$ ) avaliados aumentaram entre os adolescentes estudados de maneira global. Especificamente, os valores medianos ( $p25 - p75$ ) de Homa-IR inicial e final, entre os adolescentes que receberam intervenção, foram 3,7 (2,3-5,1) *versus* 6,1 (4,3-7,9), um aumento significativo ( $p=0,021$ ). De modo similar, o grupo Placebo apresentou valores de Homa-IR inicial e final, respectivamente, de 3,3 (2,1-4,5) e 5,0 (2,8-8,9) ( $p=0,015$ ).

**Gráfico 5** - Valores de glicemia (mg/dL), insulinemia ( $\mu$ UI/L) e HOMA-IR antes e após a intervenção e valores das diferenças absolutas entre a semana 16 e o baseline dos níveis de glicemia (mg/dL), insulinemia ( $\mu$ UI/L) e HOMA-IR, entre os 28 adolescentes estudados, estratificados por grupo de estudo. ADAB, EBMSp, outubro de 2019 a fevereiro de 2020



### 5.2.6 Efeito do uso do probiótico nos níveis séricos de colesterol e triglicerídeos

Observou-se uma tendência de redução mais acentuada dos níveis de colesterol total no grupo Probiótico, tanto para os valores absolutos ( $p=0,085$ ) quanto para a variação percentual ( $p=0,081$ ), conforme mostrado na Tabela 8 e no Gráfico 6.

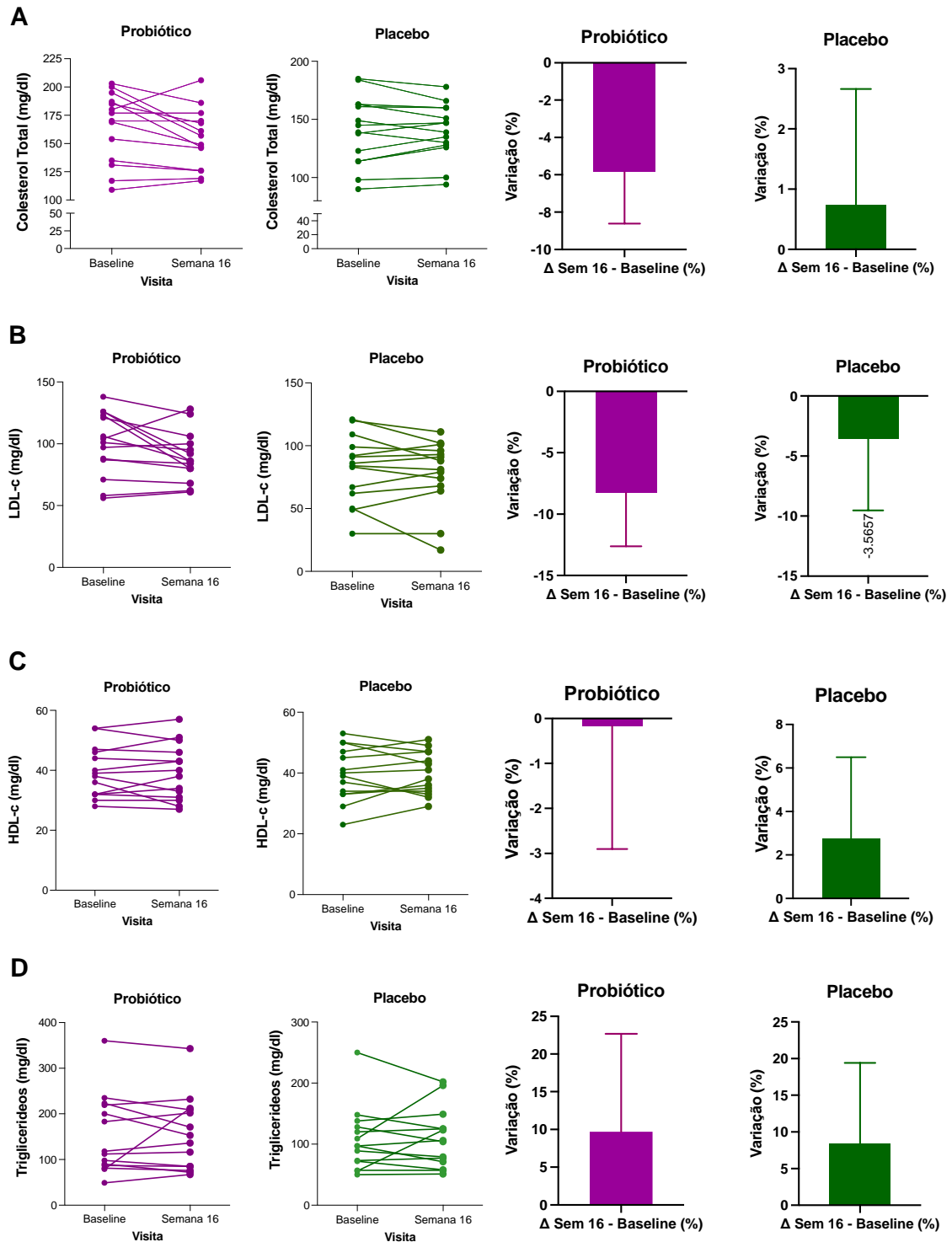
**Tabela 8** - Comparação das diferenças dos valores absolutos e percentuais de colesterol total e frações entre os grupos Probiótico (N=14) e Placebo (N=14), antes e após a intervenção. ADAB, EBMS, outubro de 2019 a fevereiro de 2020

Parâmetros	Probiótico	Placebo	P*
	Média (DP)	Média (DP)	
Colesterol Total (mg/dl)			
Valor absoluto	-11,21 (19,01)	-0,36 (9,98)	0,085
% do <i>baseline</i>	-5,85 (10,32)	0,74 (7,19)	0,081
LDL-C (mg/dl)			
Valor absoluto	-10,71 (18,73)	-3,43 (13,65)	0,223
% do <i>baseline</i>	-8,27 (16,24)	-3,56 (22,31)	0,270
HDL-C (mg/dl)			
Valor absoluto	-0,07 (3,85)	0,36 (4,78)	0,695
% do <i>baseline</i>	-0,17 (10,21)	2,77 (13,97)	0,696
Triglicerídeos (mg/dl)			
Valor absoluto	1,79 (44,06)	2,79 (35,71)	>0,999
% do <i>baseline</i>	9,71 (48,53)	8,38 (41,22)	0,927

\* teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Após 16 semanas de intervenção, os valores finais medianos (p25-p75) do colesterol total foram significativamente menores entre os adolescentes que receberam a intervenção (173,5 [134,0 – 189,0] vs. 153,0 [126,0 – 171,7] mg/dl;  $p=0,047$ ). Para o LDL-colesterol, neste mesmo grupo, a redução observada foi acentuada, porém limítrofe (102,5 [83,0 – 123,7] vs. 86,0 [77,0 – 101,5];  $p=0,055$ ). Esses achados não foram observados para o HDL-colesterol ( $p=0,975$ ) e os triglicerídeos ( $p=0,706$ ), conforme mostrado no gráfico 10. No grupo placebo não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nos valores de Colesterol total ( $p>0,999$ ), LDL ( $p=0,340$ ), HDL ( $p=0,909$ ) e triglicerídeos (0,802) antes e após intervenção.

**Gráfico 6 - A, B, C e D –** Evolução dos valores de Colesterol Total (mg/dl), LDL-c (mg/dl), HDL-c (mg/dl) e triglicerídeos (mg/dl) e diferença média percentual entre o baseline e semana 16, estratificado de acordo com o tipo de grupo de estudo (Probiótico e Placebo). ADAB, EBMSP, outubro de 2019 a fevereiro de 2020.



As linhas dos gráficos de variação relativa indicam o erro-padrão da média.



### 5.2.7 Efeito do uso do probiótico nos valores de ferritina, PCR e vitamina D

Os valores médios (DP) das diferenças absolutas e percentuais dos valores de ferritina, PCR e vitamina D, entre a semana 16 e o *baseline* para grupo, estão descritos na Tabela 9. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos do estudo.

**Tabela 9** - Comparação das diferenças dos valores absolutos e percentuais de ferritina, vitamina D e PCR-US entre os grupos Probiótico (N=14) e Placebo (N=14), antes e após a intervenção. ADAB, EBMSp, outubro de 2019 a fevereiro de 2020

Parâmetros	Probiótico	Placebo	P*
	Média (DP)	Média (DP)	
Ferritina (mg/dl)			
Valor absoluto	0,71 (26,68)	-5,41 (30,33)	0,698
% do <i>baseline</i>	4,07 (7,50)	-4,97 (35,76)	0,7131
Vitamina D ( $\mu$ UI/L)			
Valor absoluto	1,55 (7,80)	3,03 (6,80)	0,982
% do <i>baseline</i>	11,06 (39,05)	20,12 (46,07)	0,854
PCR-US			
Valor absoluto	-0,004 (0,16)	-0,300 (0,56)	0,098
% do <i>baseline</i>	-3,33 (37,31)	-27,33 (49,55)	0,154

\* teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Observou-se, mesmo sem significância estatística, uma redução média dos valores da PCR-US mais relevante entre os adolescentes que estavam no grupo Placebo.

### 5.2.8 Efeito do uso do probiótico nos parâmetros antropométricos e de bioimpedância.

A Tabela 10 descreve os valores medianos (p25 – p75) do peso, IMC, escore z do indicador IMC/idade, circunferência da cintura (CC) e o percentual de gordura corporal (PGC), obtido pela bioimpedância, no *baseline* e na semana 16.

Embora não significativa, observou-se aumento mediano do peso no grupo Probiótico, mas com redução dos escores z do indicador IMC/idade. No grupo Placebo, a mediana do peso no final do estudo foi menor, comparado com o *baseline*, bem como redução do indicador IMC/idade, mas ambos não significantes.

**Tabela 10** - Valores medianos (p25 – p75) do peso, IMC, escore z do indicador IMC/idade, Circunferência da cintura, percentual de gordura corporal e relação cintura/quadril, no baseline (pré-) e na semana 16 (pós-intervenção). ADAB, EBMSp, outubro de 2019 a fevereiro de 2020

Parâmetros	Grupo Probiótico			Grupo Placebo		
	<i>baseline</i>	semana 16	P*	<i>baseline</i>	semana 16	P*
	Mediana (p25 – p75)			Mediana (p25 – p75)		
<b>Peso (Kg)</b>	100,2 (81,6-118,7)	101,5 (82,4-122,4)	0,132	102,7 (76,9-110,3)	99,7 (81,5-113,5)	0,158
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	34,7 (31,0-40,6)	34,0 (29,3-40,9)	0,802	34,8 (29,3-37,3)	35,3 (29,8-37,5)	0,414
<b>IMC/idade (escore Z)</b>	3,23 (2,81-3,66)	3,05 (2,68-3,87)	0,900	3,11 (2,46-3,36)	3,03 (2,44-3,29)	0,730
<b>Circunferência da cintura (cm)</b>	105,0 (97,5-114,0)	106,0 (96,0-115,0)	0,875	101,5 (94,5-110,0)	104,5 (94,0-112,0)	0,345
<b>Gordura corporal (%)</b>	46,1 (41,3-51,8)	46,5 (42,8-51,3)	0,807	45,2 (38,8-49,7)	43,8 (40-50,3)	0,769
<b>Relação cintura/quadril</b>	0,93 (0,89-0,97)	0,96 (0,90-0,98)	0,673	0,92 (0,88-0,95)	0,93 (0,91-0,97)	0,632

\* teste não paramétrico de Wilcoxon (dados pareados).

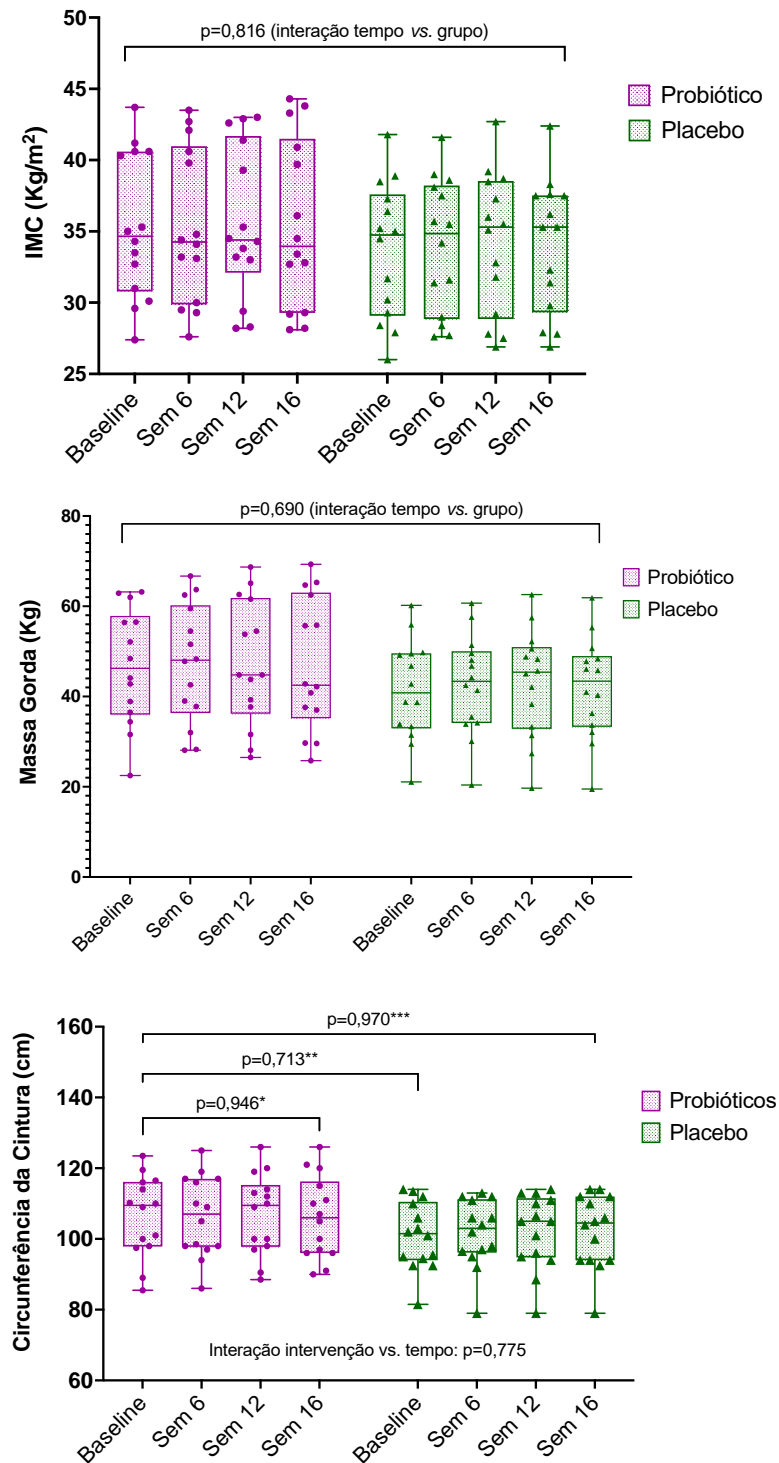
Em termos de diferença absoluta e percentual, entre a semana 16 e a linha de base, as médias (DP) de peso (kg) observadas foram de ganho similar entre os dois grupos (tabela 11). De modo similar, não foram observadas diferenças entre os grupos Probiótico e Placebo, na variação do IMC, escore z do indicador IMC/idade, Circunferência da Cintura (CC) e Relação Cintura/Quadril (RCQ), conforme detalhado na Tabela 11.

**Tabela 11** - Comparação das diferenças absolutas e percentuais, entre o baseline e após a intervenção, dos valores de peso, IMC, escore z do indicador IMC/idade, CC, RCQ e percentual de gordura corporal entre os grupos Probiótico (N=14) e Placebo (N=14), antes e após a intervenção. ADAB, EBMSP, outubro de 2019 a fevereiro de 2020.

Parâmetros	Probiótico	Placebo	P*
	Média (DP)	Média (DP)	
Peso (Kg)			
Valor absoluto	1,93 (3,96)	1,41 (4,43)	0,872
% do <i>baseline</i>	1,78 (3,75)	1,64 (5,03)	0,854
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )			
Valor absoluto	0,07 (1,38)	0,36 (1,18)	0,448
% do <i>baseline</i>	0,70 (13,22)	0,38 (12,80)	0,435
Escore z IMC/idade			
Valor absoluto	0,02 (0,38)	0,003 (0,35)	0,909
% do <i>baseline</i>	7,58 (35,28)	0,76 (4,65)	0,927
CC (cm)			
Valor absoluto	2,66 (13,74)	1,25 (3,90)	0,448
% do <i>baseline</i>	3,63 (15,98)	1,27 (3,83)	0,505
RCQ			
Valor absoluto	0,01 (0,03)	0,16 (0,34)	0,312
% do <i>baseline</i>	1,99 (22,49)	22,21 (44,17)	0,291
Gordura Corporal (%)			
Valor absoluto	-0,61 (3,86)	0,09 (1,69)	0,421
% do <i>baseline</i>	-1,20 (10,13)	0,31 (4,18)	0,435

\* teste não paramétrico de Mann-Whitney

A variação do IMC entre as quatro visitas realizadas está mostrada no gráfico 7A. Não foi observado aumento e/ou redução significativa entre os quatro períodos de avaliação ( $p=0,816$ ), indicando estabilidade nestes parâmetros entre os grupos de intervenção e as visitas realizadas. Achado similar foi observado para a variação da massa gorda, em Kg (gráfico 7B), e para os valores de circunferência abdominal, em centímetros (Gráfico 7C).



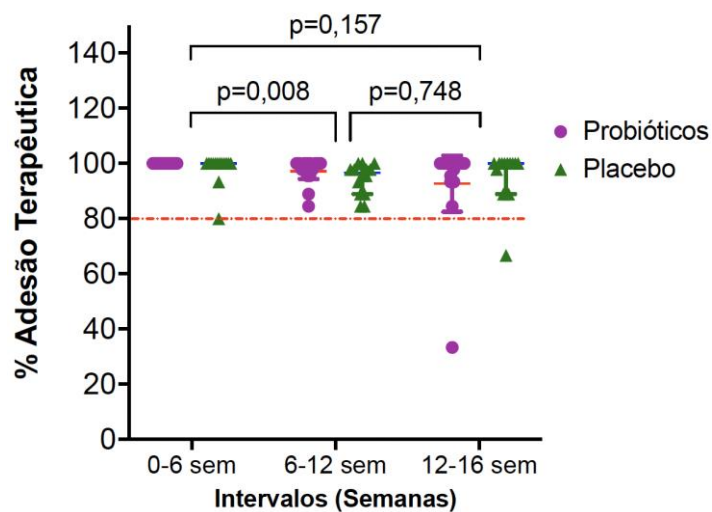
\*comparação entre a semana 16 e o *baseline*; \*\* comparação entre o *baseline* dos grupos Probiótico e Placebo; \*\*\* comparação entre os grupos Probiótico e Placebo. As barras representam a amplitude dos valores. Cada ponto representa o dado de um participante.

**Gráfico 7** - Valores de IMC (kg/m<sup>2</sup>) (11A), massa gorda (Kg) (11B) e circunferência da cintura (cm) (11C) no *baseline*, semanas 6, 12 e 16, para os grupos Probiótico (N=14) e Placebo (N=14). ADAB, EBMSp, outubro de 2019 a fevereiro de 2020

### 5.3 Adesão à intervenção

Em relação à adesão terapêutica (Gráfico 12), mensurada em percentual de referência ao uso de sachês, e considerando o total de adolescentes estudados, foi observado uma redução significativa ( $p=0,008$ ) entre o período inicial (0 a 6 semanas) e o segundo intervalo de intervenção (6 a 12 semanas), conforme descrito no Gráfico 12. Essa diferença não foi observada entre o intervalo compreendido entre as semanas 6 a 12 e as semanas 12 a 16 ( $p=0,748$ ) e na comparação entre o primeiro (0-6 semanas) e último período de intervenção (12-16 semanas) ( $p=0,157$ ). Exceto no período 12-16 semanas, todos os adolescentes alocados no estudo tiveram adesão superior a 80% (Gráfico 8).

**Gráfico 8** - Descrição do percentual individual e médio, com o respectivo IC95%, da adesão terapêutica, nos intervalos de visitas, 0-6 semanas, 6-12 semanas e 12-16 semanas, entre os 28 adolescentes estudados, estratificado por grupo de estudo. ADAB, EBMS, outubro de 2019 a fevereiro de 2020



A adesão média (DP) do grupo Probiótico, para os intervalos entre 0-6 semanas, 6-12 semanas e 12-16 semanas, foi, respectivamente, 100,0%; 97,1(4,8)% e 92,7(17,7)%. Para o grupo Placebo, os valores observados foram 98,1(5,5)%; 94,4(5,6)% e 95,1(9,4)%. Também não houve diferença na adesão entre os grupos considerando os três intervalos de tempo em conjunto ( $p=0,737$ ). Detalhadamente, não foi observado diferenças significantes, entre os

grupos Probiótico e Placebo, nas semanas 0-6 ( $p=0,150$ ), semanas 6-12 ( $p=0,086$ ) e semanas 12-16 ( $p=0,814$ ).

#### 5.4 Avaliação da segurança do uso de dos probióticos *Lactobacillus Acidophilus LA-5®* e *Bifidobacterium LactisBB-12®* em adolescentes obesos com DHGNA

Os efeitos adversos relatados pelos pacientes estão descritos na tabela 12. Nessa mesma tabela descreve-se o uso de antibióticos e cirurgias recentes em cada consulta. Não houve a necessidade de retirada de nenhum paciente do protocolo devido aos eventos adversos relatados.

**Tabela 12** - Frequência absoluta (percentual) de eventos adversos selecionados de acordo com intervalos de visitas (0-6 semanas, 6-12 semanas e 12-16 semanas), entre os 28 adolescentes estudados, estratificado por grupo de estudo. ADAB, EBMSp, outubro de 2019 a fevereiro de 2020

Evento	Probiótico			Placebo		
	Semanas			Semanas		
	0-6	6-12	12-16	0-6	6-12	12-16
<b>Diarreia</b>	4/14	1/14	0/14	1/14	0/14	1/14
<b>Constipação</b>	0/14	1/14	0/14	0/14	1/14	1/14
<b>Náuseas</b>	2/14	2/14	1/14	0/14	0/14	0/14
<b>Vômitos</b>	0/14	0/14	0/14	1/14	1/14	0/14
<b>Cefaleia</b>	3/14	1/14	1/14	1/14	1/14	0/14
<b>Uso de antibióticos</b>	1/14	0/14	0/14	1/14	1/14	1/14
<b>Internamentos</b>	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14
<b>Cirurgias</b>	0/14	0/14	0/14	1/14	0/14	0/14

Eventos adversos relacionados ao sistema digestivo foram os mais relatados, especialmente alterações no ritmo intestinal (Tabela 12). Relato de diarreia ocorreram mais comumente nas primeiras seis semanas de intervenção, respectivamente em 28,6% (4/14) e 7,14% (1/14), dos adolescentes no grupo Probiótico e Placebo ( $p=0,326$ ). O uso de antibiótico foi relatado por um adolescente do grupo Probiótico, que utilizou amoxicilina por 5 dias após cirurgia para extração de 3º molar. Não foram relatados internamentos.

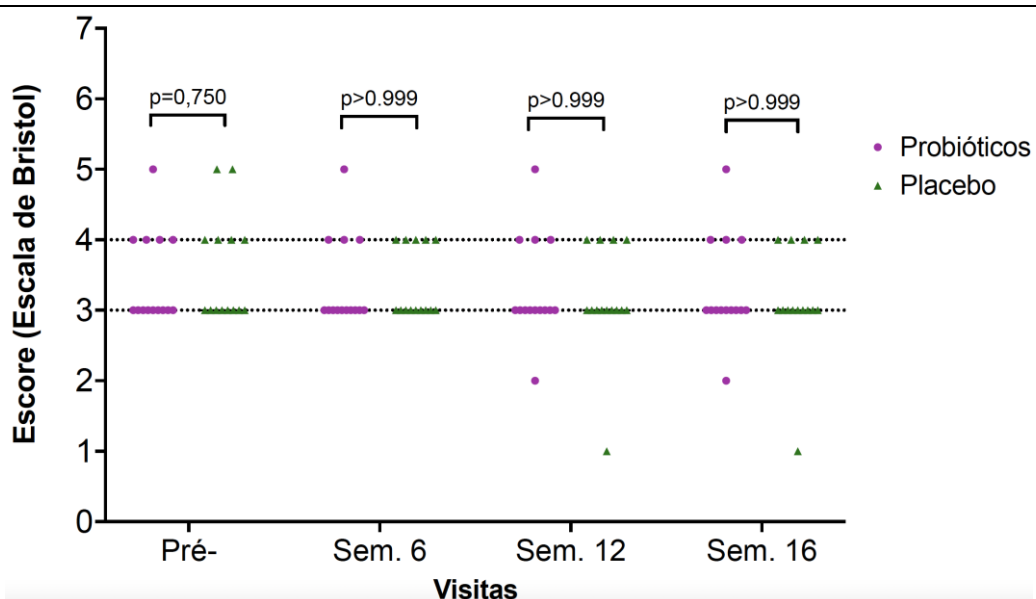
Após 16 semanas, seis adolescentes apresentaram mudanças na consistência das fezes, segundo a Escala Bristol. Destes, cinco mudaram o padrão das fezes em um nível. Um deles mudou do padrão de fezes de Bristol 04, para o padrão classificado como Bristol 01 (Tabela 13).

**Tabela 13** - Descrição dos pacientes que modificaram o padrão de consistência das fezes, segundo grupo de intervenção. ADAB, EBMSp, outubro de 2019 a fevereiro de 2020

Participante	Antes	Depois	Grupo
Número 4	3	2	Probiótico
Número 27	4	3	Probiótico
Número 12	5	4	Placebo
Número 14	4	3	Placebo
Número 21	4	1	Placebo
Número 26	5	4	Placebo

Em média (DP), o grupo que usou o probiótico apresentou redução de 0,14 (0,36) no escore da Escala Bristol, comparado à redução de 0,43 (0,35) no grupo placebo, sem significância estatística para a interação entre a intervenção e o tempo ( $p=0,334$ ) e similar entre os dois grupos do estudo, para todas as quatro visitas realizadas (Gráfico 9).

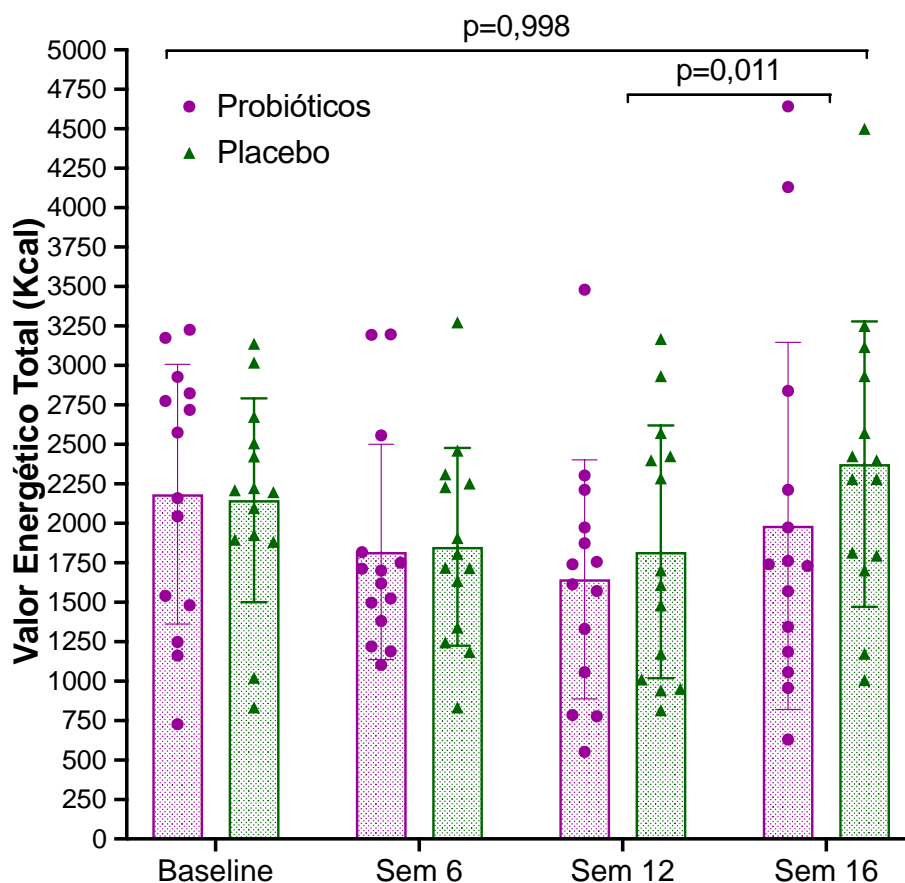
**Gráfico 9** - Comparação dos valores individuais dos escores obtidos na Escala Bristol para cada visita realizada, entre os 28 adolescentes estudados, estratificados por grupo de intervenção. ADAB, EBMSp, outubro de 2019 a fevereiro de 2020.



### 5.5 Avaliação dos aspectos do consumo alimentar e atividade física relacionados ao uso dos probióticos *Lactobacillus Acidophilus* LA-5® e *Bifidobacterium Lactis* BB-12® em adolescentes obesos com DHGNA.

Entre as variáveis potencialmente confundidoras, a variabilidade da ingestão do valor total de energia (VET) entre as semanas de avaliação se mostraram estáveis entre o momento de início e de término da intervenção ( $p=0,998$ ), conforme demonstrado no Gráfico 10. Observou-se um aumento significativo do consumo médio de energia entre a semana 12 e a semana 16 ( $p=0,011$ ) e este achado não teve influência do grupo de alocação do estudo ( $p=0,572$ ).

**Gráfico 10** - Descrição da média com o respectivo IC95% do VET consumido referido no momento pré-intervenção, semanas 6, 12 e 16 (semana final) entre os 28 adolescentes estudados, estratificado por grupo de estudo. ADAB, EBMSp, outubro de 2019 a fevereiro de 2020

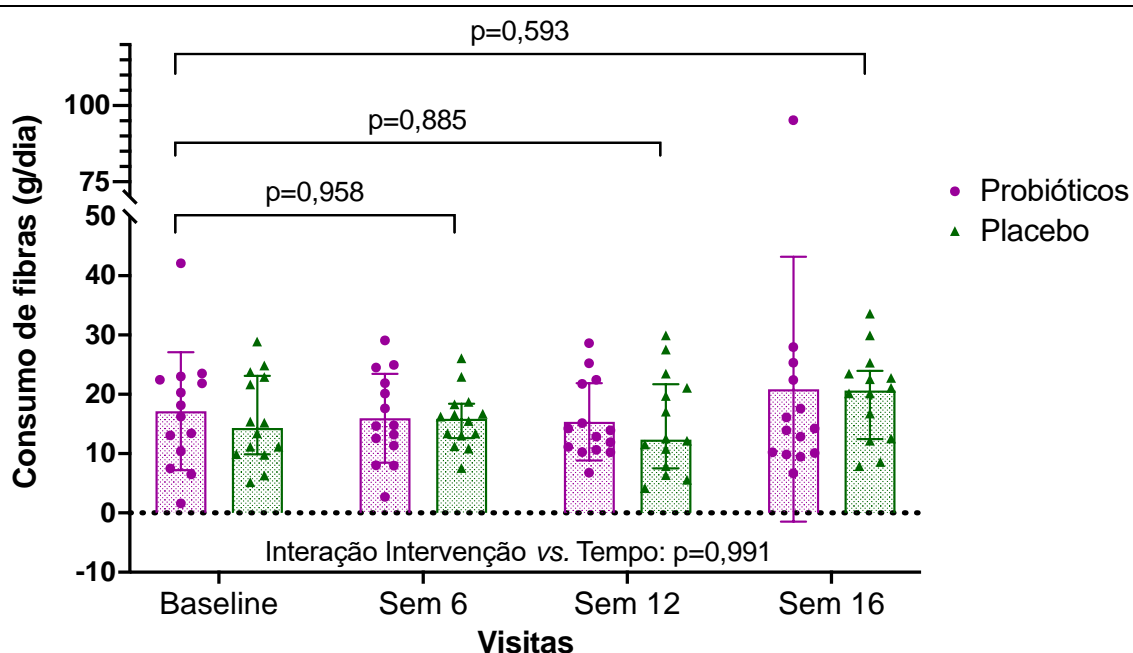


As barras representam os valores médios do VET e as linhas o desvio-padrão. Cada ponto no gráfico corresponde ao dado de um adolescente.



Para o consumo de fibras, observou-se uma estabilidade durante o estudo, sem diferenças significantes entre o padrão referido para a semana pré-intervenção e as semanas seguintes de aferição: semana 6 ( $p=0,958$ ), semana 12 ( $p=0,885$ ) e semana 16 ( $p=0,593$ ). Também não foi observada influência do grupo de intervenção no decorrer do tempo de intervenção ( $p=0,991$ ), conforme mostrado no Gráfico 11. As médias de consumo de fibras alimentares (g/dia) oscilaram entre 15,2g/dia e 20,3g/dia, consideradas dentro do adequado para as faixas etárias.

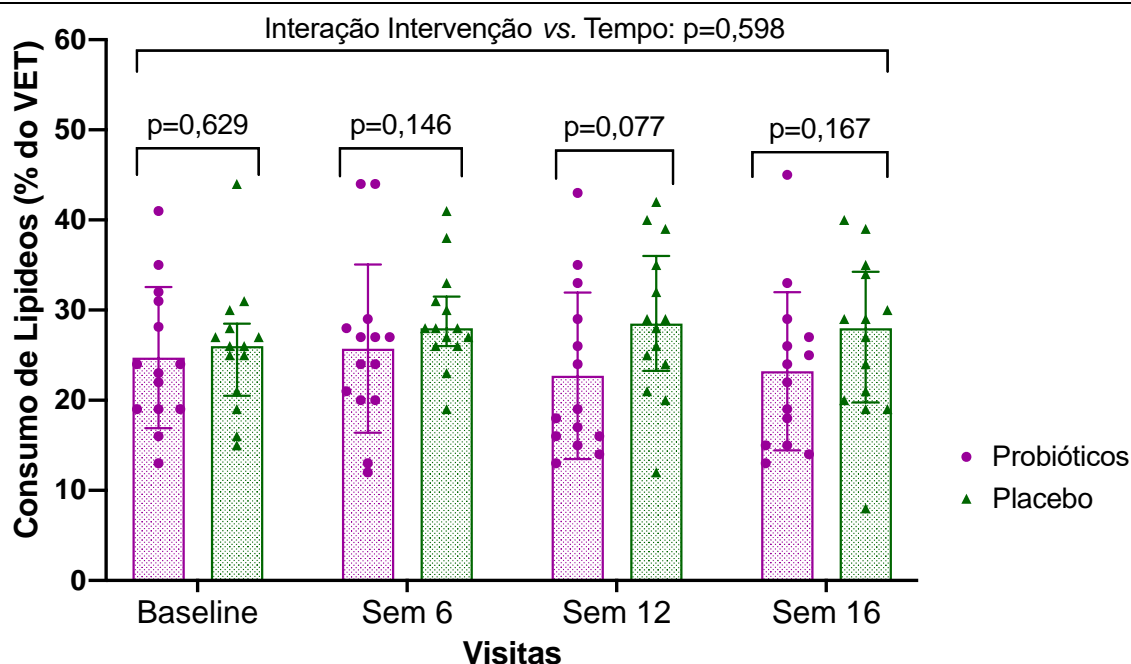
**Gráfico 11** - Descrição do consumo individual e médio (DP) do consumo de fibras alimentares (g/dia), nas semanas pré-intervenção (baseline), 6, 12 e 16, entre os 28 adolescentes estudados, estratificado por grupo de estudo. ADAB, EBMSp, outubro de 2019 a fevereiro de 2020



As barras representam os valores médios do VET e as linhas o desvio-padrão. Cada ponto no gráfico corresponde ao dado de um adolescente.

Em média, o consumo percentual de gordura nos quatro recordatórios alimentares de 24h aferidos foi similar entre os grupos Probiótico e Placebo (24,10 [5,82] vs. 27,52 [5,64]%;  $p=0,148$ ). Adicionalmente, observou-se uma variação estável e não significativa do consumo percentual de lipídeos entre as quatro visitas ( $p=0,598$ ), conforme demonstra o Gráfico 12.

**Gráfico 12** - Descrição do consumo individual e médio (DP) do percentual de gordura na dieta (%), nas semanas pré-intervenção (baseline), 6, 12 e 16, entre os 28 adolescentes estudados, estratificado por grupo de estudo. ADAB, EBMS, outubro de 2019 a fevereiro de 2020



As barras representam os valores médios do percentual de lipídeos no VET e as linhas o desvio-padrão. Cada ponto no gráfico corresponde ao dado de um adolescente.

Como pode se observar no Gráfico 16, na semana 12, observou-se uma tendência, em média de menor consumo percentual de lipídeos entre os adolescentes do Grupo Probiótico ( $p=0,077$ ).

O percentual de sedentarismo no grupo Probiótico na *baseline*, semana 2, 12 e 16 foi, respectivamente, de 35,7% (5/14); 42,9% (6/14); 21,4% (3/14) e 21,4% (3/14). Para os adolescentes alocados no grupo Placebo, esses valores foram, respectivamente, de 50,0% (7/14); 42,9% (6/14); 28,6% (4/14) e 21,4% (3/14). Não houve diferença na proporção de adolescentes inativos entre os grupos do estudo no decorrer do tempo de observação ( $p_{\text{tendência}}=0,972$ ). Para o grupo que recebeu a intervenção, a proporção de sedentarismo diminuiu entre o *baseline* e a semana 16, mas sem significância ( $p_{\text{tendência}}=0,516$ ). De maneira similar, o grupo placebo apresentou as mesmas características ( $p_{\text{tendência}}=0,375$ ).

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Triagem pré intervenção: Comparação entre grupos com e sem DHGNA (Etapa1)

A DHGNA é uma patologia prevalente em crianças e adolescentes obesos, segundo dados de literatura, e espera-se que esteja presente em frequências que oscilam entre 12 a 80% deles (12,14,19). Nesse estudo, entendendo a gravidade da obesidade na infância e as possíveis falhas diagnosticadas, em casos iniciais de DHGNA triados por ultrassonografia de abdome, optou-se por realizar *Screening* laboratorial, avaliação clínica e nutricional de todos os pacientes obesos que participaram da seleção inicial do estudo com objetivo de acompanhá-los ambulatoriamente e traçar um perfil metabólico detalhado para seguimento e intervenções precoces diante das alterações encontradas.

Comparando as características demográficas, antropométricas e clínicas entre ambos os grupos, encontrou-se uma diferença de idade entre os grupos com e sem DHGNA, dado que os pacientes com diagnóstico ultrassonográfico de DHGNA apresentavam mediana de idade maior que os que não possuíam o diagnóstico, assim como para IMC/idade e circunferência da cintura. Esses adolescentes com DHGNA também apresentaram maior frequência de hipertensão e síndrome metabólica. Esses achados são compatíveis com os encontrados em literatura que descrevem ser a DHGNA mais prevalente em obesos adolescentes de que em crianças; sendo ainda mais prevalente no sexo masculino e está associada à gravidade da obesidade (12, 17, 18).

A relação entre RI e DHGNA é indiscutível, adolescentes com maior gravidade da obesidade e portadores de síndrome metabólica são mais susceptíveis a desenvolver a DHGNA. Considerada como a repercussão hepática da síndrome metabólica, a prevalência da DHGNA aumenta em consonância com o aumento da prevalência da obesidade e é proporcional à gravidade da síndrome metabólica(58).

Durante a fase de triagem, foram examinadas a expressão de 25 parâmetros no sangue periférico com objetivo de comparar os perfis bioquímicos e inflamatórios dos adolescentes com ou sem DHGNA. Os pacientes com DHGNA exibiram uma tendência de diminuição dos níveis de HO-1 e fosfatase alcalina e aumento dos níveis de triglicerídeos, AST, ALT, GGT e TGF- $\beta$ . Entre todos os marcadores estudados, apenas os valores medianos de ALT, GGT e TGF- $\beta$  foram

estatisticamente distintos entre os grupos de estudo, com valores mais elevados sendo detectados no grupo de participantes com DHGNA (todos com p-valor ajustado <0,05).

Para diagnóstico da DHGNA o teste de triagem atualmente recomendado, ALT, é um exame universalmente disponível, barato e tem uma sensibilidade aceitável (18, 56). Os pontos de corte para definir alterações na faixa etária pediátrica ainda são bastante discutidos na literatura. Em uma coorte americana nacionalmente validada, foram definidos pontos de corte de 22mg/dL para meninas e 26mg/dL para meninos (147). Já em um estudo canadense, o limite superior de normalidade para ALT foi definido como até 30mg/dL em crianças de 1-12 anos e 24mg/dL para adolescentes de 13-19 anos (148). Outros autores descrevem valores de ALT para diagnóstico de DHGNA como acima de 2x o limite de normalidade, descritos como 50mg/dL para meninos e 44mg/dL para meninas com sobrepeso ou obesidade maiores de 10 anos de idade; dados esses com sensibilidade de 88% e especificidade de 26% (149).

Apesar da recomendação da NASPGHAN, realizada em 2017, sobre o uso da ALT como marcador para triagem de DHGNA, em crianças obesas, definido como anormalidade os valores persistentemente elevados mais que 2x o valor de referência (52 mg/dL para meninos e 44mg/dl para meninas), não existe consenso acerca do melhor ponto de corte a ser utilizado, e diversos especialistas tem utilizado valores diferentes(18). Em 2010, Schwimmer *et al.* propuseram usar um valor de corte mais baixo, respectivamente de 25 U/L e 22 U/L, para meninos e meninas(95). Importante ressaltar que valores baixos de ALT não excluem a presença de DHGNA e outros marcadores, como GGT, Homa-IR, insulina, glicemia, GGT e razão AST/ALT ainda não aparecem em estudos que recomendem a sua utilização, de forma isolada como triagem diagnóstica para a doença(56, 149).

O NASH é uma progressão da esteatose hepática, e é descrito como mais prevalente em crianças com ALT > 80 U / L em comparação com aquelas com ALT <80 U / L (41% em comparação a 21%, respectivamente)(91). Embora o aspartato aminotransferase (AST) e gama-glutamil transferase (GGT) não foram testados independentemente como marcadores de triagem para DHGNA em crianças, entretanto, a descrição de literatura é que no contexto de elevação da ALT, níveis elevados de AST e GGT associam-se aos piores achados histológicos(149).

Em nosso estudo, houve uma tendência de diminuição da HO-1 em pacientes com DHGNA mas sem diferenças estatisticamente significantes. A HO-1 tem sido descrita como uma enzima que atua no mecanismo de citoproteção hepática, agindo no estresse oxidativo e na peroxidação lipídica, fatores que desempenham um papel importante na patogênese da DHGNA (78,79). Poucos estudos a descrevem como marcador de DHGNA e não encontramos estudos na faixa etária pediátrica.

Na análise de dados com uso de correlações observou-se que o perfil geral das mesmas era distinto entre os grupos de estudo, empregando uma abordagem com análise de rede (em que as correlações de Spearman são visualizadas como conexões entre os parâmetros), na qual procurou-se então visualizar as inúmeras correlações detectadas(146,150-152). Com essa abordagem identificou-se a dinamicidade, força e qualidade das relações entre os valores dos marcadores bioquímicos e proteínas inflamatórias plasmáticas dos diferentes grupos de indivíduos. As redes dos grupos clínicos distintos exibiram diferenças na complexidade e na qualidade das interações estatísticas entre os marcadores bioquímicos.

Através da análise de correlação canônica esparsa (ACC) descobriu-se que os pacientes com DHGNA podem ser distinguidos daqueles sem a doença com alto grau de precisão (área sob a curva (AUC) (ROC) = 0,97 (IC: 0,85-1,0) , sensibilidade 91% (IC: 77,0–96,7), especificidade 86% (72,0–94,0);  $p < 0,0001$ . A avaliação dos valores dos coeficientes canônicos do modelo CCA revelou que os marcadores mais significativos responsáveis pela discriminação entre indivíduos com ou sem DHGNA foram LDL-c, triglicerídeos, TGF- $\beta$ , ALT, HDL-c e hematócrito.

Esses achados reforçam os dados apresentados no presente estudo, no qual observou-se que os adolescentes com esteatose hepática exibem um perfil bioquímico distinto no sangue periférico. As análises revelam que essas mudanças no perfil de expressão desses parâmetros bioquímicos eram capazes de distinguir pacientes com esteatose daqueles sem esta condição. Além disso, até onde sabemos, este estudo representa a primeira tentativa de estabelecer uma associação entre níveis elevados de TGF- $\beta$  e esteatose hepática em adolescentes obesos. Além disso, os resultados indicam um importante desequilíbrio bioquímico em pacientes com esteatose, o que pode nortear novos estudos de novas ferramentas diagnósticas e alvos terapêuticos a fim de otimizar o manejo clínico.

A inflamação é um processo coordenado que ocorre com mudanças sincronizadas na produção de vários marcadores imunológicos e não imunológicos (6,40). Embora estudos tenham mostrado que a ativação da resposta inflamatória em hepatócitos é o principal estímulo para progressão para a NASH, existe também a potencial influência de outros marcadores bioquímicos impactarem nos desfechos clínicos (13,56,63). Na DHGNA, a ativação das vias inflamatórias é observada no estágio inicial da doença com liberação de marcadores conhecidos devido à sua associação com lesão no tecido hepático (84,85). Como esperado, os nossos resultados revelaram aumentos substanciais nos níveis de ALT, GGT e TGF- $\beta$  em pacientes com esteatose em comparação com aqueles sem esteatose, e todos esses marcadores são associados à progressão para NASH(56,80).

As mudanças consistentes na expressão dos parâmetros bioquímicos observadas no grupo de esteatose são capazes de distinguir os diferentes grupos clínicos comparados no presente estudo, detectados por uma análise discriminante baseada em correlações canônicas. Digno de nota, a análise de coeficiente canônico identificou biomarcadores candidatos provavelmente responsáveis pela distinção entre grupos sem esteatose e esteatose, como TGF- $\beta$ , ALT, hemoglobina e hematócrito.

As análises também revelaram que o TGF- $\beta$  não foi o marcador com maior número de correlações nas distintas matrizes. No entanto, tal marcador estava relacionado com diferentes parâmetros nas redes e com perfis de correlação distintos (correlações positivas vs. negativas) o que explica em parte porque o TGF- $\beta$  foi relevante para explicar as diferenças entre os grupos de estudo descritos.

É importante ressaltar que em descrição prévia em literatura, com pacientes adultos apresentando esteatose hepática causada por obesidade ou álcool, o TGF- $\beta$  foi fortemente associado a esse desfecho clínico (153). Nossos resultados sugerem que o perfil bioquímico alterado detectado em pacientes com esteatose foi tão substancialmente diferente que pôde distinguir com segurança os diferentes grupos de estudo. É possível que os principais marcadores descritos acima, principalmente TGF- $\beta$ , desempenhem um papel significativo na patogênese da lesão hepática induzida durante a evolução da DHGNA para NASH. O TGF- $\beta$  é secretado em resposta ao dano celular e desempenha papel dominante na mediação da fibrose,

mediante sua contribuição para a ativação das células estreladas e sua produção de proteínas da matriz extracelular. Conforme detalhado, o TGF- $\beta$  atua por meio do receptor de quinase 5, semelhante ao receptor de ativina (ALK5) (TGF- $\beta$  RI) e do receptor de TGF- $\beta$  tipo II (TGF- $\beta$  RII) (82). O nível sérico de TGF- $\beta$  e o nível tecidual de mRNA do receptor de TGF- $\beta$  podem ser medidos e usados como marcadores diagnósticos e prognósticos para doenças hepáticas (81,154). Este fator de crescimento tem muitas ações no fígado, incluindo: (i) fibrogênese (ii) inibição do crescimento (de hepatócitos normais e células estreladas) (iii) mitogênese (iv) pró-apoptose e (v) quimioatração. Descrito como um marcador bioquímico de progressão para NASH, não há descrição de estudos envolvendo o marcador na faixa etária pediátrica(154, 155) Em um estudo conduzido por Khalid M, *et al.*, 2014, foi observado que os níveis séricos de TGF- $\beta$  em pacientes com DHGNA eram mais elevados que no grupo controle, sendo que nos casos de NASH e cirrose, os níveis eram significativamente maiores (  $p < 0,001$ )(80). Tarantino G, *et al.* 2008, rastreou uma Coorte com pacientes portadores de DHGNA e estudou o comportamento dos níveis séricos de TGF- $\beta$  e a progressão para gravidade; encontraram concentrações elevadas desta citocina em pacientes com DHGNA, entretanto, não obtiveram diferenças estatisticamente significantes entre os subgrupos de pacientes com fibrose e NASH ( $p = 0,200$ )(156).

Considerando o papel crucial no desenvolvimento e progressão da fibrose hepática (81), poderíamos hipotetizar que a maioria dos adolescentes obesos aqui estudados apresenta ou irá evoluir para NASH.

Aqui, duas hipóteses devem ser consideradas para explicar o significado do aumento do TGF- $\beta$  e se ele está realmente associado à DHGNA por si só ou de fato é um preditor de fibrose e NASH. A elevação extremamente significativa dos níveis de TGF- $\beta$  entre nossos participantes com esteatose pode representar um espectro de pacientes que já apresentam esteatohepatite e não poderiam ser diagnosticados pela impossibilidade de realização de biópsia hepática. Na verdade, observamos que um terço dos participantes com esteatose hepática ( $n = 12/36$ ) tinha  $ALT \geq 30$  U / L). Além disso, observamos uma correlação significativa entre os níveis de ALT e TGF- $\beta$ . Esta hipótese tem alguma evidência na literatura entre adultos (81). No entanto, não pudemos encontrar dados relatados anteriormente em pacientes pediátricos que pudessem refletir os achados apresentados aqui. Uma investigação mais aprofundada com monitoramento sequencial dos níveis de ALT e outros parâmetros bioquímicos e marcadores de imagem e / ou

uma biópsia hepática poderá ajudar a esclarecer essa possibilidade futuramente. Por outro lado, níveis elevados de TGF- $\beta$  também podem representar pacientes apenas com esteatose hepática sem NASH. Na verdade, 20 de 36 pacientes exibiram níveis de ALT  $\leq$  25 U / L (18). Embora ALT não seja um marcador bioquímico definitivo para NASH, é comumente usado como indicador de dano hepático na medicina clínica e especialmente na DHGNA, como já anteriormente relatado(18). Assim, níveis mais baixos podem ser um indicador de ausência / dano mínimo ao tecido hepático. Além disso, uma evolução / progressão mais rápida e grave da doença é observada em pacientes pediátricos com DHGNA em comparação com adultos, por se tratar de doença de início precoce(60,107,157) e hipotetizamos que os níveis elevados de TGF- $\beta$  poderiam ser um marcador desta condição na população pediátrica, embora não tenhamos conseguido demonstrar formalmente que os níveis deste biomarcador se associem diretamente a progressão da esteatose hepática. O acompanhamento dessas crianças e adolescentes está em andamento para esclarecer essa questão.

Uma importante contribuição desse estudo foi a avaliação da qualidade e magnitude das interações estatísticas entre os parâmetros bioquímicos. As matrizes de correlação de Spearman têm sido utilizadas em várias doenças marcadas por inflamação aguda e crônica (147, 151, 158, 159) e sugerem que mudanças no perfil da rede de correlação indicam alteração do estado de inflamação sistêmica. De fato, nossas análises de correlação revelaram perfis diferentes entre os grupos clínicos com intensas interações sendo detectadas no grupo de esteatose hepática. Curiosamente, esse grupo foi marcado pela presença de duas correlações positivas envolvendo importantes marcadores associados às doenças hepáticas.

Nossa hipótese é que a esteatose hepática é caracterizada por um meio inflamatório hepático que leva a mudanças consistentes nas concentrações sistêmicas de parâmetros bioquímicos. Ao avaliar-se a correlação entre o grau de esteatose hepática e as concentrações / valores dos parâmetros bioquímicos e também do IMC, descobriu-se que ocorreram aumentos lineares no IMC e ALT de acordo com a gravidade da esteatose. Embora os níveis de TGF- $\beta$  tenham apresentado maiores valores de expressão em crianças e adolescentes com esteatose, essas concentrações não foram diferentes entre pacientes com doença leve e moderada / grave. Essa observação reforça a ideia de que o TGF- $\beta$  pode ser mais útil para identificar a presença de esteatose do que para inferir prognóstico / progressão da doença. Além disso, identificamos que as diminuições nos valores de fosfatase alcalina e HDL-c foram proporcionais ao aumento



gradual da gravidade da esteatose. Mais estudos são necessários para delinear os mecanismos moleculares subjacentes a essas associações.

Outra contribuição importante desses resultados é a avaliação do grau de perturbação bioquímica. Após levantamento de literatura, não foi identificado nenhum estudo anterior que tivesse estimado o distúrbio bioquímico global em pacientes com esteatose hepática. Nas análises que realizamos, foi demonstrada que a esteatose hepática está de fato ligada ao maior desequilíbrio bioquímico geral, que se mostrou ainda mais significativo nos indivíduos com obesidade, independente da sua classificação de gravidade. Nosso resultado reforça o papel da obesidade, associada ao consequente grau de resistência à insulina como um fator potencial que leva à inflamação crônica e está implicada no distúrbio homeostático subjacente à esteatose (20, 54, 56, 57,84,85).

Finalmente, usando análise multivariável, foram avaliados os parâmetros bioquímicos mais associados à esteatose hepática. Dentre esses parâmetros, o TGF- $\beta$  foi o mais robusto no modelo preditivo empregado. É importante ressaltar que para minimizar os possíveis efeitos da produção extra-hepática de TGF- $\beta$ , como tecido adiposo (160) e como os níveis dessa citocina foram positivamente correlacionados com os valores de IMC na população em estudo, nosso modelo foi ajustado para o escore Z de IMC / idade e para a circunferência da cintura. Após o ajuste, aumentos de 1 Log dos níveis de TGF- $\beta$  permaneceram independentemente associados a 3,63 vezes para o aumento do risco de desenvolvimento de esteatose. Dentro dos parâmetros bioquímicos usados nesta análise multivariável encontra-se a ALT. A análise de correlação de Spearman revelou uma associação positiva entre as concentrações de ALT e de TGF- $\beta$  em toda a população do estudo, reforçando nossa hipótese de que os níveis mais elevados de TGF- $\beta$  encontrados aqui são consequência de lesão hepática, e não pela produção de outros tecidos. Digno de nota, foi demonstrada a importância do TGF- $\beta$  como um fator crítico na determinação da evolução para a esteatohepatite (80,155,161).

Em conjunto, esses dados sugerem que, em pacientes com esteatose hepática, há uma regulação positiva dos marcadores envolvidos na inflamação persistente, o que pode contribuir para a fisiopatologia da esteatose hepática. Estudos adicionais são necessários para investigar o perfil de ativação imune desses pacientes, a fim de sugerir novos alvos terapêuticos. Nesse sentido, esse achado sobre o uso potencial dos níveis plasmáticos de TGF- $\beta$  como um biomarcador

preciso de esteatose hepática parece promissor. Além disso, esse achado é especialmente importante, visto que os adolescentes estudados aqui eram em sua maioria gravemente obesos e os marcadores bioquímicos tradicionais, como triglicerídeos, HDL-c, insulinemia e HOMA-IR, não foram capazes de identificar adequadamente a presença de esteatose hepática. Normalmente, a avaliação da gravidade da doença é baseada no exame radiológico não invasivo, especificamente na ultrassonografia(100). No entanto, este método está sujeito a erros dependendo do operador. Além de não existirem escores não invasivos para diagnóstico de DHGNA ou de evolução para fibrose com validação externa para vasta utilização na faixa etária pediátrica (56). Nesse contexto, o TGF- $\beta$  poderia surgir como uma ferramenta potencial no diagnóstico da esteatose, talvez associada à ultrassonografia, mas sem um claro impacto relevante na avaliação do grau de esteatose hepática. Estudos futuros são necessários para testar e validar a acurácia do TGF- $\beta$ , isoladamente ou em associação com outros métodos não invasivos, em um número maior de pacientes.

Essa análise inicial apresentou algumas limitações. O tamanho limitado da amostra, a ausência de dosagens de outras citocinas inflamatórias para estabelecer um perfil mais detalhado do distúrbio metabólico e a ausência de um método histológico para o diagnóstico de NASH para comparação com os resultados da avaliação não invasiva realizada. Além disso, nosso desenho de estudo foi transversal. Assim, mais estudos longitudinais são necessários para avaliar a relação cronológica entre os níveis de TGF- $\beta$  e a ocorrência de DHGNA para esclarecer o provável impacto da causalidade reversa. Independentemente da direção dessa associação, mais atenção deve ser dada à boa acurácia observada entre níveis elevados de TGF- $\beta$  e a presença de esteatose hepática em crianças e adolescentes.

## **6.2 Ensaio clínico randomizado (Etapa 2)**

O presente estudo é, para nosso conhecimento, o primeiro ensaio clínico duplo-cego, randomizado e controlado com placebo que avaliou a eficácia do uso de probióticos no tratamento em DHGNA, realizado no Brasil, e o quarto ensaio clínico randomizado, duplo-cego e placebo controlado, publicado nesse formato na literatura mundial. Dentre os três estudos anteriores na faixa etária pediátrica (27,123,124), nenhum deles avaliou a esteatose hepática através de método de imagem descrito como mais sensível, como realizado no presente estudo, através da RNM com quantificação de gordura intra-hepática por PDFFF.

As características demográficas, antropométricas e clínicas dos adolescentes com e sem DHGNA no *baseline* não apresentavam diferenças estatisticamente significativas. Os perfis foram muito semelhantes entre os grupos, com discreta diferença para síndrome metabólica, ligeiramente mais prevalente no grupo de pacientes que utilizou probióticos.

Em relação aos parâmetros radiológicos não houveram diferenças estatisticamente significante em relação aos achados descritos na RNM inicial, nos parâmetros de percentual de gordura (PDFF) e rigidez hepática (Kpa) entre os grupos, que apresentaram medianas desses valores muito similares. Em relação aos parâmetros bioquímicos, os parâmetros relacionados ao perfil hepático (AST, ALT, GGT, Fosfatase alcalina) não diferiram entre os grupos, assim como também não foram encontradas diferenças relacionadas ao perfil glicídico. Encontrou-se apenas diferenças com relativa significância estatística entre os grupos em relação ao colesterol total ( $p=0,041$ ) e LDL-c ( $p=0,056$ ) com valores de mediana mais elevados no grupo de pacientes que usou probióticos.

Essas características antropométricas, bioquímicas e radiológicas entre os grupos na *baseline*, nos permite descrever uma homogeneidade entre os grupos de intervenção e placebo, favorecendo assim a validade interna do estudo.

Em relação ao efeito do uso do probiótico *Lactobacillus Acidophilus* LA-5® e *Bifidobacterium Lactis* BB-12® nos valores de PDFF obtidos na RNM não encontramos diferenças estatisticamente significante em relação a diferença percentual média (DP) entre a semana 16 e a linha de base, em ambos os grupos. Observou-se muita diversidade nas respostas ao uso do probiótico e do placebo. Apesar disso, as três maiores reduções do percentual de esteatose hepática ocorreram no grupo Probióticos e os três adolescentes com maior ganho de PDFF foram do grupo Placebo.

Vários autores descrevem o papel da microbiota intestinal na patogênese da DHGNA(15,18,23,24), inclusive sugerindo o seu papel, tanto na indução quanto na progressão da doença(19,20). Em pacientes com DHGNA, a permeabilidade intestinal e a prevalência de supercrescimento bacteriano intestinal estão presentes (21). Estudos em adultos demonstraram que os probióticos são uma opção terapêutica promissora (106,93,121).

A grande maioria dos estudos randomizados e controlados que avaliaram a eficácia dos probióticos encontrados na literatura, foram realizados em adultos com DHGNA(162-168). Ainda assim, associando à intervenção, o uso de prebióticos(169,170), sendo em sua grande maioria, estudos abertos (163,164,167). Dois estudos duplo-cegos, randomizados e controlados que utilizaram apenas probióticos na intervenção (162, 166), usaram ALT e AST como desfechos primários para avaliar a melhora da DHGNA e não avaliaram a gordura intra-hepática ou o grau de fibrose hepática. Encontramos um único ensaio clínico duplo cego e placebo controlado, e cujo desfecho primário foi a quantificação de gordura intra hepatica por RNM após intervenção (116). Nesse estudo, Ahn *et al.*, 2019 avaliou 68 pacientes adultos, com intervenção durante 12 semanas, utilizando seis espécies de probióticos (*Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *Pediococcus pentosaceus*, *Bifidobacterium lactis* e *B. breve*), e obteve redução significativa no grupo que usou probióticos do percentual de gordura intra-hepatica e IMC (p= 0,032 e p=0,047, respectivamente) quando comparados ao grupo placebo(116).

Em ensaio clínico recentemente publicado, Scorletti, *et al.*, 2020 utilizou simbióticos e não probióticos isolados, e evidenciou melhora do microbioma fecal, mas não obteve redução significativa da gordura intra-hepatica à RNM(171).

Como descrito anteriormente na população pediátrica não existem estudos de intervenção com probióticos cujo desfecho primário tenha sido a quantificação de gordura intra-hepática por RNM. Este exame, quantifica a esteatose hepática através da fração de gordura de densidade de prótons (PDFF – *Proton Density Fat Fraction*), com elevada acurácia tanto para diagnóstico quanto para a classificação do grau de esteatose em crianças com DHGNA(102-105).

No nosso estudo, não observamos diferenças estatisticamente significativas em relação à diferença de percentual de gordura intra-hepática (antes e após intervenção). Não possuímos dados de literatura para confrontar com os nossos dados nessa faixa etária estudada. Ao avaliar os resultados através da variável de piora do PDFF após a intervenção, observou-se que, no grupo placebo o percentual de pacientes que apresentou piora na classificação da gravidade da esteatose hepática foi maior (25%) quando comparado com o grupo que recebeu a intervenção (7,1%), mas sem significância estatística, dado o poder reduzido em função do tamanho amostral estudado.

Para os valores de rigidez hepática, observou-se uma redução média da diferença percentual entre a semana 16 e a linha de base, para o grupo Probiótico, enquanto houve aumento médio no grupo placebo (-4,77[13,28] vs. 3,03[12,01]; p=0,045). Também se observou, em termos de variação absoluta, a redução média (DP) da rigidez hepática para o grupo Probiótico, e aumento médio para o grupo Placebo (p=0,045).

Na literatura foram descritos dois estudos que avaliaram, através da elastografia, o grau de rigidez hepática como desfecho de intervenção com uso de probióticos, o estudo de Ahn *et. al.*, 2019 (116) que apesar de usar a RNM e o PDFF para quantificação de gordura intra-hepática, usou a elastografia transitória através da ultrassonografia (Fibroscan®) e não encontrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos intervenção e controle (116).

Wong *et. al.*, 2013(170) realizou um ensaio clínico controlado randomizado e aberto, cuja intervenção com probióticos durou 6 meses e cujo desfecho primário foi redução de PDFF, tendo encontrado diferenças estatisticamente significante entre os grupos para os valores de PDFF (p=0,034). Adicionalmente, encontrou tendência de redução da rigidez hepática, medida por elastografia via RNM, no grupo que usou probióticos, sem diferença significativa estatisticamente (p=0,17).

A elastografia é um método não invasivo, realizado através da ultrassonografia ou RNM, de elevado nível de precisão e quem tem sido utilizado para medir a rigidez hepática (predição de fibrose) em adultos e crianças, sendo importante para o diagnóstico de NASH e cirrose (99, 1023-105). A elastografia por RNM, muito embora tenha sido referenciada como método não invasivo de diagnóstico de fibrose, na faixa etária pediátrica, devido aos estudos com amostragem reduzida, necessita de refinamento e validação adicionais a fim de ser integrada a protocolos clínicos para diagnóstico da DHGNA pediátrico(99).

O mecanismo de ação dos probióticos no tratamento da DHGNA e NASH não é completamente compreendido. Em modelos experimentais há descrição de redução de citocinas pró-inflamatórias e modulação de atividade das células T natural killer no hepáticas (170). Na fisiopatologia da DHGNA há descrição de envolvimento de LPS e aumento de permeabilidade intestinal, com níveis plasmáticos mais elevados dessa toxina promovendo necroinflamação

hepática e fibrose. Além disso, os pacientes com NASH apresentam supercrescimento bacteriano no intestino delgado e o nível mais elevado de LPS no sangue(82, 85,87). Essa progressão para NASH causada também pela disbiose intestinal e mediada pelo inflamossoma pode ser modulada pelo uso de probióticos(170).

No presente estudo evidenciamos alguns resultados positivos em relação ao grupo que recebeu a intervenção, o que nos faz hipotetizar que o uso de probióticos modulou de alguma forma a resposta inflamatória hepática.

Não foram observadas diferenças significativas na variação dos parâmetros bioquímicos hepáticos analisados entre o *baseline* (pré-intervenção) e a semana 16 (pós-intervenção). Os adolescentes estudados não apresentavam ao diagnóstico alterações significativas de aminotransferases ou GGT. Embora a NASPGHAN recomende a utilização de dosagem da aminotransferase de alanina (ALT) como exame de triagem e a dosagem desse marcador bioquímico esteja universalmente disponível, tenha baixo custo, seja minimamente invasivo e tenha boa sensibilidade, existe grande divergência na literatura acerca de quais pontos de corte devem ser utilizados para a triagem da DHGNA conforme já comentado anteriormente (18). Na amostra estudada, a mediana de ALT no *baseline* foi de 24,4(18,4-33,4) U/L, valores que, com base nas referências da NASPGHAN, em média não são considerados como alterados. Se utilizarmos as referências de Schwimmer *et al.*,2010(95) cujo ponto de corte é mais baixo (25 U/L e 22 U/L, para meninos e meninas) ainda assim não atingiam 2x o valor de normalidade.

Dos três artigos publicados até o momento, cujo desenho do estudo eram de ensaios clínicos randomizados, duplo-cegos controlados por placebo, na faixa etária pediátrica (27, 123, 124), apenas Vajro *et al.*, 2011(123) avaliaram como desfecho primário a melhora/normalização dos níveis de ALT (<40UI/L). Nesse estudo, os autores observaram alterações mais pronunciadas no grupo tratado com Lactobacillus GG. Oito dos 10 pacientes tratados e 3 dos 10 pacientes no grupo placebo alcançaram valores de ALT <40 U / L, mas a diferença não atingiu significância estatística (p=0,069), e outros parâmetros bioquímicos e ultrassonográficos permaneceram estáveis após intervenção. Esse foi o primeiro estudo a investigar os efeitos do tratamento com probióticos na DHGNA na infância; e, segundo os autores, o estudo foi desenhado como um ensaio piloto de curto prazo (8 semanas) para contornar os efeitos imprevisíveis frequentemente relatados de mudanças no estilo de vida que geralmente podem confundir os resultados de um

estudo de longo prazo. Vajro *et. al.*, 2011, concluiu que num curto período de tratamento com probióticos houve melhora significativa nos valores de ALT, que na maioria dos casos se tornaram normais, e que esse efeito foi independente das alterações de peso na amostra estudada(123).

O segundo ensaio clínico com 48 crianças e adolescentes, conduzido por Alisi *et. al.*, 2014(27), o qual avaliou e entrevistou através da suplementação de um *blend* de probióticos denominado VSL#3 (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium breve*, *B. infantis*, *B. longu*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. paracasei*, e *L. delbrueckii* subespécie *bulgaricus*) durante 4 meses, tendo os níveis de ALT como desfecho secundário, não obteve diferença estatisticamente significativa entre os grupos placebo e intervenção ( $p=0,170$ ), importante ressaltar, que semelhante aos nossos resultados, na análise pré-intervenção os níveis de ALT não estavam elevados acima de 2 vezes o limite para normalidade, considerado pelos autores como aqueles  $<40$  U/L(27).

O terceiro ensaio clínico publicado na faixa etária pediátrica (Famouri *et. al.*, 2017(124)) utilizando o Prokid® como probiótico de intervenção, em 64 pacientes com idades entre 10 e 18 anos, por 12 semanas, no qual os níveis de ALT era desfecho secundário. Os autores encontraram diferenças estatisticamente significantes entre *baseline* e após intervenção, nos níveis de ALT do grupo que utilizou o Prokid® ( $p=0,02$ ) quando comparados com o placebo ( $p=0,2$ ). Ainda nesse estudo, é importante ressaltar que na análise pré-intervenção 66,9% dos pacientes apresentavam níveis de ALT  $<40$  U / L corroborando com os nossos achados de normalidade nos níveis dessa enzima hepática, mesmo em pacientes com diagnóstico de DHGNA, o que nos leva a concordar com a informação de que a DHGNA na faixa etária pediátrica tem peculiaridades metabólicas, bioquímicas e histológicas, diferindo então dos achados da doença no adulto (60).

Apesar da tendência atual de utilização de valores de ALT em pontos de corte mais baixos para identificar possíveis crianças e adolescentes com acúmulo de gordura hepática (95), a literatura descreve anormalidades histológicas, incluindo fibrose significativa, em crianças que apresentavam níveis normais ou apenas levemente elevados de ALT. Isso indica que a dosagem de ALT isolada não é um marcador de rastreamento ideal para detectar a presença de DHGNA e pode não se mostrar alterada mesmo em estágios avançados da doença (15,98).

No presente estudo, após 16 semanas de intervenção, os valores finais da glicemia ( $p=0,043$ ), insulina ( $p<0,001$ ) e HOMA-IR ( $p<0,001$ ) avaliados aumentaram entre os adolescentes estudados de maneira global, e não diferiram entre os grupos. Descrevendo assim uma evolução desfavorável no contexto metabólico da obesidade. Na avaliação pre-intervenção dos pacientes 87,5% dos pacientes do grupo de probióticos e 92,9% do grupo placebo apresentavam diagnóstico de RI o que caracterizava a gravidade da obesidade dos pacientes estudados. Apesar da piora do estado de resistência a insulina e da gravidade da obesidade dos adolescentes estudados, a redução significativa dos valores de rigidez hepática observadas entre os adolescentes que receberam Probióticos reforça o possível papel de resposta clínica destes agentes.

Dos três estudos em crianças(27,123,124), já anteriormente citados apenas Alisi *et al.* 2014, avaliou perfil glicídico através dos valores de índice de HOMA e não encontrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos placebo e intervenção ao final do estudo ( $p=0,693$ )(27).

Em nosso estudo, medianas de glicemia, insulina e Homa IR foram semelhantes entre os grupos tanto na *baseline*, quanto após a intervenção. O achado relevante foi a diferença de valores dessas variáveis, como já citado anteriormente, com elevação da RI, independente do grupo estudado, fato esse que poderia justificar, em parte, a modesta redução do PDFF encontrado no grupo que recebeu a intervenção com probióticos, uma vez que a piora da resistência à insulina mantém em atividade a doença hepática, já que a RI está fortemente relacionada à patogênese da DHGNA. Fisiologicamente, a insulina controla a produção hepática de glicose regulando a lipólise dos adipócitos, levando à diminuição do fluxo de ácidos graxos para o fígado (56).

Na ausência de ensaios clínicos randomizados em crianças e adolescentes que possam corroborar com os nossos achados, os estudos em adultos também são escassos e variam quanto aos achados, a saber: Chong *et al.*, 2021 em um ensaio clínico usando VSL#3 por 10 semanas no qual avaliou os marcadores de risco para doença cardiovascular em adultos com DHGNA, não obteve diferença nos valores de HOMA-IR para o grupo que recebeu a intervenção com probióticos ( $p= 0,95$ ) (172). Achado semelhante ao encontrado por Tenoreo-Jiménez *et al.*, 2019, que ao intervir com uso de *Lactobacillus (L.) reuteri* V3401, em pacientes com DHGNA



e estudar biomarcadores inflamatórios no estudo denominado PROSIR, não observou diferenças após intervenção nos níveis de insulina e HOMA IR(173).

Em relação ao perfil lipídico, observou-se uma tendência de redução mais acentuada dos níveis de colesterol total no grupo probiótico, tanto para os valores absolutos ( $p=0,085$ ) quanto para a variação percentual ( $p=0,081$ ). Após 16 semanas de intervenção, os valores finais medianos do colesterol total foram significativamente menores entre os adolescentes que receberam a intervenção, e o mesmo ocorreu em uma intensidade maior para os níveis do LDL-colesterol, com significância estatística limítrofe ( $p=0,055$ ). Esses achados não foram observados para o HDL-colesterol e triglicérides, no grupo placebo e não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nos valores das referidas variáveis antes e após intervenção. Comparando os resultados do presente estudo com os dos três ensaios clínicos pediátricos (27, 123,124) previamente publicados, observa-se que Famouri *et al.*, 2017, que avaliaram como desfecho secundário o perfil lipídico, com avaliação pós-intervenção em grupos distintos, observaram redução de colesterol total e triglicérides no grupo que usou probióticos ( $p<0,001$ ), embora tenha obtido resultado semelhante para redução de LDL e triglicérides no grupo placebo, atribuídas pelos autores às mudanças de estilo de vida(124). Já o estudo conduzido por Alisi *et al.*, 2014, apenas avaliou níveis de triglicérides e não encontrou diferenças estatisticamente significantes ( $p=0,575$ ) entre os grupos(27). Em estudo comparando as diferenças clínicas, histológicas e metabólicas da DHGNA entre adultos e crianças não foram encontradas diferenças entre as variáveis relacionadas ao perfil lipídico(60). Portanto, ao avaliarmos os resultados encontrados em adultos, por Wang, et al., 2018(174) de redução de CT, LDL e triglicérides, sem mudanças nos níveis de HDL, observamos assemelhar-se aos nossos dados.

O probiótico usado no presente estudo demonstrou uma tendência favorável na redução das concentrações de colesterol total, e LDL, fato não observado nos níveis de Triglicérides e HDL-c. Atribuímos a esse resultado, possivelmente ao curto tempo de intervenção. Nosso achado sobre o HDL está de acordo com a descrição de literatura em estudo, no qual, não foi documentado efeito benéfico dos probióticos no aumento dessa lipoproteína (167), muito embora Ahn, *et al.*, 2018(116) tenham observado redução significativa para triglicérides ( $p=0,02$ ), colesterol total ( $p<0,001$ ) e HDL ( $p=0,007$ ) (123). Em nossa percepção, com base nas diferenças de resultados encontrados na literatura, sugere-se que o nível de HDL pode aumentar

após o tratamento de longo prazo com probióticos, em associação com as mudanças de estilo de vida.

Não foram encontradas diferenças absolutas e percentuais dos valores de ferritina, PCR e vitamina D, entre a semana 16 e o *baseline* para os grupos s valores médios (DP). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos do estudo. Não encontramos em literatura, estudos em que utilizassem como desfecho secundário níveis de vitamina D e ferritina. Nos estudos de intervenção com probióticos na faixa etária pediátrica, essas variáveis não foram estudadas.

Observou-se, mesmo sem significância estatística, uma redução média dos valores da PCR-US mais relevante entre os adolescentes que estavam no grupo Placebo. A mediana de PCR-US dos pacientes do presente estudo encontrava-se alterada na *baseline* (probióticos e placebo) e manteve-se ao final da intervenção. A maioria dos estudos de intervenção com probióticos, não utilizou PCR-US e ferritina, como desfechos secundários. Em estudo duplo-cego randomizado em adultos no qual se administrou probióticos após cirurgia de gastrectomia vertical, não foram observadas diferenças entre os grupos para valores de ferritina ( $p=0,557$ ) e PCR-US ( $p=0,072$ )(175). Em estudo de corte transversal de nossa autoria, no qual avaliamos o grau de perturbação metabólica entre pacientes obesos, com e sem DHGNA, não foram observadas, diferenças significativas entre os grupos com e sem DHGNA para Ferritina e PCR-US, também não foram marcadores com maior número de correlações em grupo de pacientes com DHGNA(176). A maioria dos pacientes estudados eram obesos graves, e a obesidade *per si* é definida como uma doença metabólica e inflamatória (48). A PCR-US é um marcador de inflamação e risco cardiovascular e pode manter-se elevada em diversas condições inflamatórias, não sendo específica para diagnóstico ou evolução da DHGNA(135).

No presente estudo, em relação aos dados antropométricos e de composição corporal, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos após intervenção, para Peso, IMC/ Idade, CC e percentual de Gordura corporal. Não houve variação significativa dessas mesmas variáveis ao longo das 4 visitas realizadas.

Embora não significativa, observou-se aumento mediano do peso no grupo Probiótico, mas com redução dos escores z do indicador IMC/idade. No grupo Placebo, a mediana do peso no final

do estudo foi menor, comparado com o *baseline*, bem como a redução do indicador IMC/idade, mas ambos não significantes.

Na literatura encontramos resultados divergentes, limitados na grande maioria das vezes à avaliação de IMC ou CC (27,124,116,170). Em estudos de intervenção com probióticos envolvendo a população pediátrica, o conduzido por Famouri, *et al.*, 2017, não encontrou diferenças estatisticamente significantes nos valores de IMC, escore Z de IMC/Idade, CC e peso, após intervenção(124). Vajro, *et al.*, 2011, também não encontrou diferenças significantes para IMC de crianças e adolescentes obesos após intervenção com probióticos (123). Em contrapartida, Allisi, *et al.*, 2014 obteve uma redução significativa de IMC no grupo que recebeu a intervenção com probióticos, tanto em valores absolutos de IMC ( $p < 0,001$ ) quanto para o escore Z de IMC/Idade ( $p < 0,001$ )(27). É importante destacar que a redução de peso corresponde ao melhor tratamento para a obesidade. Assim, é importante avaliar o efeito dos Probiótico de modo isolado a redução da gordura corporal.

Mesmo nos ensaios clínicos envolvendo obesos adultos com DHGNA ou NASH os resultados relacionados a dados antropométricos são variados. Em três estudos cujo desfecho primário foi semelhante ao presente trabalho (avaliação de gordura intra-hepática por RNM com PDFFF), um deles apenas avaliou IMC e CC e não obteve diferença estatisticamente significativa após intervenção (115); um segundo avaliou também os mesmos parâmetros antropométricos e obteve resultados semelhantes(170), e o terceiro mais completo metodologicamente, e que avaliou composição corporal por bioimpedância obteve diferença estatisticamente significativa na diferença de peso entre a *baseline* e após intervenção no grupo que usou probióticos ( $p = 0,0029$ ), assim como no IMC ( $p = 0,0024$ ), na massa gorda total ( $p = 0,0028$ ) e no percentual de gordura corporal ( $p = 0,0032$ )(119).

Vários estudos descrevem o papel da microbiota intestinal no desenvolvimento e manutenção da obesidade (67,89,74,75). Os mecanismos fisiopatológicos foram detalhados no item 3.0 da revisão de literatura Muitos autores atribuem a perda ponderal ou ajustes de composição corporal às correções da disbiose intestinal, pois mudanças de espécies estão relacionadas a um perfil metabólico diverso, seja no aproveitamento maior de energia, ou na piora a RI, ou até mesmo em modulações relacionadas ao eixo intestino cérebro e a questões comportamentais relacionadas à fome, saciedade e regulação da ingesta. calórica(48-51,56,63). Apesar de não

observarmos diferenças ao longo das quatro visitas na prática da atividade física e da ingestão calórica (fatores que poderiam influenciar nos resultados e nos parâmetros antropométricos) atribuímos os nossos resultados pouco expressivos ao curto período de intervenção, ao discreto tamanho amostral, além da ausência de acesso a programas motivacionais ou seguimento psicoterápico que auxiliariam nas mudanças de hábitos de vida. É possível que mudanças de hábitos de vida potencializem o efeito do uso de probióticos e possa ser uma ferramenta de manutenção do peso. Contudo, essas respostas devem ser buscadas em futuros estudos de intervenção mais prolongada.

Em relação à adesão terapêutica, ambos os grupos obtiveram adesão semelhante ao longo das semanas de avaliação, sem diferenças significantes entre os grupos. Exceto no período entre as semanas 12 e 16, todos os adolescentes alocados no estudo tiveram adesão superior a 80%. Para tratamentos a nível ambulatorial, a literatura descreve taxas de não adesão que oscilam de 20 a 82%. Mais recentemente descrevem-se cifras mais baixas (50-65%)(177). Atribuímos as nossas boas taxas de adesão terapêutica às estratégias utilizadas, já descritas na metodologia desse estudo – diariamente eram enviadas mensagens, com um cartão informativo via WhatsApp, no mesmo horário, lembrando o paciente ou familiar de administrar o probiótico ou placebo. Os pacientes tinham contato direto com os membros da pesquisa a fim de esclarecer dúvidas, relatar reações adversas ou quaisquer problemas referentes ao tratamento.

Probióticos são definidos pela OMS como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro(109). Geralmente não estão associados a reações adversas típicas de medicações, mas a alteração na consistência e frequência das fezes, flatulência ou cólicas abdominais. ou alterações do paladar, podem ser descritas com o uso (109,178).

No presente estudo, a presença de reações adversas não foi tão frequente e não foi necessária a retirada de nenhum paciente do protocolo devido aos eventos adversos relatados. Os eventos adversos relacionados ao sistema digestivo foram os mais relatados, especialmente alterações no ritmo intestinal, dados compatíveis com a descrição de literatura. Nesse estudo, apenas nas primeiras 6 semanas de uso, observou-se diarreia e náuseas, que ocorreram de forma fugaz e pontual. Após 16 semanas, seis adolescentes apresentaram mudanças na consistência das fezes,

segundo a Escala Bristol. Destes, apenas 2 evoluíram para padrão de consistência Bristol 1 e 2, compatíveis com possível constipação intestinal e estavam alocados no grupo Placebo.

Em comparação com a linha de base, não houve diferença na quantidade de ingestão alimentar e exercício físico antes e após o tratamento por 16 semanas no grupo probiótico ou placebo. A variabilidade da ingestão total de energia (VET) entre as semanas de avaliação se mostraram estáveis entre o momento de início e de término da intervenção. Observou-se um aumento significativo do consumo médio de energia entre a semana 12 e a semana 16 ( $p=0,011$ ) e este achado não teve influência do grupo de alocação do estudo ( $p=0,572$ ). Atribuímos a esse aumento da ingesta calórica ao período final da intervenção, que coincidiu com as férias escolares e feriados de datas comemorativas. Para o consumo de fibras, observou-se uma estabilidade durante o estudo, sem diferenças significantes entre o padrão referido para a semana pré-intervenção e as semanas seguintes de aferição, fator que possivelmente não interferiu na consistência das fezes e nem nas reações adversas decorrentes de possíveis fermentações excessivas por conta da mudança no perfil da microbiota intestinal.

Em média, o consumo percentual de gordura nos quatro recordatórios alimentares de 24h aferidos foi similar entre os grupos Probiótico e Placebo. Adicionalmente, observou-se uma variação estável e não significativa do consumo percentual de lipídios entre as quatro visitas que possivelmente não influenciaram nos resultados.

Não houve diferença na proporção de adolescentes inativos entre os grupos do estudo no decorrer do tempo de observação ( $p_{\text{tendência}}=0,972$ ). Para o grupo que recebeu a intervenção, a proporção de sedentarismo diminuiu entre o *baseline* e a semana 16, mas sem significância ( $p_{\text{tendência}}=0,516$ ). De maneira similar, o grupo placebo apresentou as mesmas características ( $p_{\text{tendência}}=0,375$ ). Portanto, as mudanças de estilo de vida que incluíam atividade física e orientação padronizada para alimentação equilibrada através da reeducação alimentar, não foram variáveis confundidoras para os resultados encontrados.

Essa ausência de variações significativas ao longo do período de intervenção para variáveis potencialmente confundidoras, como: a prática de atividade física, ingestão calórica ou de fibras, uso de antibióticos ou variações antropométricas, nos permite interpretar os resultados positivos encontrados, como efeito da intervenção.

## 7 CONCLUSÕES

Diante dos dados anteriormente descritos, o estudo conclui que:

- Os padrões de perturbação metabólica observados nos adolescentes obesos estudados com e sem DHGNA, diagnosticados pela ultrassonografia, são diferentes, e alguns marcadores não invasivos podem ser utilizados na contribuição da suspeição do diagnóstico de DHGNA;
- Mediante a avaliação dos valores dos coeficientes canônicos do modelo de Análise de Correspondência Canônica (CCA - *Canonical correlation analysis*) observou-se que os marcadores mais significativos responsáveis pela discriminação entre os adolescentes com ou sem DHGNA, baseado no diagnóstico ultrassonográfico, foram LDL-c, triglicerídeos, TGF- $\beta$ , ALT, HDL-c e hematócrito;
- Os marcadores ALT e TGF-  $\beta$  se mostraram como fatores independentes associados à presença de esteatose hepática entre os adolescentes estudados;
- O marcador plasmático TGF- $\beta$  apresentou uma acurácia de 83% (IC95%: 74,0 – 93,0%), baseado na área sob a curva ROC, com sensibilidade de 75,0% e especificidade de 88,9% para diagnosticar a presença ultrassonográfica de esteatose hepática;
- A suplementação com *Lactobacillus Acidophilus e Bifidobacterium*, não reduziu, de forma significativa, o valor de PDFF obtidos à RNM, embora no grupo suplementado, tenham sido observados menores percentuais de adolescentes que apresentaram piora do PDFF neste grupo, quando comparado ao grupo placebo;
- A suplementação com *Lactobacillus Acidophilus e Bifidobacterium* reduziu, significativamente, os valores de rigidez hepática (Kpa), ao final de 16 semanas de intervenção, quando comparado ao grupo Placebo;
- Não foram observadas diferenças significantes na glicemia, insulinemia e escores HOMA-IR entre os adolescentes que receberam suplementação com *Lactobacillus Acidophilus e Bifidobacterium* e os que receberam Placebo. Em ambos os grupos, os valores de insulinemia e HOMA-IR aumentaram, significativamente, ao final de 16 semanas;
- Observaram-se maiores reduções de Colesterol Total, embora limítrofes em termos de significância estatística, entre os adolescentes que receberam suplementação com

*Lactobacillus Acidophilus e Bifidobacterium*, mas não houve diferenças entre os grupos estudados para o LDL-c, HDL-c e os triglicerídeos, ao final de 16 semanas;

- Ao final de 16 semanas, a suplementação com *Lactobacillus Acidophilus e Bifidobacterium* não impactou em mudanças significativas de parâmetros antropométricos (peso, IMC, indicador IMC/idade, CC) e no percentual de gordura corporal, quando comparados ao grupo Placebo;
- A tolerância e segurança do uso de suplementação com *Lactobacillus Acidophilus e Bifidobacterium* foram confirmadas, sem diferenças significantes na ocorrência de eventos adversos entre os grupos de estudo, durante as 16 semanas de seguimento;

## 8 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS

Apesar de concluir que a suplementação com *Lactobacillus Acidophilus e Bifidobacterium*, não reduziu, de forma significativa, o valor de PDFF obtido à RNM, esse estudo é o primeiro ensaio clínico realizado em crianças e adolescentes, usando a RNM como método diagnóstico. O estudo apresentou algumas limitações importantes, em que vale destacar o pequeno número amostral, o tempo relativamente curto de intervenção, a ausência de uma análise de da microbiota fecal antes e após a intervenção.

O pioneirismo deste estudo no Brasil, nos faz concluir que para obter resultados mais precisos, seria interessante desenvolver estudos adicionais, multicêntricos, a fim de obter uma amostra mais representativa. Além disso, seria importante a análise da microbiota fecal antes e após a intervenção, e talvez conduzir um ensaio clínico cruzado (incluindo um período de washout), com maior período de intervenção, para melhor avaliar os efeitos de probióticos no tratamento da DHGNA. Outra estratégia para melhorar a qualidade da intervenção, seria utilizar mais espécies de probióticos compondo uma mistura de cepas mais diversificada.



## REFERÊNCIAS

1. Aiello AM, Marques de Mello L, Souza Nunes M, Soares da Silva A, Nunes A. Prevalence of Obesity in Children and Adolescents in Brazil: A Meta-analysis of Cross-sectional Studies. *Curr Pediatr Rev.* 2015;11(1):36-42.
2. de Vasconcelos Chaves VL, Freese E, Lapa TM, Cesse EA, de Vasconcelos AL. [Temporal evolution of overweight and obesity among Brazilian male adolescents, 1980-2005]. *Cad Saude Publica.* 2010;26(7):1303-13.
3. Livingstone B. Epidemiology of childhood obesity in Europe. *Eur J Pediatr.* 2000;159 Suppl 1:S14-34.
4. Monteiro CA, Conde WL, Popkin BM. Income-specific trends in obesity in Brazil: 1975-2003. *Am J Public Health.* 2007;97(10):1808-12.
5. Wang Y, Monteiro C, Popkin BM. Trends of obesity and underweight in older children and adolescents in the United States, Brazil, China, and Russia. *Am J Clin Nutr.* 2002;75(6):971-7.
6. Wang Y, Chen HJ, Shaikh S, Mathur P. Is obesity becoming a public health problem in India? Examine the shift from under- to overnutrition problems over time. *Obes Rev.* 2009;10(4):456-74.
7. Di Cesare M, Sorić M, Bovet P, Miranda JJ, Bhutta Z, Stevens GA, et al. The epidemiological burden of obesity in childhood: a worldwide epidemic requiring urgent action. *BMC Med.* 2019;17(1):212.
8. Shelton DL, Reichardt LF. Studies on the expression of the beta nerve growth factor (NGF) gene in the central nervous system: level and regional distribution of NGF mRNA suggest that NGF functions as a trophic factor for several distinct populations of neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(8):2714-8.
9. Raj M. Obesity and cardiovascular risk in children and adolescents. *Indian J Endocrinol Metab.* 2012;16(1):13-9.
10. Greydanus DE, Agana M, Kamboj MK, Shebrain S, Soares N, Eke R, et al. Pediatric obesity: Current concepts. *Dis Mon.* 2018;64(4):98-156.
11. Kumar S, Kelly AS. Review of Childhood Obesity: From Epidemiology, Etiology, and Comorbidities to Clinical Assessment and Treatment. *Mayo Clin Proc.* 2017;92(2):251-65.
12. Anderson EL, Howe LD, Jones HE, Higgins JP, Lawlor DA, Fraser A. The Prevalence of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Children and Adolescents: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2015;10(10):e0140908.
13. Uppal V, Mansoor S, Furuya KN. Pediatric Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Curr Gastroenterol Rep.* 2016;18(5):24.

14. Xanthakos S, Miles L, Bucuvalas J, Daniels S, Garcia V, Inge T. Histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease in morbidly obese adolescents. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006;4(2):226-32.
15. Vajro P, Lenta S, Socha P, Dhawan A, McKiernan P, Baumann U, et al. Diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease in children and adolescents: position paper of the ESPGHAN Hepatology Committee. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012;54(5):700-13.
16. Nobili V, Alkhoury N, Alisi A, Della Corte C, Fitzpatrick E, Raponi M, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a challenge for pediatricians. *JAMA Pediatr*. 2015;169(2):170-6.
17. Schwimmer JB, Deutsch R, Kahen T, Lavine JE, Stanley C, Behling C. Prevalence of fatty liver in children and adolescents. *Pediatrics*. 2006;118(4):1388-93.
18. Vos MB, Abrams SH, Barlow SE, Caprio S, Daniels SR, Kohli R, et al. NASPGHAN Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children: Recommendations from the Expert Committee on NAFLD (ECON) and the North American Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (NASPGHAN). *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2017;64(2):319-34.
19. Barshop NJ, Sirlin CB, Schwimmer JB, Lavine JE. Review article: epidemiology, pathogenesis and potential treatments of paediatric non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008;28(1):13-24.
20. Nobili V, Socha P. Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Current Thinking. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2018;66(2):188-92.
21. Nobili V, Putignani L, Mosca A, Del Chierico F, Vernocchi P, Alisi A, et al. Bifidobacteria and lactobacilli in the gut microbiome of children with non-alcoholic fatty liver disease: which strains act as health players? *Arch Med Sci*. 2018;14(1):81-7.
22. Polyzos SA, Kountouras J, Deretzi G, Zavos C, Mantzoros CS. The emerging role of endocrine disruptors in pathogenesis of insulin resistance: a concept implicating nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Mol Med*. 2012;12(1):68-82.
23. Mann JP, Valenti L, Scorletti E, Byrne CD, Nobili V. Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children. *Semin Liver Dis*. 2018;38(1):1-13.
24. Berardis S, Sokal E. Pediatric non-alcoholic fatty liver disease: an increasing public health issue. *Eur J Pediatr*. 2014;173(2):131-9.
25. Alisi A, Nobili V. Non-alcoholic fatty liver disease in children now: lifestyle changes and pharmacologic treatments. *Nutrition*. 2012;28(7-8):722-6.
26. Alisi A, Feldstein AE, Villani A, Raponi M, Nobili V. Pediatric nonalcoholic fatty liver disease: a multidisciplinary approach. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012;9(3):152-61.

27. Alisi A, Bedogni G, Baviera G, Giorgio V, Porro E, Paris C, et al. Randomised clinical trial: The beneficial effects of VSL#3 in obese children with non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014;39(11):1276-85.
28. 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.
29. Mathur P, Das MK, Arora NK. Non-alcoholic fatty liver disease and childhood obesity. *Indian J Pediatr.* 2007;74(4):401-7.
30. Lirussi F, Mastropasqua E, Orando S, Orlando R. Probiotics for non-alcoholic fatty liver disease and/or steatohepatitis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007(1):Cd005165.
31. Boursier J, Diehl AM. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and the Gut Microbiome. *Clin Liver Dis.* 2016;20(2):263-75.
32. Boursier J, Mueller O, Barret M, Machado M, Fizanne L, Araujo-Perez F, et al. The severity of nonalcoholic fatty liver disease is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota. *Hepatology.* 2016;63(3):764-75.
33. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 2000;894:i-xii, 1-253.
34. Simmonds M, Llewellyn A, Owen CG, Woolacott N. Predicting adult obesity from childhood obesity: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev.* 2016;17(2):95-107.
35. Styne DM, Arslanian SA, Connor EL, Farooqi IS, Murad MH, Silverstein JH, et al. Pediatric Obesity-Assessment, Treatment, and Prevention: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(3):709-57.
36. Morales Camacho WJ, Molina Díaz JM, Plata Ortiz S, Plata Ortiz JE, Morales Camacho MA, Calderón BP. Childhood obesity: Aetiology, comorbidities, and treatment. *Diabetes Metab Res Rev.* 2019;35(8):e3203.
37. Kuczmarski RJ, Ogden CL, Grummer-Strawn LM, Flegal KM, Guo SS, Wei R, et al. CDC growth charts: United States. *Adv Data.* 2000(314):1-27.
38. Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *Bmj.* 2000;320(7244):1240-3.
39. Lobstein T, Jackson-Leach R, Moodie ML, Hall KD, Gortmaker SL, Swinburn BA, et al. Child and adolescent obesity: part of a bigger picture. *Lancet.* 2015;385(9986):2510-20.
40. Organization(WHO) WH. Obesity and overweight. WHO. electronic article. 2016.

41. Di Cesare M BJ, Stevens GA, Zhou B, Danaei G, Lu Y et al. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *Lancet*. 2016;387(10026):1377-96.
42. Pelegrini A, Silva DA, Gaya AC, Petroski EL. Comparison of three criteria for overweight and obesity classification in Brazilian adolescents. *Nutr J*. 2013;12:5.
43. Conceição-Machado ME, Silva LR, Santana ML, Pinto EJ, Silva Rde C, Moraes LT, et al. Hypertriglyceridemic waist phenotype: association with metabolic abnormalities in adolescents. *J Pediatr (Rio J)*. 2013;89(1):56-63.
44. Flores LS, Gaya AR, Petersen RD, Gaya A. Trends of underweight, overweight, and obesity in Brazilian children and adolescents. *J Pediatr (Rio J)*. 2013;89(5):456-61.
45. de Onis M, Onyango AW, Borghi E, Siyam A, Nishida C, Siekmann J. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. *Bull World Health Organ*. 2007;85(9):660-7.
46. Grummer-Strawn LM, Reinold C, Krebs NF. Use of World Health Organization and CDC growth charts for children aged 0-59 months in the United States. *MMWR Recomm Rep*. 2010;59(Rr-9):1-15.
47. Organization WH. . World Health Organization Child Growth Standards. 2006.
48. Singer K, Lumeng CN. The initiation of metabolic inflammation in childhood obesity. *J Clin Invest*. 2017;127(1):65-73.
49. Nehus E, Mitsnefes M. Childhood Obesity and the Metabolic Syndrome. *Pediatr Clin North Am*. 2019;66(1):31-43.
50. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(2):85-97.
51. Ellulu MS, Patimah I, Khaza'ai H, Rahmat A, Abed Y. Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications. *Arch Med Sci*. 2017;13(4):851-63.
52. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 1998;395(6704):763-70.
53. Padilha PdC, Rocha HFd, Alves N, Peres WAF. Prevalência de doença hepática não-alcoólica em crianças e adolescentes obesos: uma revisão sistemática. *Revista Paulista de Pediatria*. 2010;28:387-93.
54. Fleet SE, Lefkowitz JH, Lavine JE. Current Concepts in Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterol Clin North Am*. 2017;46(2):217-31.
55. Szeto HH, Liu S, Soong Y, Alam N, Prusky GT, Seshan SV. Protection of mitochondria prevents high-fat diet-induced glomerulopathy and proximal tubular injury. *Kidney Int*. 2016;90(5):997-1011.

56. Draijer L, Benninga M, Koot B. Pediatric NAFLD: an overview and recent developments in diagnostics and treatment. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019;13(5):447-61.
57. Chiesa C, Andreoli GM, Pacifico L. Pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *J Pediatr (Rio J).* 2019;95(1):4-6.
58. Kotronen A, Yki-Järvinen H. Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(1):27-38.
59. Pacifico L, Poggiogalle E, Cantisani V, Menichini G, Ricci P, Ferraro F, et al. Pediatric nonalcoholic fatty liver disease: A clinical and laboratory challenge. *World J Hepatol.* 2010;2(7):275-88.
60. Holterman AX, Guzman G, Fantuzzi G, Wang H, Aigner K, Browne A, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in severely obese adolescent and adult patients. *Obesity (Silver Spring).* 2013;21(3):591-7.
61. Feldstein AE, Charatcharoenwitthaya P, Treeprasertsuk S, Benson JT, Enders FB, Angulo P. The natural history of non-alcoholic fatty liver disease in children: a follow-up study for up to 20 years. *Gut.* 2009;58(11):1538-44.
62. Goyal NP, Schwimmer JB. The Progression and Natural History of Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Liver Dis.* 2016;20(2):325-38.
63. Machado MV, Diehl AM. Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology.* 2016;150(8):1769-77.
64. Andrade VLÂR, Liubiana Arantes de Araújo; Moura, Marco Túlio Russo Moreira; Anjos, Edriana Moreira Silva dos; Oliveira, Karine Aparecida de; Pereira, Marcus Vinicius Reis; Pereira, Mayara Romes Andrade; Amorim, Nathália Ribeiro de; Iskandar, Stephanie Maroun. Obesidade e microbiota intestinal / Obesity and gut microbiota. *Rev méd Minas Gerais;*25(4). 2015;25(4):583-9.
65. Kho ZY, Lal SK. The Human Gut Microbiome - A Potential Controller of Wellness and Disease. *Front Microbiol.* 2018;9:1835.
66. Mathur R, Barlow GM. Obesity and the microbiome. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2015;9(8):1087-99.
67. Tilg H. Obesity, metabolic syndrome, and microbiota: multiple interactions. *J Clin Gastroenterol.* 2010;44 Suppl 1:S16-8.
68. Angelakis E, Armougom F, Million M, Raoult D. The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. *Future Microbiol.* 2012;7(1):91-109.

69. Yang YJ, Ni YH. Gut microbiota and pediatric obesity/non-alcoholic fatty liver disease. *J Formos Med Assoc.* 2019;118 Suppl 1:S55-s61.
70. Leung DH, Yimlamai D. The intestinal microbiome and paediatric liver disease. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2017;2(6):446-55.
71. Pihl AF, Fonvig CE, Stjernholm T, Hansen T, Pedersen O, Holm JC. The Role of the Gut Microbiota in Childhood Obesity. *Child Obes.* 2016;12(4):292-9.
72. Graham C, Mullen A, Whelan K. Obesity and the gastrointestinal microbiota: a review of associations and mechanisms. *Nutr Rev.* 2015;73(6):376-85.
73. Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(31):11070-5.
74. Reinhardt C, Reigstad CS, Bäckhed F. Intestinal microbiota during infancy and its implications for obesity. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009;48(3):249-56.
75. Koleva PT, Bridgman SL, Kozyrskyj AL. The infant gut microbiome: evidence for obesity risk and dietary intervention. *Nutrients.* 2015;7(4):2237-60.
76. Luoto R, Kalliomäki M, Laitinen K, Delzenne NM, Cani PD, Salminen S, et al. Initial dietary and microbiological environments deviate in normal-weight compared to overweight children at 10 years of age. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2011;52(1):90-5.
77. Sanmiguel C, Gupta A, Mayer EA. Gut Microbiome and Obesity: A Plausible Explanation for Obesity. *Curr Obes Rep.* 2015;4(2):250-61.
78. Malaguarnera L, Madeddu R, Palio E, Arena N, Malaguarnera M. Heme oxygenase-1 levels and oxidative stress-related parameters in non-alcoholic fatty liver disease patients. *J Hepatol.* 2005;42(4):585-91.
79. Sass G, Barikbin R, Tiegs G. The multiple functions of heme oxygenase-1 in the liver. *Z Gastroenterol.* 2012;50(1):34-40.
80. Khalid MH E, Ayman A-R, Fawzy E, Fawzy M. Transforming Growth Factor Beta One and Non Alcoholic Fatty Liver Disease. *Afro-Egypt J Infect Endem Dis.* 2014(4):136-42.
81. Nair B, Nath LR. Inevitable role of TGF- $\beta$ 1 in progression of nonalcoholic fatty liver disease. *J Recept Signal Transduct Res.* 2020;40(3):195-200.
82. Aron-Wisnewsky J, Vigliotti C, Witjes J, Le P, Holleboom AG, Verheij J, et al. Gut microbiota and human NAFLD: disentangling microbial signatures from metabolic disorders. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2020;17(5):279-97.
83. Duseja A, Chawla YK. Obesity and NAFLD: the role of bacteria and microbiota. *Clin Liver Dis.* 2014;18(1):59-71.

84. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*. 2016;65(8):1038-48.
85. Saad MJ, Santos A, Prada PO. Linking Gut Microbiota and Inflammation to Obesity and Insulin Resistance. *Physiology (Bethesda)*. 2016;31(4):283-93.
86. Safari Z, Gérard P. The links between the gut microbiome and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Cell Mol Life Sci*. 2019;76(8):1541-58.
87. Caricilli AM, Saad MJ. The role of gut microbiota on insulin resistance. *Nutrients*. 2013;5(3):829-51.
88. Hu H, Lin A, Kong M, Yao X, Yin M, Xia H, et al. Intestinal microbiome and NAFLD: molecular insights and therapeutic perspectives. *J Gastroenterol*. 2020;55(2):142-58.
89. Leung C, Rivera L, Furness JB, Angus PW. The role of the gut microbiota in NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016;13(7):412-25.
90. Lau LHS, Wong SH. Microbiota, Obesity and NAFLD. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1061:111-25.
91. Canfora EE, Meex RCR, Venema K, Blaak EE. Gut microbial metabolites in obesity, NAFLD and T2DM. *Nat Rev Endocrinol*. 2019;15(5):261-73.
92. Zhao Y, Wu J, Li JV, Zhou NY, Tang H, Wang Y. Gut microbiota composition modifies fecal metabolic profiles in mice. *J Proteome Res*. 2013;12(6):2987-99.
93. Ma YY, Li L, Yu CH, Shen Z, Chen LH, Li YM. Effects of probiotics on nonalcoholic fatty liver disease: a meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2013;19(40):6911-8.
94. Shen Z, Ajmo JM, Rogers CQ, Liang X, Le L, Murr MM, et al. Role of SIRT1 in regulation of LPS- or two ethanol metabolites-induced TNF-alpha production in cultured macrophage cell lines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009;296(5):G1047-53.
95. Schwimmer JB, Dunn W, Norman GJ, Pardee PE, Middleton MS, Kerkar N, et al. SAFETY study: alanine aminotransferase cutoff values are set too high for reliable detection of pediatric chronic liver disease. *Gastroenterology*. 2010;138(4):1357-64, 64.e1-2.
96. Barlow SE. Expert committee recommendations regarding the prevention, assessment, and treatment of child and adolescent overweight and obesity: summary report. *Pediatrics*. 2007;120 Suppl 4:S164-92.
97. Cuda SE, Censani M. Pediatric Obesity Algorithm: A Practical Approach to Obesity Diagnosis and Management. *Front Pediatr*. 2018;6:431.

98. Brunt EM, Neuschwander-Tetri BA, Oliver D, Wehmeier KR, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: histologic features and clinical correlations with 30 blinded biopsy specimens. *Hum Pathol*. 2004;35(9):1070-82.
99. Nobili V, Alisi A, Valenti L, Miele L, Feldstein AE, Alkhoury N. NAFLD in children: new genes, new diagnostic modalities and new drugs. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16(9):517-30.
100. Awai HI, Newton KP, Sirlin CB, Behling C, Schwimmer JB. Evidence and recommendations for imaging liver fat in children, based on systematic review. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014;12(5):765-73.
101. Bohte AE, van Werven JR, Bipat S, Stoker J. The diagnostic accuracy of US, CT, MRI and 1H-MRS for the evaluation of hepatic steatosis compared with liver biopsy: a meta-analysis. *Eur Radiol*. 2011;21(1):87-97.
102. Schwimmer JB, Middleton MS, Behling C, Newton KP, Awai HI, Paiz MN, et al. Magnetic resonance imaging and liver histology as biomarkers of hepatic steatosis in children with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2015;61(6):1887-95.
103. Xiao G, Zhu S, Xiao X, Yan L, Yang J, Wu G. Comparison of laboratory tests, ultrasound, or magnetic resonance elastography to detect fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease: A meta-analysis. *Hepatology*. 2017;66(5):1486-501.
104. Kramer H, Pickhardt PJ, Kliwer MA, Hernando D, Chen GH, Zagzebski JA, et al. Accuracy of Liver Fat Quantification With Advanced CT, MRI, and Ultrasound Techniques: Prospective Comparison With MR Spectroscopy. *AJR Am J Roentgenol*. 2017;208(1):92-100.
105. Yokoo T, Serai SD, Pirasteh A, Bashir MR, Hamilton G, Hernando D, et al. Linearity, Bias, and Precision of Hepatic Proton Density Fat Fraction Measurements by Using MR Imaging: A Meta-Analysis. *Radiology*. 2018;286(2):486-98.
106. Lavine JE, Schwimmer JB, Van Natta ML, Molleston JP, Murray KF, Rosenthal P, et al. Effect of vitamin E or metformin for treatment of nonalcoholic fatty liver disease in children and adolescents: the TONIC randomized controlled trial. *Jama*. 2011;305(16):1659-68.
107. Nobili V, Manco M, Devito R, Di Ciommo V, Comparcola D, Sartorelli MR, et al. Lifestyle intervention and antioxidant therapy in children with nonalcoholic fatty liver disease: a randomized, controlled trial. *Hepatology*. 2008;48(1):119-28.
108. Akcam M, Boyaci A, Pirgon O, Kaya S, Uysal S, Dundar BN. Therapeutic effect of metformin and vitamin E versus prescriptive diet in obese adolescents with fatty liver. *Int J Vitam Nutr Res*. 2011;81(6):398-406.
109. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics



- consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014;11(8):506-14.
110. Barendolts E. Gut microbiota, prebiotics, probiotics, and synbiotics in management of obesity and prediabetes: review of randomized controlled trials. *Endocr Pract*. 2016;22(10):1224-34.
  111. Perumpail BJ, Li AA, John N, Sallam S, Shah ND, Kwong W, et al. The Therapeutic Implications of the Gut Microbiome and Probiotics in Patients with NAFLD. *Diseases*. 2019;7(1).
  112. Sharpton SR, Maraj B, Harding-Theobald E, Vittinghoff E, Terrault NA. Gut microbiome-targeted therapies in nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *Am J Clin Nutr*. 2019;110(1):139-49.
  113. Porras D, Nistal E, Martínez-Flórez S, González-Gallego J, García-Mediavilla MV, Sánchez-Campos S. Intestinal Microbiota Modulation in Obesity-Related Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Front Physiol*. 2018;9:1813.
  114. Iacono A, Raso GM, Canani RB, Calignano A, Meli R. Probiotics as an emerging therapeutic strategy to treat NAFLD: focus on molecular and biochemical mechanisms. *J Nutr Biochem*. 2011;22(8):699-711.
  115. Kobylak N, Abenavoli L, Mykhalchyshyn 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.
  116. Ahn SB, Jun DW, Kang BK, Lim JH, Lim S, Chung MJ. Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Study of a Multispecies Probiotic Mixture in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Sci Rep*. 2019;9(1):5688.
  117. Socha P, Horvath A, Vajro P, Dziechciarz P, Dhawan A, Szajewska H. Pharmacological interventions for nonalcoholic fatty liver disease in adults and in children: a systematic review. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2009;48(5):587-96.
  118. Abenavoli L, Scarpellini E, Rouabhia S, Balsano C, Lizza F. Probiotics in non-alcoholic fatty liver disease: which and when. *Ann Hepatol*. 2013;12(3):357-63.
  119. Kelishadi R, Farajian S, Mirlohi M. Probiotics as a novel treatment for non-alcoholic Fatty liver disease; a systematic review on the current evidences. *Hepat Mon*. 2013;13(4):e7233.
  120. Vajro P, Lenta S, Pignata C, Salerno M, D'Aniello R, De Micco I, et al. Therapeutic options in pediatric non alcoholic fatty liver disease: current status and future directions. *Ital J Pediatr*. 2012;38:55.
  121. Mann JP, Tang GY, Nobili V, Armstrong MJ. Evaluations of Lifestyle, Dietary, and Pharmacologic Treatments for Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2019;17(8):1457-76.e7.

122. Chaves FGB, Oliveira GF, Ribeiro JP, Serafim JV, Cordeiro LFM, Alvares MA, et al. The therapeutic impact of probiotics on nonalcoholic fatty liver disease in pediatrics: a systematic review. *Rev Paul Pediatr.* 2021;39:e2019226.
123. 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.
124. Famouri F, Shariat Z, Hashemipour M, Keikha M, Kelishadi R. Effects of Probiotics on Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Obese Children and Adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2017;64(3):413-7.
125. Patel NS, Doycheva I, Peterson MR, Hooker J, Kisselva T, Schnabl B, et al. Effect of weight loss on magnetic resonance imaging estimation of liver fat and volume in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2015;13(3):561-8.e1.
126. adolescents Sfgotwsca. WHO AnthroPlus for personal computers Manual. Geneva2009.
127. Standards of medical care in diabetes--2014. *Diabetes Care.* 2014;37 Suppl 1:S14-80.
128. Haahr M. Randomness and Integrity Services Ltd. Premier Business Centres Ireland1998-2021 [Available from: <https://www.random.org/mads/>].
129. Crispim SPF, Regina Mara. Almeida, Claudia Choma Bettega. INicolas, Geneviève.; Knaze, Viktoria. ; Pereira, Rosangela Alves; Marchiori, Dirce Maria Lobo; dos Santos, Nathalie Alves.;Steluti, Josiane; Slimani, Nadia. , , editors. Manual fotográfico de quantificação alimentar2017.
130. DIETBOX. DIETBOX. 2019.
131. Guedes DL Guedes CC, JERP. Reprodutibilidade de la validez de la Encuesta Internacional de Actividad Física en adolescentes. *Rev Bras Med Esporte.* 2005;11(2):147e-54e.
132. Hamaguchi M, Kojima T, Itoh Y, Harano Y, Fujii K, Nakajima T, et al. The severity of ultrasonographic findings in nonalcoholic fatty liver disease reflects the metabolic syndrome and visceral fat accumulation. *Am J Gastroenterol.* 2007;102(12):2708-15.
133. Kühn JP, Hernando D, Muñoz del Rio A, Evert M, Kannengiesser S, Völzke H, et al. Effect of multiplex spectral modeling of fat for liver iron and fat quantification: correlation of biopsy with MR imaging results. *Radiology.* 2012;265(1):133-42.
134. Kühn JP, Meffert P, Heske C, Kromrey ML, Schmidt CO, Mensel B, et al. Prevalence of Fatty Liver Disease and Hepatic Iron Overload in a Northeastern German Population by Using Quantitative MR Imaging. *Radiology.* 2017;284(3):706-16.

135. Flynn JT, Kaelber DC, Baker-Smith CM, et al. Subcommittee on screening and management of high blood pressure in children. Clinical Practice Guideline for Screening and Management of High Blood Pressure in Children and Adolescents. *Pediatrics*. 2017; 140(3):e20171904. *Pediatrics*. 2017;140(6).
136. Koppen IJ, Nurko S, Saps M, Di Lorenzo C, Benninga MA. The pediatric Rome IV criteria: what's new? *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;11(3):193-201.
137. Lewis SJ, Heaton KW. Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time. *Scand J Gastroenterol*. 1997;32(9):920-4.
138. Freedman DS, Serdula MK, Srinivasan SR, Berenson GS. Relation of circumferences and skinfold thicknesses to lipid and insulin concentrations in children and adolescents: the Bogalusa Heart Study. *Am J Clin Nutr*. 1999;69(2):308-17.
139. Frisancho A. Anthropometric standards for the assessment of growth and nutritional status. Ann Arbor: University of Michigan Press. 1990.
140. Venkatesh SK, Ehman RL. Magnetic resonance elastography of liver. *Magn Reson Imaging Clin N Am*. 2014;22(3):433-46.
141. Almeida CA, Pinho AP, Ricco RG, Pepato MT, Brunetti IL. Determination of glycemia and insulinemia and the homeostasis model assessment (HOMA) in schoolchildren and adolescents with normal body mass index. *J Pediatr (Rio J)*. 2008;84(2):136-40.
142. Faludi AA, Izar MCO, Saraiva JFK, Chacra APM, Bianco HT, Afiune AN, et al. Atualização Da Diretriz Brasileira De Dislipidemias E Prevenção Da Aterosclerose – 2017. *Arq Bras Cardiol*. 2017;109(2 Supl 1):1-76.
143. Munns CF, Shaw N, Kiely M, Specker BL, Thacher TD, Ozono K, et al. Global Consensus Recommendations on Prevention and Management of Nutritional Rickets. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(2):394-415.
144. Mayer-Barber KD, Andrade BB, Oland SD, Amaral EP, Barber DL, Gonzales J, et al. Host-directed therapy of tuberculosis based on interleukin-1 and type I interferon crosstalk. *Nature*. 2014;511(7507):99-103.
145. Vinhaes CL, Araujo-Pereira M, Tibúrcio R, Cubillos-Angulo JM, Demitto FO, Akrami KM, et al. Systemic Inflammation Associated with Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome in Persons Living with HIV. *Life (Basel)*. 2021;11(1).
146. Vinhaes CL, Arriaga MB, de Almeida BL, Oliveira JV, Santos CS, Calcagno JI, et al. Newborns With Zika Virus-Associated Microcephaly Exhibit Marked Systemic Inflammatory Imbalance. *J Infect Dis*. 2020;222(4):670-80.
147. Lavine JE, Schwimmer JB, Molleston JP, Scheimann AO, Murray KF, Abrams SH, et al. Treatment of nonalcoholic fatty liver disease in children: TONIC trial design. *Contemp Clin Trials*. 2010;31(1):62-70.

148. Colantonio DA, Kyriakopoulou L, Chan MK, Daly CH, Brinc D, Venner AA, et al. Closing the gaps in pediatric laboratory reference intervals: a CALIPER database of 40 biochemical markers in a healthy and multiethnic population of children. *Clin Chem*. 2012;58(5):854-68.
149. Schwimmer JB, Newton KP, Awai HI, Choi LJ, Garcia MA, Ellis LL, et al. Paediatric gastroenterology evaluation of overweight and obese children referred from primary care for suspected non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013;38(10):1267-77.
150. Oliveira-de-Souza D, Vinhaes CL, Arriaga MB, Kumar NP, Cubillos-Angulo JM, Shi R, et al. Molecular degree of perturbation of plasma inflammatory markers associated with tuberculosis reveals distinct disease profiles between Indian and Chinese populations. *Sci Rep*. 2019;9(1):8002.
151. Cruz LAB, Moraes MOA, Queiroga-Barros MR, Fukutani KF, Barral-Netto M, Andrade BB. Chronic hepatitis B virus infection drives changes in systemic immune activation profile in patients coinfecting with *Plasmodium vivax* malaria. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(6):e0007535.
152. Andrade BB, Singh A, Narendran G, Schechter ME, Nayak K, Subramanian S, et al. Mycobacterial antigen driven activation of CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> monocytes is a predictor of tuberculosis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome. *PLoS Pathog*. 2014;10(10):e1004433.
153. Chiappini F, Barrier A, Saffroy R, Domart MC, Dagues N, Azoulay D, et al. Exploration of global gene expression in human liver steatosis by high-density oligonucleotide microarray. *Lab Invest*. 2006;86(2):154-65.
154. Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci*. 2002;7:d793-807.
155. Flisiak R, Pytel-Krolczuk B, Prokopowicz D. Circulating transforming growth factor beta(1) as an indicator of hepatic function impairment in liver cirrhosis. *Cytokine*. 2000;12(6):677-81.
156. Tarantino G, Conca P, Riccio A, Tarantino M, Di Minno MN, Chianese D, et al. Enhanced serum concentrations of transforming growth factor-beta1 in simple fatty liver: is it really benign? *J Transl Med*. 2008;6:72.
157. McPherson S, Hardy T, Henderson E, Burt AD, Day CP, Anstee QM. Evidence of NAFLD progression from steatosis to fibrosing-steatohepatitis using paired biopsies: implications for prognosis and clinical management. *J Hepatol*. 2015;62(5):1148-55.
158. Manion M, Andrade BB, DerSimonian R, Gu W, Rupert A, Musselwhite LW, et al. Country of residence is associated with distinct inflammatory biomarker signatures in HIV-infected patients. *J Virus Erad*. 2017;3(1):24-33.
159. Mendonça VR, Queiroz AT, Lopes FM, Andrade BB, Barral-Netto M. Networking the host immune response in *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J*. 2013;12:69.

160. Lee MJ. Transforming growth factor beta superfamily regulation of adipose tissue biology in obesity. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2018;1864(4 Pt A):1160-71.
161. Alisi A, Nobili V, Ceccarelli S, Panera N, De Stefanis C, De Vito R, et al. Plasma high mobility group box 1 protein reflects fibrosis in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Expert Rev Mol Diagn.* 2014;14(6):763-71.
162. Aller R, De Luis DA, Izaola O, Conde R, Gonzalez Sagrado M, Primo D, et al. Effect of a probiotic on liver aminotransferases in nonalcoholic fatty liver disease patients: a double blind randomized clinical trial. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2011;15(9):1090-5.
163. Huixiang Y. Clinical study of probiotics in treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology and Liver Disease* 2013. 2013;3.
164. Yang LGH CJ, Cai X, Liu G, Chen D. Intervention effect of microbiological capsules containing *Bacillus subtilis* and *Enterococcus* on intestinal flora in patients with NASH. *World Chinese J Digestology.* 2012.
165. Malaguarnera M, Vacante M, Antic T, Giordano M, Chisari G, Acquaviva R, et al. *Bifidobacterium longum* with fructo-oligosaccharides in patients with non alcoholic steatohepatitis. *Dig Dis Sci.* 2012;57(2):545-53.
166. Nabavi S, Rafraf M, Somi MH, Homayouni-Rad A, Asghari-Jafarabadi M. E placebo controlled trial of VSL#3(®) probiotic on biomarkers of cardiovascular risk and liver injury in non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol.* 2021;21(1):144.
167. Yang, W., Wang, Y., Yu, X. & Z., Y. The influence of probiotics medications on nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterol Hepatol* **25**, 3 (2014).
168. Sepideh A, Karim P, Hossein A, Leila R, Hamdollah M, Mohammad EG, et al. Effects of Multistrain Probiotic Supplementation on Glycemic and Inflammatory Indices in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Double-Blind Randomized Clinical Trial. *J Am Coll Nutr.* 2016;35(6):500-5.
169. 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.
170. Wong VW, Won GL, Chim AM, Chu WC, Yeung DK, Li KC, et al. Treatment of nonalcoholic steatohepatitis with probiotics. A proof-of-concept study. *Ann Hepatol.* 2013;12(2):256-62.
171. Scorletti E, Afolabi PR, Miles EA, Smith DE, Almeahmadi A, Alshathry A, et al. Synbiotics Alter Fecal Microbiomes, But Not Liver Fat or Fibrosis, in a Randomized Trial of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology.* 2020;158(6):1597-610.e7.
172. Chong PL, Laight D, Aspinall RJ, Higginson A, Cummings MH. A randomised placebo controlled trial of VSL#3(®) probiotic on biomarkers of cardiovascular risk and liver injury in non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol.* 2021;21(1):144.

173. Tenorio-Jiménez C, Martínez-Ramírez MJ, Del Castillo-Codes I, Arraiza-Irigoyen C, Tercero-Lozano M, Camacho J, et al. Lactobacillus reuteri V3401 Reduces Inflammatory Biomarkers and Modifies the Gastrointestinal Microbiome in Adults with Metabolic Syndrome: The PROSIR Study. *Nutrients*. 2019;11(8).
174. Wang W, Shi LP, Shi L, Xu L. [Efficacy of probiotics on the treatment of non-alcoholic fatty liver disease]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*. 2018;57(2):101-6.
175. Sherf-Dagan S, Zelber-Sagi S, Zilberman-Schapira G, Webb M, Buch A, Keidar A, et al. Probiotics administration following sleeve gastrectomy surgery: a randomized double-blind trial. *Int J Obes (Lond)*. 2018;42(2):147-55.
176. Barretto JR, Boa-Sorte N, Vinhaes CL, Malta-Santos H, Rebouças-Silva J, Ramos CF, et al. Heightened Plasma Levels of Transforming Growth Factor Beta (TGF- $\beta$ ) and Increased Degree of Systemic Biochemical Perturbation Characterizes Hepatic Steatosis in Overweight Pediatric Patients: A Cross-Sectional Study. *Nutrients*. 2020;12(6).
177. Robiner WN. Enhancing adherence in clinical research. *Contemp Clin Trials*. 2005;26(1):59-77.
178. Doron S, Snyderman DR. Risk and safety of probiotics. *Clin Infect Dis*. 2015;60 Suppl 2(Suppl 2):S129-34.

## APÊNDICES

### Apêndice A - Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)



#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estamos convidando o (a) senhor (a), como mãe, pai e/ou responsável pelo adolescente \_\_\_\_\_ para participar desse estudo, chamado "EFICÁCIA DO USO DE *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* E *BIFIDOBACTERIUM LACTIS* NO TRATAMENTO DA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ÁLCOOLICA E RESISTÊNCIA A INSULINA EM ADOLESCENTES OBESOS: ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO". Leia com atenção todo o texto a seguir.

O objetivo principal desta pesquisa é verificar se o uso de *Lactobacillus Acidophilus* e *Bifidobacterium Lactis*, um tipo de alimento, funciona para melhorar a esteatose hepática (gordura no fígado) de seu(ua) filho(a). Para sabermos se vai funcionar iremos medir a quantidade de gordura do fígado, por ressonância nuclear magnética, um exame de imagem. Estamos propondo esta pesquisa porque boa parte dos adolescentes obesos tem gordura acumulada no fígado, e isso, depois de algum tempo pode causar inflamação do fígado (esteatohepatite) e, de maneira mais grave, fibrose (cicatriz no fígado) e cirrose (fígado sem funcionar). Além disso, não existem tratamentos (remédios) que já tenham sido comprovadamente bons pra tratar essa complicação da obesidade. Alguns pacientes usam a metformina (um remédio para diabetes) e a vitamina E (quando tem gordura com inflamação no fígado), mas esses tratamentos não são totalmente consensuais (todos os médicos fazem isso) e podem apresentar efeitos colaterais como piora da inflamação do fígado, em alguns casos.

O *Lactobacillus Acidophilus* e *Bifidobacterium Lactis* é um probiótico, um tipo de alimento, que apesar de não ser remédio, em estudos experimentais com animais e, em poucos estudos com adultos humanos, mostrou-se potencialmente eficaz na redução da gordura do fígado (diminuiu a gordura e a inflamação). Como não existem estudos em adolescentes obesos com esse alimento e por causa da alta possibilidade de funcionar e ser uma alternativa de tratamento, resolvemos propor esse estudo.

#### Qual será a participação do meu(inha) filho(a) neste estudo?

Ao concordar com a pesquisa, o(a) seu(ua) filho(a) irá realizar cinco visitas (visita de triagem e visitas numeradas de 1 a 4) no ADAB (ambulatório docente assistencial de Brotas), da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, sendo acompanhado neste centro pela Dra. Junaura Barretto, também pesquisadora deste estudo. As consultas médicas serão mensais (a cada 30 dias). Durante a pesquisa, seu(ua) filho(a) continuará o acompanhamento no serviço (ambulatório) no qual ele já faz acompanhamento e manterá esse acompanhamento, no mesmo lugar, depois do fim da pesquisa. O tempo previsto para o acompanhamento é de 4 a 6 meses. Nestas consultas serão coletados dados da história da obesidade e suas complicações e dados sobre a alimentação do seu(ua) filho(a). Ele(a) será examinado(a), terá o peso, a altura, circunferência abdominal (tamanho da barriga) e medidas de pregas cutâneas (gordura localizada no braço e nas costas) realizadas. Também será medida a pressão arterial no braço e será feito um exame chamado bioimpedância que mede a quantidade de gordura corporal. Esse exame não causa dor, nem marcas ou lesões no corpo. Seu(ua) filho(a) vai ficar em pé numa balança especial por um minuto e o exame estará feito. Será aplicado também um questionário para avaliação da quantidade de atividade física que seu(ua) filho(a) faz, chamado IPAQ-c. O tempo previsto para estas atividades é de 30 a 40 minutos.

Na primeira (visita 1) e última visita (visita 4) serão coletados exames laboratoriais de sangue e de fezes. Para isso, seu(ua) filho(a) deverá estar em jejum (sem comer nada nas últimas 8 horas antes do exame) e trazer as fezes do dia anterior, guardadas em geladeira. O pote para guardar as fezes será entregue pela equipe de pesquisa. O exame de sangue será realizado pelo laboratório de análises clínicas do ADAB, conforme agendamento prévio. Após a coleta dos exames será oferecido ao(a) seu filho (a) um lanche. A pessoa que coletará o sangue trabalha no laboratório e é habilitada a utilizar os procedimentos adequados para minimizar os riscos para o paciente. Entretanto, observamos que

Rubrica participante/representante legal \_\_\_\_\_

Rubrica pesquisador \_\_\_\_\_



há a possibilidade de ocorrer riscos e desconfortos relacionados à coleta venosa, ainda que raros e passageiros, como dor localizada, hematoma, desmaio e infecção local. Caso no momento da coleta o seu filho apresente algum desconforto emocional ou físico, reagendaremos a coleta para um momento mais adequado. Em caso de hematoma, bolsa de gelo será colocada no local e um componente da equipe estará ao lado de(a) seu(ua) filho(a). Os resultados dos exames, após avaliados em consulta e informados ao responsável pelo(a) menor, serão registrados em prontuário e ficha de pesquisa, e serão entregues aos responsáveis pelo paciente.

Ainda como parte da pesquisa, nestas mesmas visitas 1 e 4, serão realizados exames de ressonância nuclear magnética (RNM) para detectar a quantidade de gordura do fígado. Esse exame não utiliza radiação ionizante (raios X). Neste exame, o(a) seu(ua) filho é submetido(a) a um campo magnético (uma espécie de imã), no qual ondas de rádio-frequência (tipo ondas de rádio FM, que não se vê, nem se sente) são enviadas para o corpo e órgãos e interagem com os tecidos no interior do corpo, transformando energia eletromagnética (a que tem no imã) em correntes elétricas ("sinal"), que serão lidas pelo computador e transformadas em imagem. Não será necessária a utilização do meio de contraste paramagnético endovenoso (uma espécie de corante que se faz pra ver melhor os órgãos). O exame tem duração média de 10-15 minutos e é realizado em aparelho com abertura ("bore") larga de 70 cm de diâmetro. Assim, o seu(ua) filho(a) não ficará dentro de um tubo fechado como é na maioria dos aparelhos de RNM. O acompanhante (o sr. ou a sra.) pode ficar ao lado do paciente durante a realização do exame. Esse exame vai permitir medir a quantidade de gordura no fígado e verificar se houve redução da gordura após o tratamento com o uso de probiótico, além de avaliar a rigidez hepática (se o fígado está duro), permitindo saber se existe ou não algum grau de inflamação ou fibrose (cicatriz) no fígado. Esse exame não terá custo nenhum para o(a) Sr(a) e será realizado na Clínica Delfin, localizada na Av. Antônio Carlos Magalhães, 442 - Itaipara, Salvador - BA. O exame terá agendamento prévio e haverá uma comunicação com antecedência suficiente para que se programe para a realização do mesmo, bem como será viabilizado transporte de ida e volta em VAN com motorista, acompanhado de um dos membros da pesquisa, sem nenhum custo para o sr(a) e seu(ua) filho(a).

#### **Qual será o tratamento realizado?**

Para realização do tratamento, será necessário dividir os pacientes em 2 grupos, um grupo fará uso diariamente de 1 sachê contendo 1g de probióticos (Lactobacillus acidophilus LA-5®; Bifidobacterium lactis BB-12 correspondendo a 10<sup>9</sup>UFC) durante 12 semanas, e o outro grupo fará uso de 1 sachê contendo 1g de celulose microcristalina (substância sem efeito de tratamento que faz parte inclusive de composição de alimentos industrializados e medicamentos, como complemento da composição). As cápsulas contendo probióticos ou celulose serão iguais e os frascos contendo as cápsulas serão identificadas apenas através de letras ou números. Estes frascos serão fornecidos pela equipe de pesquisa na primeira consulta médica. O(A) seu(ua) filho(a) poderá estar recebendo as cápsulas com probiótico ou com celulose e nem ele(a), o(a) sr(a) ou o membro da equipe da pesquisa que fará as avaliações nas visitas de 1 a 4 sabem que tipo de cápsula está sendo usada. Somente ao final do estudo obteremos essa informação, ou em alguma situação especial em que isso seja necessário.

#### **Existe algum risco em utilizar o probiótico ou a celulose?**

Ambas as substâncias não tem efeitos colaterais importantes descritas em literatura médica, exceto se o paciente apresentar alergia a algum componente da fórmula, a saber: Inulina, Manitol (espécies de açúcares), Aroma baunilha e Dióxido de silício (um sal mineral). Essas perguntas (sobre ter alergia) serão realizadas durante a primeira consulta e caso o paciente apresente alergia, será excluído do estudo, mas permanecerá em acompanhamento ambulatorial para tratamento convencional da obesidade. Como geralmente existe alteração da flora intestinal do paciente obeso, a suplementação com uso de probióticos numa fase inicial poderá eventualmente em alguns pacientes causar alguma alteração leve do ritmo intestinal (deixar as fezes mais duras ou mais moles) ou flatulência (produção de gases intestinais), reações que são leves e transitórias. Outras alterações não são previstas, mas a equipe médica estará disponível para orientar e intervir sempre que necessário, através de contato telefônico ou consulta adicional presencial quando necessária. Qualquer mal-estar em que seja necessário intervenção de urgência durante as consultas médicas ou em nível domiciliar, a equipe do SAMU será acionada, e os médicos assistentes do ambulatório e da



pesquisa darão o suporte inicial até a transferência do paciente, inclusive em Unidades de Pronto Atendimento (UPAs), caso ocorra alguma alteração em domicílio.

#### **O que mais preciso saber?**

A pesquisa não influencia no acompanhamento e cuidado para com o(a) seu(ua) filho(a) durante o seguimento em consultas, com manutenção das intervenções padrão de tratamento da obesidade infantil e das suas comorbidades (doenças associadas). Seu médico assistente continuará acompanhando o seu(ua) filho(a) normalmente.

Gostaríamos de deixar claro que para coleta de dados para pesquisa os participantes não serão identificados pelo nome e sim por um número aleatório (código especial da pesquisa) e que todas as informações colhidas serão usadas somente para fins dessa pesquisa e permanecerão em total sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a privacidade do paciente. Os resultados da pesquisa serão arquivados e guardados pelo pesquisador. Nenhum dado pessoal será utilizado em caso de produção de artigos científicos e/ou relatórios sobre a pesquisa. Informamos que o (a) senhor (a) não pagará nem será remunerado pela sua participação. Todas as despesas decorrentes das visitas ao ADAB para fins da pesquisa serão cobertas pela pesquisa e qualquer gasto relacionado a pesquisa será ressarcido ao (a) sr(a), caso exista gasto não previsto durante a pesquisa.

Esclarecemos que a participação do seu (sua) filho(a) é voluntária e que o(a) senhor(a) poderá se recusar a participar do estudo, bem como pode ser retirado o consentimento a qualquer momento, sem precisar haver justificativa, e ao sair da pesquisa, não haverá qualquer consequência ou prejuízo à assistência do seu filho (a). O(A) seu(ua) filho(a) tem a garantia de indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa, caso seja comprovado nexa causal, dentro das leis vigentes no território brasileiro.

#### **Qual o benefício que esta pesquisa pode trazer?**

A pesquisa poderá proporcionar benefício para o participante deste estudo, uma vez que em dados de estudos prévios observam-se os efeitos benéficos do uso de probióticos na obesidade e especialmente na redução da doença hepática gordurosa não alcoólica. Só saberemos disso ao final do estudo com a realização da visita 4 e a análise dos dados obtidos. Esse estudo, uma vez comprovando o benefício, contribuirá para que este produto seja liberado para uso no tratamento da esteatose (gordura no fígado), beneficiando o paciente participante da pesquisa de imediato, que terá garantida a utilização de probióticos para dar continuidade ao tratamento seja através do fornecimento de sachês iguais as utilizadas durante a pesquisa, ou via utilização do Kefir (alimento para a produção de iogurte fermentado contendo esses probióticos) esse alimento é fornecido para preparo em casa e será fornecido para todos os participantes da pesquisa ao final da mesma, caso não consigamos uma doação mínima de pelo menos 1 ano de tratamento com as cápsulas utilizadas na pesquisa. Isso não causará qualquer prejuízo da utilização uma vez que contém os probióticos usados durante a pesquisa. O seu (sua) filho(a), será orientado a utilizar o probiótico de forma contínua durante a sua vida, uma vez que é alimento funcional (alimento com propriedades terapêuticas) a ser incluído como parte da dieta dos mesmos, e pode trazer outros benefícios para obesidade os quais já são relatados em outras pesquisas. Os benefícios se estendem também para outros adolescentes obesos com esteatose que não participaram da pesquisa, mas que se beneficiarão com os resultados positivos sendo orientados quanto a utilização dos probióticos.

Uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido lhe será entregue. Se houver perguntas ou necessidade de mais informações sobre o estudo, ou qualquer intercorrência, o Senhor /a senhora pode procurar o Coordenador do Projeto, Dr. Ney Boa Sorte, no ADAB, situado na Av. Dom João VI, 275 - Brotas, Salvador-BA, CEP 40243-045, Tel. (71)3234-9350 ou através do e-mail [neyboasorte@bahiana.edu.br](mailto:neyboasorte@bahiana.edu.br), ou a Dra. Jumaia Barretto nos mesmos contatos ou

Rubrica participante/representante legal \_\_\_\_\_

Rubrica pesquisador \_\_\_\_\_

através do email: [junaurabarreto@bahiana.edu.br](mailto:junaurabarreto@bahiana.edu.br). O telefone (71) 996692224 poderá ser utilizado durante as 24h para qualquer contato relacionado a pesquisa. Um membro da pesquisa estará responsável por atendê-lo(a).

Qualquer dúvida, comentário, ou reclamação poderão ser feitos ao Comitê de Ética em Pesquisa da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Avenida Dom João VI, nº 275 – Brotas, CEP: 40.290-000, Salvador- Bahia, telefone (71) 3276-8225, e-mail [cep@bahiana.edu.br](mailto:cep@bahiana.edu.br). O pesquisador responsável cumprirá todas as exigências contidas nos itens IV.3 e IV.4 da Resolução CNS 466/2012.

Após ter lido o texto acima, e ter esclarecido todas as minhas dúvidas, eu \_\_\_\_\_ RG nº \_\_\_\_\_, pai, mãe ou responsável legal pelo paciente \_\_\_\_\_ concordo, voluntariamente, em permitir a participação do meu(inha) filho(a). Todas as páginas devem ser rubricadas.

Salvador, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Nome do Participante ou Responsável Legal

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Participante ou Respo

\_\_\_\_\_  
Nome do Pesquisador

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador

\_\_\_\_\_  
Nome da Testemunha

\_\_\_\_\_  
Assinatura da Testemunha

\_\_\_\_\_  
Nome da Testemunha

\_\_\_\_\_  
Assinatura da Testemunha

## Apêndice B - Termo de assentimento

1



### TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Oli! Estamos convidando você a participar da uma pesquisa chamada: **“EFICÁCIA DO USO DE LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS E BIFIDOBACTERIUM LACTIS NO TRATAMENTO DA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ÁLCOOLICA E RESISTÊNCIA A INSULINA EM ADOLESCENTES OBESOS: ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO”**.

Essa pesquisa tem como responsáveis o Dr. Ney Boa Sorte e a Dra. Junaury Rocha Barretto da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Leia com atenção o texto e sinta-se a vontade para perguntar qualquer coisa sobre esse convite.

Nesta pesquisa queremos saber como está o nível de gordura no seu fígado e estaremos além das orientações gerais para tratamento da obesidade, realizando exames laboratoriais de sangue e de fezes, e um exame de imagem chamado ressonância magnética, que vai verificar a quantidade de gordura do seu fígado. Uma vez que seja comprovado que seu fígado tem gordura, vamos fazer um tratamento com um tipo de alimento chamado probiótico. Serão dois grupos, um tomando o probiótico e outro tomando uma espécie de farinha. Você e nem o médico da pesquisa que conversará com você não saberão o que tem dentro das cápsulas. Para isso, você precisará tomar diariamente uma cápsula contendo uma substância que pode ter efeito benéfico na redução da gordura do seu fígado, por isso é muito importante a sua colaboração na aderência ao tratamento e comparecimento nas consultas, nas quais vamos medir o seu peso, altura, pressão arterial e buscar dados sobre alimentação e atividade física e fazer medições da gordura no seu corpo através das medidas de dobras de pele nos braços e circunferência do abdome e de um exame indolor chamado bioimpedância, que é tipo uma balança especial. Todo esse procedimento não dói e não te trará prejuízo. Essas atividades devem durar cerca de meia hora de relógio.

A coleta de sangue será realizada em 2 momentos do acompanhamento e pode gerar um pouco de dor local no momento da coleta e em alguns casos pequena mancha no braço que desaparecerá com brevidade. Não há necessidade de sedação (anestesia) para realização do exame de ressonância; você só precisará ficar sem se mexer por cerca de 10 a 15 minutos, deitado no aparelho, mas não será necessário fazer uso de medicação chamada contraste na veia e o(a) seu(a) responsável, pai ou mãe, poderá acompanhá-lo durante todo o tempo da realização do exame.

Outros riscos em você concordar em participar desta pesquisa é ter o seu nome ou outra informação pessoal sua revelada para alguém fora da equipe de pesquisadores. Para que nada aconteça de errado, nenhuma informação pessoal sua ou de seu responsável (nome, nome da mãe, nome do pai, telefone, endereço) serão registrados em nossas fichas ou computadores da pesquisa, apenas no seu prontuário médico, que fica guardado no ambulatório e somente os profissionais de saúde (médico, enfermeira, nutricionista, etc) tem acesso.

Como benefício, esperamos melhorar os cuidados de outros adolescentes e crianças com obesidade infantil e gordura no fígado. Você não receberá nenhum dinheiro (pagamento) para participar desta pesquisa e não precisará gastar nada para participar dela. Você pode perguntar qualquer coisa sobre a pesquisa que tiver curiosidade diretamente aos pesquisadores, por meio de

Rubrica participante/representante legal \_\_\_\_\_

Rubrica pesquisador \_\_\_\_\_

seu responsável ou por um órgão chamado Comitê de Ética em Pesquisa, cujo endereço e telefone está no final deste termo.

Sua participação é voluntária, isto é, você pode não aceitar participar ou desistir de continuar participando da pesquisa, a qualquer momento, sem nenhum tipo de prejuízo ao seu tratamento, por ter tomado essa decisão. Caso se sinta prejudicado pela pesquisa e isso tenha fundamento (de que a pesquisa tenha sido a causa do problema) te daremos o apoio, indenização e a assistência integral e necessária, segundo as leis do nosso país, como dissemos e garantimos ao seu responsável.

Você pode ainda entrar em contato com os responsáveis pela pesquisa: o Coordenador do Projeto, Dr. Ney Boa Sorte, no ADAB, Av. Dom João VI, 275 - Brotas, Salvador - BA, CEP 40243-045, Tel: (71)3234-9350 ou através do e-mail [neyboasorte@bahiana.edu.br](mailto:neyboasorte@bahiana.edu.br), ou a Dra. Junaura Barretto nos mesmos contatos ou através do e-mail: [junaurabarretto@bahiana.edu.br](mailto:junaurabarretto@bahiana.edu.br).

Qualquer dúvida, comentário, ou reclamação poderão ser feitos ao Comitê de Ética em Pesquisa da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Avenida Dom João VI, nº 275 – Brotas, CEP: 40.290-000-Salvador- Bahia, telefone (71) 3276-8225, e-mail [cep@bahiana.edu.br](mailto:cep@bahiana.edu.br)

Esse termo é preenchido em duas vias originais, sendo que uma delas ficará com você. Assine e/ou rubrique todas as páginas deste termo. Nós, pesquisadores, faremos o mesmo. Acrescentamos que pedimos autorização também ao seu(sua) responsável. Somente com a sua autorização e a de le(a), incluiremos você na pesquisa. Você pode conversar com o seu responsável ou com quem quiser, antes de decidir.

Eu, \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_, declaro que li o termo, retirei todas as minhas dúvidas e aceito, voluntariamente, participar desta pesquisa.

Salvador, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Nome do Participante ou Responsável Legal

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Participante ou Responsável Legal

\_\_\_\_\_  
Nome do Pesquisador

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador

\_\_\_\_\_  
Nome da Testemunha

\_\_\_\_\_  
Assinatura da Testemunha

\_\_\_\_\_  
Nome da Testemunha

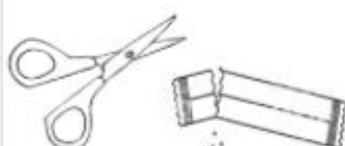
\_\_\_\_\_  
Assinatura da Testemunha

## Apêndice C - Folheto explicativo para uso do probiótico ou placebo

### CUIDADOS

- CONSERVE EM TEMPERATURA AMBIENTE
- PROTEJA DO CALOR E UMIDADE
- SÓ ABRA NO MOMENTO DE CONSUMIR
- NÃO AQUEÇA OU RESFRIE
- NÃO DISSOLVA EM LIQUIDOS QUENTES

### INTRUÇÕES PARA O CONSUMO



1. CORTE A EXTREMIDADE DO SACHÊ COM AUXÍLIO DE UMA TESOURA



2. DESPEJE TODO O CONTEÚDO DO SACHÊ EM UM COPO COM UM POUCO DE ÁGUA E MEÇA ATÉ DISSOLVER



3. BEBA TODO O CONTEÚDO DO COPO

### CUIDADOS

- CONSERVE EM TEMPERATURA AMBIENTE
- PROTEJA DO CALOR E UMIDADE
- SÓ ABRA NO MOMENTO DE CONSUMIR
- NÃO AQUEÇA OU RESFRIE
- NÃO DISSOLVA EM LIQUIDOS QUENTES



O probiótico não é considerado remédio e por isso é isento de efeitos colaterais, não vai prejudicar o seu filho, pelo contrário, trará benefícios para saúde de um modo geral. O placebo é inerte, não tem ação no organismo.

O seu filho vai comparecer as consultas agendadas, nelas terá toda explicação necessária, as mesmas, também estão contidas nos termos de consentimento que você assinou e na via que está em suas mãos.

Durante o acompanhamento seu filho(a) continuará sendo tratado para obesidade com consultas médicas e de nutricionista, realizará exames no início e ao final da intervenção (aos 4 meses) e depois seguirá em acompanhamento ambulatorial.

Todos os dados coletados são confidenciais e os resultados da pesquisa serão publicados em números, nos quais nenhuma identificação do paciente aparece.

Para que tudo dê certo, inclusive o tratamento, que pode beneficiar o (a) seu filho(a) e outros tantos pacientes, é importante seguir as recomendações e fazer o uso regular do probiótico.

## O que é o projeto?

O projeto PROBESO é uma pesquisa científica que envolve o uso de probióticos (lactobacilos) para tratar a esteatose hepática (gordura no fígado) de crianças e adolescentes obesos. Realizado por médicos, nutrólogos pediatras, nutricionista com parceria com a Escola Bahiana de Medicina e a Fiocruz, é uma pesquisa inovadora com uso de probióticos que não é medicamento e por isso além de vários benefícios gerais para saúde, não tem efeitos colaterais.

## Como funciona projeto?

O projeto de pesquisa envolve o uso de probióticos (lactobacilos) por via oral para tratar a esteatose hepática (gordura no fígado) que seu filho(a) apresenta.

Usaremos em um grupo o probiótico e no outro um placebo, ninguém saberá o que estará usando até o final da pesquisa, pois essa estratégia é exigida por normas de pesquisa para que se tenha credibilidade nos resultados e para que depois o probiótico possa ser indicado para todos, caso os resultados sejam positivos.

Após a pesquisa, caso os resultados sejam positivos, forneceremos os probióticos para uso para aqueles do grupo que usaram o placebo, ou seja, todos terão oportunidade de passar pelo tratamento.

## O que faço se não puder comparecer ?

- Ideal não faltar as consultas, pois elas estão atreladas ao uso do probiótico e as avaliações dependem do número de dias utilizados.
- Se por motivo de força maior não puder comparecer, avise com antecedência para poder alinharmos o reagendamento e você não perder o tratamento.

## Como usar o probiótico ?

- Conservar em local fresco ao abrigo de calor excessivo e umidade
- Só abrir no momento do uso
- Cortar a extremidade do sachê com uma tesoura e despejar o conteúdo em meio copo com água, mexer e tomar
- Tomar preferencialmente à noite antes de dormir
- Não dissolver o conteúdo em líquidos quentes





Nº de Identificação

Data:        
 Dia Mês Ano

**Critérios de elegibilidade**

**Critérios de Inclusão**

	Sim	Não
1. Idade entre 10-19 anos		
2. Diagnóstico de Esteatose		
3. Obesidade( IMC > Z escore +2)		
4. Residente de Salvador-Bahia		

**Critérios de Exclusão**

	Sim	Não
1. Idade inferior a 10 anos e 1 dia		
2. Ausência de obesidade		
3. Presença de diabetes mellitus		
4. Presença de obesidade endógena		
5. Presença de comorbidade psiquiátrica		
6. Uso de corticoides, antibióticos, ansiolíticos, metformina e estatinas		
7. Uso de laxantes		
11. Pacientes com sintomas claustrofobia		

Preenchido por : \_\_\_\_\_ Date: \_\_\_\_\_

Nº da visita  N de Identificação  Data:  /  /   
 Dia Mês Ano

### Termo de consentimento livre esclarecido(TCLE) obtido

Recusado

Data de assinatura :  /  /

Hora:  :

Outros documentos	Data	Data assinatura
Termo de consentimento livre e esclarecido		
Termo de assentimento livre e esclarecido		

O TCLE e Termo de assentimento foi lido e revisado com o paciente e/ou responsável ?

Sim  Não

O paciente e/ou responsável teve tempo suficiente para rever os documentos e esclarecer as dúvidas ?

Sim  Não

Esses termos foram apresentados , revisados e assinados previamente ao inicio da realização do estudo ?

Sim  Não

A Uma cópia dos termos supracitados foram entregues ao paciente e responsável ?

Sim  Não

Nome do responsável pela coleta dos documentos:

Commentários

### Recusou assinar os termos

Hora :  :

Não se aplica

Commentários

N° da visita

	0	1
--	---	---

N° de Identificação

--	--	--	--	--	--

Data:

--	--

Dia

--	--

Mês

--	--

Ano

### Presença de sintomas clínicos

Sinais e sintomas	Presença	Diagnóstico/Condução	Data início dos sintomas	Sintomas presentes
Cefaléia	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Náuseas	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Vômitos	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Dor abdominal	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Polaciúria	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Poliúria	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Nictúria	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Redução da acuidade visual	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Dores na coluna	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Dores articulares	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Deformidades ósseas	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Roncopatia	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Apnéia do sono	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Insônia	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Dispnéia aos esforços	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Outros : _____	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Outros : _____	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não

Notas adicionais : \_\_\_\_\_  História clínica não obtida

História clínica coletada por : \_\_\_\_\_

Nº da visita   N de Identificação        Data:   /   /    
 Dia Mês Ano

### Dados de hábitos e estilo de vida

		Observação		Documentos
Prática atividade Física	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Quantas vezes /semana ?	Respondeu o IPAQ ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Segue recomendação dietética ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Quantas vezes /semana ? _____ Se não : qual motivo ? <input type="checkbox"/> Não quero <input type="checkbox"/> Não gosto <input type="checkbox"/> Não consigo <input type="checkbox"/> Dificuldade de acesso aos alimentos saudáveis	Realizado recordatório alimentar de 24h ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Presença de sintomas de compulsão alimentar ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Qual alimento gatilho ? _____		
Faz refeições fora do domicílio com regularidade ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Quantas vezes /semana ? <input type="checkbox"/> 1-2 <input type="checkbox"/> 3-4 <input type="checkbox"/> >5 Quantas vezes/dia ? <input type="checkbox"/> 1-2 <input type="checkbox"/> 3-4 <input type="checkbox"/> >5		
Usa drogas ilícitas ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Quais ? _____ Qual freqüência ? <input type="checkbox"/> 1-2/semana <input type="checkbox"/> 3-4 <input type="checkbox"/> 5-6 <input type="checkbox"/> Diariamente <input type="checkbox"/> Esporadicamente		
Tabagismo	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Qual freqüência ? <input type="checkbox"/> 1-2/semana <input type="checkbox"/> 3-4 <input type="checkbox"/> 5-6 <input type="checkbox"/> Diariamente <input type="checkbox"/> Esporadicamente		
Etilismo	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Qual freqüência ? <input type="checkbox"/> 1-2/semana <input type="checkbox"/> 3-4 <input type="checkbox"/> 5-6 <input type="checkbox"/> Diariamente <input type="checkbox"/> Esporadicamente <input type="checkbox"/> Socialmente		<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não

**Notas adicionais :**

Pn: \_\_\_\_\_ Tipo de parto : ( ) Cesariano. ( . ) normal

Usou antibioticos nos primeiros 6 meses de vida. ( ) Sim. ( ) Não

Tempo de aleitamento materno exclusivo <1 mes ( ) \_\_\_\_\_ meses Tempo total de aleitamento materno \_\_\_\_\_

Pais. obesos ( . ) sim. ( . ) não ( . ) pai. ( . ) mãe Irmão obeso ( . ) sim. ( . ) não Quantos ? \_\_\_\_\_

Horas. de sono/dia : \_\_\_\_\_ . Mora com quem? \_\_\_\_\_

Dados obtidos por : \_\_\_\_\_

Nº da visita   N de Identificação       Data:   /   /    
 Dia Mês Ano

### Co- morbidades associadas e uso de medicações

		Observação	
Hipertensão arterial sistêmica	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Uso de medicações : <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não Qual ? _____	
Alterações articulares ou ortopédicas ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Uso de medicações : <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não Qual ? _____	
Apnéia do sono	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Uso de medicações ou aparelhos : <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não Qual ? _____	
Presença de Doença do Refluxo gastroesofágico ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Uso de medicações : <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não Qual(ais) ? _____	
Presença de Doença do péptica ( gastrite/ulcera) ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Uso de medicações : <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não Qual (ais)? _____	
Presença de constipação intestinal ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Uso de medicações : <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não Qual(ais) ? _____	Usar critérios ROMA IV
Presença de Diarréia nos últimos 30 dias ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Uso de medicações : <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não Qual(ais) ? _____	
Presença de atopia	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Rinite alérgica <input type="checkbox"/> Asma <input type="checkbox"/> Dermatite atópica	
Presença de alergia alimentar	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Quais alimentos ? _____	
Passou por internações no período?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Motivo ? _____ Data : ____/____/____	
Usou medicações nos últimos 30 dias ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Qual ( ais) ? _____ por quantos dias : _____ Data término: ____/____/____	Atentar para uso de antibióticos e corticóides
Passou por cirurgias no período?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Motivo ? _____ Data : ____/____/____	
Apresenta alergia à medicações ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Quais ? ? _____	
Apresentou algum transtorno psiquiátrico no período?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Motivo ? _____ Data : ____/____/____	

Notas adicionais : \_\_\_\_\_  Dados não obtidos  
 Dados obtidos por : \_\_\_\_\_

Nº da visita 

0	1
---	---

 N de Identificação 

--	--	--	--	--

 Data: 

--	--

 / 

--	--

 / 

--	--

  
Dia                  Mês                  Ano

### Exame Físico

Sinais e sintomas	Alteração	Descrição do achado
Estado geral	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Dados vitais	FC : ____ bpm FR : ____ ipm Sat O2 : ____ % TA: ____ / ____ mmHg	
Pele e fâneros	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Cavidade oral	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Orofaringe	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Tórax	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Ausculta respiratória	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Ausculta cardíaca	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Abdome	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Atentar a relação da hepatimetria
Genitália	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Estadiamento puberal Tanner : M ____ P ____ G ____
Deformidades ósseas	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Alterações articulares	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Alterações de coluna vertebral ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Descrever : _____
Edema	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Outros : _____	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Outros : _____	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	

Notas adicionais : \_\_\_\_\_  Exame físico não realizado

Exame físico realizado por : \_\_\_\_\_

N° da visita   N de Identificação         Data:   /   /    
 Dia Mês Ano

### Dados antropométricos

Peso :    Kg Estatura:    cm IMC:    kg/m<sup>2</sup>  
 Circunferência abdominal :   Cm Circunferência do braço:   cm  
 PCT :   mm PCSE :   mm

### Dados da Bioimpedância : ( Visita 1 e 4 )

Jejum de 2-4 horas ?  sim  Não

Massa Magra : \_\_\_\_\_ kg Massa gorda : \_\_\_\_\_ kg  
 % Gordura corporal : \_\_\_\_\_ % Relação cintura-quadil : \_\_\_\_\_ Agua corporal total  
 \_\_\_\_\_ % Impedância : \_\_\_\_\_ Reactância : \_\_\_\_\_  
 ângulo de fase : \_\_\_\_\_ Taxa metabólica basal : \_\_\_\_\_ Kcal

Notas adicionais : \_\_\_\_\_  História clínica não obtida

Exame realizado por : \_\_\_\_\_

N° da visita   N de Identificação       Data:   /   /

### Resultado de Exames laboratoriais ( Visita 2 e 5)

		<input type="checkbox"/> Não realizado	
Data :		Data :	
Jejum adequado para coleta ? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
Hematócrito	%	%	<input type="checkbox"/> Não realizado <input type="checkbox"/> Resultado pendente
Hemoglobina	g/dl	g/dl	<input type="checkbox"/> Não realizado <input type="checkbox"/> Resultado pendente
Colesterol Total	mg/dl	mg/dl	<input type="checkbox"/> Não realizado <input type="checkbox"/> Resultado pendente
Triglicérides	mg/dl	mg/dl	<input type="checkbox"/> Não realizado <input type="checkbox"/> Resultado pendente
HDL	mg/dl	mg/dl	<input type="checkbox"/> Não realizado <input type="checkbox"/> Resultado pendente
LDL	mg/dl	mg/dl	<input type="checkbox"/> Não realizado <input type="checkbox"/> Resultado pendente
VLDL	mg/dl	mg/dl	<input type="checkbox"/> Não realizado <input type="checkbox"/> Resultado pendente
Glicemia	mg/dl	mg/dl	<input type="checkbox"/> Não realizado <input type="checkbox"/> Resultado pendente
Insulina	mU/ml	mU/ml	<input type="checkbox"/> Não realizado <input type="checkbox"/> Resultado pendente
Uréia	mg/dl	mg/dl	<input type="checkbox"/> Não realizado <input type="checkbox"/> Resultado pendente
Creatinina	mg/dl	mg/dl	<input type="checkbox"/> Não realizado <input type="checkbox"/> Resultado pendente
Homa IR			<input type="checkbox"/> Não realizado <input type="checkbox"/> Resultado pendente
Proteínas totais	g/dl	g/dl	<input type="checkbox"/> Não realizado <input type="checkbox"/> Resultado pendente
Albumina	g/dl	g/dl	<input type="checkbox"/> Não realizado <input type="checkbox"/> Resultado pendente
PCR ultrasensível	mg/dl	mg/dl	<input type="checkbox"/> Não realizado <input type="checkbox"/> Resultado pendente
TGO	U/l	U/l	<input type="checkbox"/> Não realizado <input type="checkbox"/> Resultado pendente
TGP	U/l	U/l	<input type="checkbox"/> Não realizado <input type="checkbox"/> Resultado pendente
GGT	U/l	U/l	<input type="checkbox"/> Não realizado <input type="checkbox"/> Resultado pendente
Fosfatase alcalina	U/l	U/l	<input type="checkbox"/> Não realizado <input type="checkbox"/>



			Resultado pendente <input type="checkbox"/> Não realizado <input type="checkbox"/>
Bilirrubinas totais	mg/dl		Resultado pendente
Bilirrubina direta	mg/dl		<input type="checkbox"/> Não realizado <input type="checkbox"/> Resultado pendente
Bilirrubina Indireta	mg/dl		<input type="checkbox"/> Não realizado <input type="checkbox"/> Resultado pendente
T4 livre			
TSH			
HO-1	pg/ml		<input type="checkbox"/> Não realizado <input type="checkbox"/> Resultado pendente
TGFβ	pg/ml		<input type="checkbox"/> Não realizado <input type="checkbox"/> Resultado pendente
Adiponectina	Mcg/ml		<input type="checkbox"/> Não realizado <input type="checkbox"/> Resultado pendente
25,OH vitamina D	ng/ml		<input type="checkbox"/> Não realizado <input type="checkbox"/> Resultado pendente

Dados registrados por : \_\_\_\_\_

N° da visita   0  1 N de Identificação       Data:   /   /

### Ressonância magnética de abdome ( visita 1 e 4 )

#### Quantificação de gordura hepática

Data	Valor de PDFF(%)	Classificação
<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	_____ %	<input type="checkbox"/> Não realizado <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3
<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	_____ %	<input type="checkbox"/> Não realizado <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3

0-ausente (< 5,1%), 1- leve (> 5,1 %), 2-moderada (> 14,1%) e 3- centuada (> 28,0%).

#### Avaliação de grau de Fibrose hepática ( Elastografia )

Data	Valor de KPa	Classificação
<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	_____ KPa	<input type="checkbox"/> Não realizado <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5
<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	_____ KPa	<input type="checkbox"/> Não realizado <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5

0- <2,5 KPa: Normal ; 1- 2,5-2,9 KPa : Normal ou inflamado 2- 2,9-3,5KPa: Estágio 1 a 2 de fibrose; 3- 3,5-4 KPa: Estágio 2 a 3 de fibrose ;4- 4-5KPa: Estágio 3 a 4 de fibrose e 5- >5 KPa: Estágio 4 de fibrose ou cirrose

Dados obtidos por : \_\_\_\_\_

N° da visita

0	2
---	---

N° de Identificação

--	--	--	--	--

Data:

--	--

Dia

--	--

Mês

--	--

Ano

### Presença de sintomas clínicos

Sinais e sintomas	Presença	Diagnóstico/Condução	Data início dos sintomas	Sintomas presentes
Cefaléia	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Náuseas	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Vômitos	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Dor abdominal	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Polaciúria	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Poliúria	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Nictúria	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Redução da acuidade visual	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Dores na coluna	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Dores articulares	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Deformidades ósseas	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Roncopatia	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Apnéia do sono	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Insônia	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Dispnéia aos esforços	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Outros : _____	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Outros : _____	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não

Notas adicionais : \_\_\_\_\_  História clínica não obtida

História clínica coletada por : \_\_\_\_\_

Nº da visita   N de Identificação       Data:   /   /    
 Dia Mês Ano

### Dados de hábitos e estilo de vida

		Observação		Documentos
Prática atividade Física	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Quantas vezes /semana ?	Respondeu o IPAQ ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Segue recomendação dietética ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Quantas vezes /semana ? _____ Se não : qual motivo ? <input type="checkbox"/> Não quero <input type="checkbox"/> Não gosto <input type="checkbox"/> Não consigo <input type="checkbox"/> Dificuldade de acesso aos alimentos saudáveis	Realizado recordatório alimentar de 24h ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Presença de sintomas de compulsão alimentar ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Qual alimento gatilho ? _____		
Faz refeições fora do domicílio com regularidade ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Quantas vezes /semana ? <input type="checkbox"/> 1-2 <input type="checkbox"/> 3-4 <input type="checkbox"/> >5 Quantas vezes/dia ? <input type="checkbox"/> 1-2 <input type="checkbox"/> 3-4 <input type="checkbox"/> >5		
Usa drogas ilícitas ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Quais ? _____ Qual frequência ? <input type="checkbox"/> 1-2/semana <input type="checkbox"/> 3-4 <input type="checkbox"/> 5-6 <input type="checkbox"/> Diariamente <input type="checkbox"/> Esporadicamente		
Tabagismo	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Qual frequência ? <input type="checkbox"/> 1-2/semana <input type="checkbox"/> 3-4 <input type="checkbox"/> 5-6 <input type="checkbox"/> Diariamente <input type="checkbox"/> Esporadicamente		
Etilismo	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Qual frequência ? <input type="checkbox"/> 1-2/semana <input type="checkbox"/> 3-4 <input type="checkbox"/> 5-6 <input type="checkbox"/> Diariamente <input type="checkbox"/> Esporadicamente <input type="checkbox"/> Socialmente		<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não

Notas adicionais : \_\_\_\_\_

Dados obtidos por : \_\_\_\_\_

Nº da visita

0	2
---	---

N de Identificação

--	--	--	--	--	--

Data:

--	--

Dia

--	--

Mês

--	--

Ano

**Co-morbidades associadas e uso de medicações**

		Observação	
Hipertensão arterial sistêmica	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Uso de medicações : <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não Qual ? _____	
Alterações articulares ou ortopédicas ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Uso de medicações : <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não Qual ? _____	
Apnéia do sono	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Uso de medicações ou aparelhos : <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não Qual ? _____	
Presença de Doença do Refluxo gastroesofágico ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Uso de medicações : <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não Qual(ais) ? _____	
Presença de Doença do péptica ( gastrite/ulcera) ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Uso de medicações : <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não Qual (ais)? _____	
Presença de constipação intestinal ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Uso de medicações : <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não Qual(ais) ? _____	Usar critérios ROMA IV
Presença de Diarréia nos últimos 30 dias ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Uso de medicações : <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não Qual(ais) ? _____	
Presença de atopia	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Rinite alérgica <input type="checkbox"/> Asma <input type="checkbox"/> Dermatite atópica	
Presença de alergia alimentar	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Quais alimentos ? _____	
Passou por internações no período?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Motivo ? _____ Data : ____/____/____	
Usou medicações nos últimos 30 dias ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Qual ( ais ) ? _____ por quantos dias : _____ Data término: ____/____/____	Atentar para uso de antibióticos e corticóides
Passou por cirurgias no período?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Motivo ? _____ Data : ____/____/____	
Apresenta alergia à medicações ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Quais ? ? _____	
Apresentou algum transtorno psiquiátrico no período?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Motivo ? _____ Data : ____/____/____	

Notas adicionais :

Dados obtidos por :

Dados não obtidos

Nº da visita   N de Identificação         Data:   /   /    
 Dia Mês Ano

### Exame Físico

Sinais e sintomas	Alteração	Descrição do achado
Estado geral	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Dados vitais	FC: ____bpm FR: ____ipm Sat O2: ____% TA: ____/____mmHg	
Pele e fâneros	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Cavidade oral	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Orofaringe	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Tórax	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Ausulta respiratória	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Ausulta cardíaca	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Abdome	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Atentar a relaização da hepatimetria
Genitália	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Estadiamento puberal Tanner : M ____ P ____ G ____
Deformidades ósseas	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Alterações articulares	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Alterações de coluna vertebral ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Descrever : _____
Edema	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Outros : _____	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Outros : _____	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	

Notas adicionais : \_\_\_\_\_  Exame físico não realizado

Exame físico realizado por : \_\_\_\_\_

Nº da visita   N de Identificação       Data:   /   /    
 Dia Mês Ano

### Dados antropométricos

Peso :    Kg Estatura:    cm IMC:    kg/m<sup>2</sup>

Circunferência abdominal :   Cm Circunferência do braço:   cm

PCT :   mm PCSE :   mm

### Dados da Bioimpedância : ( Visita 2 )

Jejum de 2-4 horas ?  sim  Não

Massa Magra : \_\_\_\_\_ kg Massa gorda : \_\_\_\_\_ kg

% Gordura corporal : \_\_\_\_\_% Relação cintura-quadril : \_\_\_\_\_ Agua corporal total  
 \_\_\_\_\_%

Impedância : \_\_\_\_\_ Reactância : \_\_\_\_\_

ângulo de fase : \_\_\_\_\_ Taxa metabólica basal : \_\_\_\_\_ Kcal

Notas adicionais : \_\_\_\_\_  História clínica não obtida

Exame realizado por : \_\_\_\_\_

N° da visita

0	3
---	---

N° de Identificação

--	--	--	--	--	--

Data:

--	--

Dia

--	--

Mês

--	--

Ano

### Presença de sintomas clínicos

Sinais e sintomas	Presença	Diagnóstico/Condução	Data início dos sintomas	Sintomas presentes
Cefaléia	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Náuseas	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Vômitos	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Dor abdominal	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Polaciúria	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Poliúria	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Nictúria	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Redução da acuidade visual	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Dores na coluna	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Dores articulares	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Deformidades ósseas	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Roncopatia	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Apnéia do sono	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Insônia	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Dispnéia aos esforços	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Outros : _____	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Outros : _____	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não

Notas adicionais : \_\_\_\_\_  História clínica não obtida

História clínica coletada por : \_\_\_\_\_



Nº da visita   N de Identificação       Data:   /   /    
 Dia Mês Ano

### Dados de hábitos e estilo de vida

		Observação		Documentos
Prática atividade Física	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Quantas vezes /semana ?	Respondeu o IPAQ ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Segue recomendação dietética ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Quantas vezes /semana ? _____ Se não : qual motivo ? <input type="checkbox"/> Não quero <input type="checkbox"/> Não gosto <input type="checkbox"/> Não consigo <input type="checkbox"/> Dificuldade de acesso aos alimentos saudáveis	Realizado recordatório alimentar de 24h ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Presença de sintomas de compulsão alimentar ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Qual alimento gatilho ? _____		
Faz refeições fora do domicílio com regularidade ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Quantas vezes /semana ? <input type="checkbox"/> 1-2 <input type="checkbox"/> 3-4 <input type="checkbox"/> >5 Quantas vezes/dia ? <input type="checkbox"/> 1-2 <input type="checkbox"/> 3-4 <input type="checkbox"/> >5		
Usa drogas ilícitas ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Quais ? _____ Qual freqüência ? <input type="checkbox"/> 1-2/semana <input type="checkbox"/> 3-4 <input type="checkbox"/> 5-6 <input type="checkbox"/> Diariamente <input type="checkbox"/> Esporadicamente		
Tabagismo	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Qual freqüência ? <input type="checkbox"/> 1-2/semana <input type="checkbox"/> 3-4 <input type="checkbox"/> 5-6 <input type="checkbox"/> Diariamente <input type="checkbox"/> Esporadicamente		
Etilismo	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Qual freqüência ? <input type="checkbox"/> 1-2/semana <input type="checkbox"/> 3-4 <input type="checkbox"/> 5-6 <input type="checkbox"/> Diariamente <input type="checkbox"/> Esporadicamente <input type="checkbox"/> Socialmente		<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não

Notas adicionais : \_\_\_\_\_  
 Dados obtidos por : \_\_\_\_\_

Nº da visita   N de Identificação       Data:   /   /    
 Dia Mês Ano

### Co- morbidades associadas e uso de medicações

		Observação		
Hipertensão arterial sistêmica	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Uso de medicações : <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não Qual ? _____		
Alterações articulares ou ortopédicas ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Uso de medicações : <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não Qual ? _____		
Apnéia do sono	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Uso de medicações ou aparelhos : <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não Qual ? _____		
Presença de Doença do Refluxo gastroesofágico ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Uso de medicações : <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não Qual(ais) ? _____		
Presença de Doença do péptica ( gastrite/ulcera ) ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Uso de medicações : <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não Qual (ais)? _____		
Presença de constipação intestinal ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Uso de medicações : <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não Qual(ais) ? _____	Usar critérios ROMA IV	
Presença de Diarréia nos últimos 30 dias ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Uso de medicações : <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não Qual(ais) ? _____		
Presença de atopia	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Rinite alérgica <input type="checkbox"/> Asma <input type="checkbox"/> Dermatite atópica		
Presença de alergia alimentar	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Quais alimentos ? _____		
Passou por internações no período?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Motivo ? _____ Data : ____/____/____		
Usou medicações nos últimos 30 dias ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Qual ( ais ) ? _____ por quantos dias : _____ Data término: ____/____/____	Atentar para uso de antibióticos e corticóides	
Passou por cirurgias no período?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Motivo ? _____ Data : ____/____/____		
Apresenta alergia à medicações ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Quais ? ? _____		
Apresentou algum transtorno psiquiátrico no período?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Motivo ? _____ Data : ____/____/____		

Notas adicionais : \_\_\_\_\_  Dados não obtidos  
 Dados obtidos por : \_\_\_\_\_

Nº da visita   N de Identificação       Data:   /   /    
 Dia Mês Ano

### Exame Físico

Sinais e sintomas	Alteração	Descrição do achado
Estado geral	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Dados vitais	FC : ____ bpm FR : ____ ipm Sat O2 : ____ % TA: ____ / ____ mmHg	
Pele e fâneros	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Cavidade oral	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Orofaringe	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Tórax	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Ausculat respiratória	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Ausculat cardíaca	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Abdome	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Atentar a relaização da hepatimetria
Genitália	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Estadiamento puberal Tanner : M ____ P ____ G ____
Deformidades ósseas	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Alterações articulares	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Alterações de coluna vertebral ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Descrever : _____
Edema	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Outros : _____	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Outros : _____	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	

Notas adicionais : \_\_\_\_\_  Exame físico não realizado

Exame físico realizado por : \_\_\_\_\_

Nº da visita   N de Identificação         Data:   /   /    
 Dia Mês Ano

### Dados antropométricos

Peso :    Kg    Estatura:    cm    IMC:    kg/m<sup>2</sup>  
 Circunferência abdominal :   Cm    Circunferência do braço:   cm  
 PCT :   mm    PCSE :   mm

### Dados da Bioimpedância : ( Visita 3 )

Jejum de 2-4 horas ?  sim  Não

Massa Magra : \_\_\_\_\_ kg    Massa gorda : \_\_\_\_\_ kg  
 % Gordura corporal : \_\_\_\_\_%    Relação cintura-quadri : \_\_\_\_\_    Agua corporal total  
 \_\_\_\_\_%    Impedância : \_\_\_\_\_    Reactância : \_\_\_\_\_  
 ângulo de fase : \_\_\_\_\_    Taxa metabólica basal : \_\_\_\_\_ Kcal

Notas adicionais : \_\_\_\_\_  História clínica não obtida

Exame realizado por : \_\_\_\_\_



Nº da visita   N de Identificação         Data:   /   /    
 Dia Mês Ano

### Dados de hábitos e estilo de vida

		Observação		Documentos
Prática atividade Física	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Quantas vezes /semana ?	Respondeu o IPAQ ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Segue recomendação dietética ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Quantas vezes /semana ? _____ Se não : qual motivo ? <input type="checkbox"/> Não quero <input type="checkbox"/> Não gosto <input type="checkbox"/> Não consigo <input type="checkbox"/> Dificuldade de acesso aos alimentos saudáveis	Realizado recordatório alimentar de 24h ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não
Presença de sintomas de compulsão alimentar ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Qual alimento gatilho ? _____		
Faz refeições fora do domicílio com regularidade ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Quantas vezes /semana ? <input type="checkbox"/> 1-2 <input type="checkbox"/> 3-4 <input type="checkbox"/> >5 Quantas vezes/dia ? <input type="checkbox"/> 1-2 <input type="checkbox"/> 3-4 <input type="checkbox"/> >5		
Usa drogas ilícitas ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Quais ? _____ Qual freqüência ? <input type="checkbox"/> 1-2/semana <input type="checkbox"/> 3-4 <input type="checkbox"/> 5-6 <input type="checkbox"/> Diariamente <input type="checkbox"/> Esporadicamente		
Tabagismo	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Qual freqüência ? <input type="checkbox"/> 1-2/semana <input type="checkbox"/> 3-4 <input type="checkbox"/> 5-6 <input type="checkbox"/> Diariamente <input type="checkbox"/> Esporadicamente		
Etilismo	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Qual freqüência ? <input type="checkbox"/> 1-2/semana <input type="checkbox"/> 3-4 <input type="checkbox"/> 5-6 <input type="checkbox"/> Diariamente <input type="checkbox"/> Esporadicamente <input type="checkbox"/> Socialmente		<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não

Notas adicionais : \_\_\_\_\_

Dados obtidos por : \_\_\_\_\_

Nº da visita   N de Identificação       Data:   /   /    
 Dia Mês Ano

### Co- morbidades associadas e uso de medicações

		Observação	
Hipertensão arterial sistêmica	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Uso de medicações : <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não Qual ? _____	
Alterações articulares ou ortopédicas ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Uso de medicações : <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não Qual ? _____	
Apnéia do sono	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Uso de medicações ou aparelhos : <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não Qual ? _____	
Presença de Doença do Refluxo gastroesofágico ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Uso de medicações : <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não Qual(ais) ? _____	
Presença de Doença do péptica ( gastrite/ulcera ) ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Uso de medicações : <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não Qual (ais)? _____	
Presença de constipação intestinal ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Uso de medicações : <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não Qual(ais) ? _____	Usar critérios ROMA IV
Presença de Diarréia nos últimos 30 dias ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Uso de medicações : <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não Qual(ais) ? _____	
Presença de atopia	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Rinite alérgica <input type="checkbox"/> Asma <input type="checkbox"/> Dermatite atópica	
Presença de alergia alimentar	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Quais alimentos ? _____	
Passou por internações no período?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Motivo ? _____ Data : ____/____/____	
Usou medicações nos últimos 30 dias ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Qual ( ais ) ? _____ por quantos dias : _____ Data término: ____/____/____	Atentar para uso de antibióticos e corticóides
Passou por cirurgias no período?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Motivo ? _____ Data : ____/____/____	
Apresenta alergia à medicações ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Quais ? ? _____	
Apresentou algum transtorno psiquiátrico no período?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Motivo ? _____ Data : ____/____/____	

Notas adicionais : \_\_\_\_\_  Dados não obtidos  
 Dados obtidos por : \_\_\_\_\_

N° da visita

0	4
---	---

N de Identificação

--	--	--	--	--	--

Data:

		/			/		
Dia			Mês			Ano	

### Exame Físico

Sinais e sintomas	Alteração	Descrição do achado
Estado geral	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Dados vitais	FC : ____ bpm FR : ____ ipm Sat O2 : ____ % TA : ____ / ____ mmHg	
Pele e fâneros	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Cavidade oral	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Orofaringe	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Tórax	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Ausculta respiratória	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Ausculta cardíaca	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Abdome	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Atentar a relaização da hepatimetria
Genitália	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Estadiamento puberal Tanner : M ____ P ____ G ____
Deformidades ósseas	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Alterações articulares	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Alterações de coluna vertebral ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	Descrever : _____
Edema	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Outros : _____	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
Outros : _____	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	

Notas adicionais : \_\_\_\_\_  Exame físico não realizado

Exame físico realizado por : \_\_\_\_\_



N° da visita   N de Identificação       Data:   /   /    
 Dia Mês Ano

### Dados antropométricos

Peso :    Kg Estatura:    cm IMC:    kg/m<sup>2</sup>

Circunferência abdominal :   Cm Circunferência do braço:   cm

PCT :   mm PCSE :   mm

### Dados da Bioimpedância : ( Visita 4 )

Jejum de 2-4 horas ?  sim  Não

Massa Magra : \_\_\_\_\_ kg Massa gorda : \_\_\_\_\_ kg

% Gordura corporal : \_\_\_\_\_ % Relação cintura-quadril : \_\_\_\_\_ Agua corporal total

\_\_\_\_\_ % Impedância : \_\_\_\_\_ Reactância : \_\_\_\_\_

ângulo de fase : \_\_\_\_\_ Taxa metabólica basal : \_\_\_\_\_ Kcal

Notas adicionais : \_\_\_\_\_  História clínica não obtida

Exame realizado por : \_\_\_\_\_

Nº da visita    N de Identificação       Data:   /   /

**Controle do uso do probiótico :**

Recebimento				Uso							
Data recebimento do quantitativo mensal	Tipo de apresentação (capsulas/saches)	Código do rótulo	Recebido por : nome do responsável	Data prevista de início do uso	Número ID no estudo	Dispensado por nome de quem entregou	Retorno do uso Usou : U Perdas : P Uso irregular : UI	Data final do uso	Motivos	Dados obtidos por : Por nome de quem colheu informações	Comentários

Dados obtidos por : \_\_\_\_\_

Nº da visita    N de Identificação       Data:  /  /

### Dispensação do probiótico & Registro de responsabilização

ID do paciente	Visita N°	Código do rótulo	Dose em g/dia	Dispensação				Retorno				Conformidade		
				Quantidade de sachês dispensadas	Número de frascos ou caixas dispensados	Data da dispensação	Responsável pela dispensação	Quantidade de cápsulas retornadas	Número de frascos ou caixas retornados	Data do retorno	Responsável pela verificação	Número esperado de unidades a serem usadas	Número usado pelo paciente	% de conformidade

\* Cálculo de % de conformidade = Real realizado / Estimado para ser tomado

Dados obtidos por : \_\_\_\_\_

Data da versão: 16/07/2018

Página 28 de 38

Nº da visita    N de Identificação       Data:  /  /

### Controle de realização de exames laboratoriais

Data agendamento	ID paciente	Data de coleta	visita	Coleta completa	Pendência	Citar pendências	Plano de resolução
/ / Dia mês ano Hora : __: __		/ / Dia mês ano Hora : __: __	<input type="checkbox"/> Visita 1 - <input type="checkbox"/> Visita 2 - <input type="checkbox"/> Visita 3 - <input type="checkbox"/> Visita 4 - <input type="checkbox"/> Visita 5 -	/ / Dia mês ano Hora : __: __	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		
/ / Dia mês ano Hora : __: __		/ / Dia mês ano Hora : __: __	<input type="checkbox"/> Visita 1 - <input type="checkbox"/> Visita 2 - <input type="checkbox"/> Visita 3 - <input type="checkbox"/> Visita 4 - <input type="checkbox"/> Visita 5 -	/ / Dia mês ano Hora : __: __	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		
/ / Dia mês ano Hora : __: __		/ / Dia mês ano Hora : __: __	<input type="checkbox"/> Visita 1 - <input type="checkbox"/> Visita 2 - <input type="checkbox"/> Visita 3 - <input type="checkbox"/> Visita 4 - <input type="checkbox"/> Visita 5 -	/ / Dia mês ano Hora : __: __	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		

Dados obtidos por : \_\_\_\_\_

Data da versão: 16/07/2018

Página 29 de 38

Nº da visita    N de Identificação:       Data:   /   /

**Controle de realização da ressonância**

Data agendamento	ID paciente	Data do exame	visita	Pendência	Citar pendências	Plano de resolução
/ / Dia mês ano Hora : __:__		/ / Dia mês ano Hora : __:__	<input type="checkbox"/> Visita 1 - <input type="checkbox"/> Visita 2 - <input type="checkbox"/> Visita 3 - <input type="checkbox"/> Visita 4 - <input type="checkbox"/> Visita 5 -	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		
/ / Dia mês ano Hora : __:__		/ / Dia mês ano Hora : __:__	<input type="checkbox"/> Visita 1 - <input type="checkbox"/> Visita 2 - <input type="checkbox"/> Visita 3 - <input type="checkbox"/> Visita 4 - <input type="checkbox"/> Visita 5 -	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		
/ / Dia mês ano Hora : __:__		/ / Dia mês ano Hora : __:__	<input type="checkbox"/> Visita 1 - <input type="checkbox"/> Visita 2 - <input type="checkbox"/> Visita 3 - <input type="checkbox"/> Visita 4 - <input type="checkbox"/> Visita 5 -	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		

Dados obtidos por : \_\_\_\_\_

Nº da visita    N de Identificação       Data:   /   /

**Inventário / Rastreamento de amostra de pesquisa**

Local de estocagem (Endereço): \_\_\_\_\_  
 Número do Freezer : \_\_\_\_\_ Número da prateleira \_\_\_\_\_

Data preenchimento	ID paciente	Data de coleta	Número da visita	Data de estocagem	Quantidade (ml)	Tipo S: sangue So: Soro P: Plasma	Data de remoção	Destino da amostra
			<input type="checkbox"/> Visita 1 - <input type="checkbox"/> Visita 2 - <input type="checkbox"/> Visita 3 - <input type="checkbox"/> Visita 4 - <input type="checkbox"/> Visita 5 -	/ / Dia mês ano Hora : __:__			/ / Dia mês ano Hora : __:__	<input type="checkbox"/> Enviada para : _____ <input type="checkbox"/> Analisada <input type="checkbox"/> Perdida <input type="checkbox"/> Outros: _____
			<input type="checkbox"/> Visita 1 - <input type="checkbox"/> Visita 2 - <input type="checkbox"/> Visita 3 - <input type="checkbox"/> Visita 4 - <input type="checkbox"/> Visita 5 -	/ / Dia mês ano Hora : __:__			/ / Dia mês ano Hora : __:__	<input type="checkbox"/> Enviada para : _____ <input type="checkbox"/> Analisada <input type="checkbox"/> Perdida <input type="checkbox"/> Outros: _____
			<input type="checkbox"/> Visita 1 - <input type="checkbox"/> Visita 2 - <input type="checkbox"/> Visita 3 - <input type="checkbox"/> Visita 4 - <input type="checkbox"/> Visita 5 -	/ / Dia mês ano Hora : __:__			/ / Dia mês ano Hora : __:__	<input type="checkbox"/> Enviada para : _____ <input type="checkbox"/> Analisada <input type="checkbox"/> Perdida <input type="checkbox"/> Outros: _____

Dados obtidos por : \_\_\_\_\_

Subject Initials    Subject ID       Date:  /  /

### Reações adversas (RA)

N° RA	Data	Descrição do sintoma	Categoria	Data de Início	Data Final	Em melhora?	desfecho	Grau de severidade	Reação esperada?	Tratamento	Condição atual
1						<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não		
						<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
						<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
						<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	
						<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> Não	

Dados obtidos por : \_\_\_\_\_

**Desfecho**  
 0 – Fatal  
 2 – Recuperado com sequelas  
 3 – Recuperado sem sequelas  
 4 – Recuperando/resolvendo

**Grau de Severidade**  
 1 – Leve  
 3 – Grave  
 4 Risco de óbito  
 5 – óbito

Data da versão: 16/07/2018

Página 32 de 38

### Contato telefônico

Não realizado

	Date of Contact Attempt			Hora	Contact Occurred	Motivo do contato	Outcome
	Dia	Mês	Ano (YYYY)				
Contato 1				____:____h	<input type="checkbox"/> <sup>1</sup> Yes <input type="checkbox"/> <sup>0</sup> No		<input type="checkbox"/> Não atende <input type="checkbox"/> Caixa de voz <input type="checkbox"/> Número inexistente <input type="checkbox"/> Linha ocupada <input type="checkbox"/> Outros: _____
Contato 2				____:____h	<input type="checkbox"/> <sup>1</sup> Yes <input type="checkbox"/> <sup>0</sup> No		<input type="checkbox"/> Não atende <input type="checkbox"/> Caixa de voz <input type="checkbox"/> Número inexistente <input type="checkbox"/> Linha ocupada <input type="checkbox"/> Outros: _____
Contato 3				____:____h	<input type="checkbox"/> <sup>1</sup> Yes <input type="checkbox"/> <sup>0</sup> No		<input type="checkbox"/> Não atende <input type="checkbox"/> Caixa de voz <input type="checkbox"/> Número inexistente <input type="checkbox"/> Linha ocupada <input type="checkbox"/> Outros: _____
Contato 4				____:____h	<input type="checkbox"/> <sup>1</sup> Yes <input type="checkbox"/> <sup>0</sup> No		<input type="checkbox"/> Não atende <input type="checkbox"/> Caixa de voz <input type="checkbox"/> Número inexistente <input type="checkbox"/> Linha ocupada <input type="checkbox"/> Outros: _____

Data da versão: 16/07/2018

Página 33 de 38

### Check list de visita 1

RESPONDA		
TCLE assinado		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Entregue solicitação com agendamento d e coleta de exams laboratoriais		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Entregue solicitação e data de agendamento da Ressonância de abdomen?		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Realizado atualização de contatos telefônicos e endereço?		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Realizado antropometria e bioimpedância ?		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Entregue quantitaivo mensal de probióticos para uso?		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Realizou agendamnto da proxima consulta médica?		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Respondido IPAQ-c?		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Realizado recordatório alimentar de 24h ?		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não

**COMMENTÁRIOS:**

---



---



---



---



---



---



---



---

**Dados obtidos por :** \_\_\_\_\_

<b>Check list de visita 2</b>
-------------------------------

<b>RESPONDA</b>		
Checou quantidade de probióticos que usou ?		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Preencheu formulário de reação adversas?		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Registrou resultado de solicitados na visita 1?		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Respondido IPAQ-c?		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Realizado recordatório alimentar de 2h ?		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Investigou a presença de reações adversas ?		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não

COMMENTÁRIOS:

---



---



---



---



---



---



---



---

Dados obtidos por : \_\_\_\_\_

### Checklist de visita 3

RESPONDA		
Entregue solicitação com agendamento de coleta de exames laboratoriais?		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Entregue solicitação e data de agendamento da Ressonância de abdômen?		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Realizado atualização de contatos telefônicos e endereço?		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Realizado antropometria e bioimpedância ?		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Entregue quantitativo mensal de probióticos para uso?		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Realizou agendamento da próxima consulta médica?		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Respondido IPAQ-c?		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Realizado recordatório alimentar de 24h ?		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não

**COMMENTÁRIOS:**

---



---



---



---



---



---



---



---

**Dados obtidos por :** \_\_\_\_\_



<b>Checklist de visita 4</b>
------------------------------

<b>RESPONDA</b>		
Checou quantidade de probióticos usou ?		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Preencheu formulario de reações adversas?		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Registrou resultado de exames solicitados na visita 3?		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Respondido IPAQ-c?		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Realizado recordatório alimentar de 24h ?		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Investigou a presença de reações adversas ?		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não

## COMMENTÁRIOS:

---



---



---



---



---



---



---



---

Dados obtidos por : \_\_\_\_\_

## Dados a arquivar

Registrado por : \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_

### Descrição de evento ou problema :

Descrição do problema / processo / problema que está sendo documentado, incluindo (se aplicável) como, quando e por quem o problema foi identificado, causa do problema (se conhecido), ações corretivas e preventivas tomadas (quando e por quem).

---



---



---



---



---



---



---

### Descrição dos formulários / documentos relacionados (se aplicável):

---



---

\_\_\_\_\_  
Assinatura do autor

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador

\_\_\_\_\_  
Data

#### *Nota para arquivar orientação:*

*As notas do arquivo de estudo são escritas para reconhecer uma discrepância ou problema com a conduta do estudo ou para outros fins administrativos (como documentar onde os materiais de estudo são armazenados). As notas do arquivo de estudo devem ser escritas pelo indivíduo responsável pelo seu conteúdo, e o autor deve assinar e datar a nota. Se a Nota para o Arquivo do Estudo se referir a um item pelo qual o PI é responsável (proteção do sujeito, integridade dos dados, etc.), o PI deve assinar e datar a nota para reconhecer sua conscientização sobre o assunto. As notas do arquivo de estudo devem ser mantidas em arquivo nos registros do estudo e disponibilizadas para o estudo de monitores ou auditores que revisam os documentos e procedimentos do site.*

## Apêndice F - Orientação alimentar para crianças ( pré-púbere )

### Sugestão de cardápio

REFEIÇÃO	ALIMENTO	MEDIDA CASEIRA	ALIMENTOS PARA SUBSTITUIÇÃO
Café da Manhã Batata doce com ovo mexido, Café com Leite e fruta	Batata Doce	2 fatias médias (espessura de 2 dedos OU 1 unidade pequena)	<p><b>Sugestão Café da Manhã 2: Sanduíche, Leite com cacau em pó e fruta.</b> Sanduíche: 2 fatias de pão integral (ver no rótulo se o primeiro ingrediente é farinha de trigo integral) 1 fatia média de tomate 1 col. café de orégano 1 fatia de queijo <i>minas frescal</i> 1 copo de 200 ml de leite líquido+ 1 ½ col. de sopa de cacau em pó 1 fatia pequena de mamão</p> <p><b>Sugestão Café da Manhã 3: Aipim com patê de sardinha, café com leite e fruta</b> 3 pedaços médios de aipim (cubos de 3 dedos aprox.) Patê: 2 col. sopa de sardinha (sem o óleo)+ 1 col. chá de milho verde+ 1 col. sopa de iogurte Natural+ 1 col. café de orégano) Obs: se desejar, fazer este patê em maiores quantidades e armazenar na geladeira por 1 semana e servir.) 1 copo de Suco de Goiaba (adoçar separadamente- sugestão: 1 col. de chá de açúcar) 1 fatia pequena de melão.</p> <p>Outras sugestões: Banana da terra, inhame, crepioca, aveiça/ ricota temperada com orégano e azeite de oliva extravirgem, frango desfiado, carne moída desfiada/ Frutas com aveia, semente de linhaça e chia.</p> <p>Observações:</p>
	Ovo mexido (Se desejar, adicionar orégano ou açafraão) - utilizar 1 col. de chá rasa de azeite extra virgem ou em frigideira antiaderente. <b>*Nunca utilizar margarina</b>	1 unidade	
	Leite líquido	1 Xicara média	
	Melancia	1 fatia pequena	
Lanche da manhã/ Lanche da tarde Vitamina de fruta	Leite líquido Semi-desnatado	1 copo de 200ml	<p><b>Sugestão de Lanches: Iogurte Natural+ fruta+ oleaginosas</b> 1 pote Iogurte Natural 2 ameixas pretas secas 4 unidades de castanha de caju torrada sem sal</p> <p><b>Sugestão de Lanches: Sanduíche caprichado com suco da fruta</b> 2 fatias de pão integral 1 fatia de ricota+ 1 ovo cozido 1 fatia de tomate+ 1 folha média de alface 1 copo de suco da fruta (adoçar separadamente- sugestão: 1 col. de chá de açúcar)</p> <p><b>Sugestão de Lanches: Mix de frutas saboroso</b> Frutas cortadas em cubos (manga, banana, morango, kiwi, mamão, uva)- 1 copo de 200ml + 1 col. sopa de leite em pó+ 3 castanhas do Pará OU 1 col. chá de amendoim torrado.</p>
	Banana Farelo de Aveia	1 unidade média 2 col. sopa	

			<p><b>Sugestão de Lanches: Pipoca+ Leite com cacau</b> 1 vasilha média de pipoca (sugestão- fazer no microondas (colocar o milho numa vasilha tampada por 2min)- EVITAR ADICIONAR MANTEIGA, CHOCOLATE, COCO dentre outros.) 1 copo de 200 ml de leite semi desnatado+ 1 ½ col. Sopa de cacau em pó</p> <p><b>Sugestão de Lanches: Bolinha Nutritivo e saboroso</b> 4 unidades + 1 copo de suco da fruta (adoçar separadamente- sugestão: 1 col. de chá de açúcar) + 1 maçã pequena.</p> <p><b>Sugestão de preparo do bolinho: cozinhar batata inglesa + aipim → amassar e temperar com um pouco de sal+ especiarias+ azeite+ tempero verde+ aveia em flocos → abrir uma quantidade da massa nas mãos e rechear com 1 ovo de codorna → assar por 25 min.</b></p> <p>Observações:</p>
Almoço Arroz integral, Feijão cozido, Frango grelhado e Salada crua	Arroz integral	1 col. servir cheia	<p><b>Sugestão Almoço 2: Macarrão + Feijão fradinho cozido + Carne Bovina + Salada crua.</b> 1 pegador de Macarrão (evitar adicionar grandes quantidades de molhos e/ou de azeite/ manteiga para refogar)- preferir temperar com tomate, cebola e alho. 1 concha média de Feijão fradinho- evitar adicionar calabresa e/ou carne seca à preparação. 2 bifés pequenos de carne Bovina magra (patinho, filé, músculo) OU 4 col. sopa de carne moída (patinho) Salada crua (Cenoura, Beterraba, Repolho, Alface, Tomate, Pepino, Cebola, Pimentão, Rúcula, Acelga) (escolher pelo menos 3 vegetais e compor pelo menos ½ prato). 1 fatia pequena de abacaxi</p> <p><b>Sugestão Almoço 3: Arroz parboilizado com Feijão Preto + Sobrecoxa de Frango Assada+ salada Vinagrete</b> 1 col. servir de Arroz parboilizado cozido (se desejar, adicionar cenoura ralada) 1 ½ conchas médias de Feijão Preto - Preparar o feijão sem carnes e /ou temperos prontos e caldos concentrados 2 sobrecoxas pequenas de Frango Assadas 3 colheres de sopa de Salada Vinagrete (adicionar pequenas quantidades de sal e azeite de oliva extra virgem).</p> <p>Outras sugestões: <b>Pode</b> adicionar salada cozida, porém recomenda-se como primeira opção, salada crua! Sugestões de salada cozida: cenoura, beterraba, couve flor, brócolis, repolho, abóbora, dentre outros vegetais! EVITAR adicionar molhos prontos à preparação. Outras opções: lentilha, grão de bico, quinoa, frango ensopado, picadinho de carne com vegetais.</p> <p>Observações:</p>
	Feijão carioca - Preparar o feijão sem carnes e /ou temperos prontos e caldos concentrados	1 ½ conchas médias	
	Frango grelhado - Utilizar 1 col. de sobremesa rasa de azeite extra virgem ou em frigideira antiaderente. (evitar fritar em muito óleo ou margarina) - Temperar com tempero naturais: alho, cebola, açafraão, especiarias	2 filezinhos médios	
Salada crua - Evitar adicionar sal e grandes quantidades de azeite à preparação.	Salada crua (Cenoura, Beterraba, Repolho, Alface, Tomate, Pepino, Cebola, Pimentão, Rúcula, Acelga) (escolher pelo menos 3 vegetais e compor pelo menos ½ prato).		

	- Sugestão: 1 col. de chá de azeite de oliva extravirgem e limão para temperar.		
<b>Jantar</b> Banana da terra com queijo + café com leite	Banana da terra	1 unidade média	<u>Sugestão Jantar 2: Sopa de legumes com frango</u> 1 prato de sopa de legumes com frango- sugere-se adicionar o frango ou carne separadamente (aprox 4 col. sopa).
	Queijo minas frescal	2 fatias médias	<u>Sugestão de Jantar 3 : Crepioca recheada com Queijo+ café com leite</u> Crepioca: 1 ovo+ 1 col. sopa cheia de tapioca (adicionar 1 pitada de sal, misturar e colocar na frigideira) Recheio: 1 fatia de queijo minas frescal 1 fatia de melancia pequena Café com leite ( <i>mesmas quantidades sugeridas no cardápio principal</i> )
	Leite semi desnatado	½ xícara	<u>Sugestão Jantar 4: Arroz + frango desfiado + salada cozida</u> 1 col. de servir de arroz integral ou parboilizado 3 col. sopa de frango desfiado ou carne moída Salada cozida (ex: cenoura+ couve flor+ vagem) - 3 col. sopa (total)
	Cacau em pó	1 ½ col. sopa rasa	1 fatia de abacaxi 1 copo de suco da fruta

<b>Ceia</b> Fruta + Leite+ Aveia	Fruta	1 banana pequena	<u>Outras opções:</u> Iogurte Natural+ fruta Mingau de Aveia (1 copo de leite semi desnatado + 3 col. de aveia) 1 copo de leite + 1 fatia média de mamão com semente de chia
	Leite em pó	1 col. sopa	
	Farelo de Aveia	1 col. sopa	

INGESTÃO HÍDRICA: No mínimo levar para escola uma garrafinha de 500ml/ 2 copos de 200ml pela manhã/ 2 copos de 200ml pela tarde 2 copos de 200ml pela noite .

**NÃO DEIXAR FICAR COM SEDE PARA BEBER ÁGUA!!!**

## Apêndice G - Orientação alimentar para adolescentes (púbere)

### Sugestão de cardápio

REFEIÇÃO	ALIMENTO	MEDIDA CASEIRA	ALIMENTOS PARA SUBSTITUIÇÃO
Café da Manhã Batata doce com ovo mexido, Café com Leite e fruta	Batata Doce	2 fatias médias (espessura de 2 dedos OU 1 unidade pequena)	<p><u>Sugestão Café da Manhã 2: Sanduíche, Leite com cacau em pó e fruta.</u> Sanduíche: 2 fatias de pão integral (ver no rótulo se o primeiro ingrediente é farinha de trigo integral) 1 fatia média de tomate 1 col. café de orégano 2 fatias de queijo <i>minas frescal</i> 1 copo de 200 ml de leite líquido semi- desnatado + 1 ½ col. de sopa de cacau em pó 1 fatia pequena de melancia</p> <p><u>Sugestão Café da Manhã 3: Aipim com patê de sardinha, café com leite e fruta</u> 4 pedaços médios de aipim (cubos de 3 dedos aprox.) Patê: 3 col. sopa de sardinha (sem o óleo)+ 1 col. chá de milho verde+ 1 col. sopa de iogurte Natural+ 1 col. café de orégano) Obs: se desejar, fazer este patê em maiores quantidades e armazenar na geladeira por 1 semana e servir.) 1 copo de Suco de Goiaba (adoçar separadamente- sugestão: 1 col. de chá de açúcar) 1 fatia pequena de melão.</p> <p>Outras sugestões: Banana da terra, inhame, crepioca, aveioca/ ricota temperada com orégano e azeite de oliva extravirgem, frango desfiado, carne moída desfiada/ Frutas com avelã, semente de linhaça e chia.</p> <p>Observações:</p>
	Ovo mexido (Se desejar, adicionar orégano ou açafrão) - utilizar 1 col. de chá rasa de azeite extra virgem ou em frigideira antiaderente. <i>*Nunca utilizar margarina</i>	1 unidade	
	Café Infusão	½ Xicara	
	Leite líquido semi-desnatado	½ Xicara	
	Açúcar	1 col. chá rasa	
	Mamão	1 fatia pequena	
Lanche da manhã/ Lanche da tarde Vitamina de fruta	Leite líquido Semi-desnatado	1 copo de 200ml	<p><u>Sugestão de Lanches: Iogurte Natural+ fruta+ oleaginosas</u> 1 pote Iogurte Natural 2 ameixas pretas secas 6 unidades de castanha de caju torrada sem sal</p> <p><u>Sugestão de Lanches: Sanduíche caprichado com suco da fruta</u> 2 fatias de pão integral 1 fatia de ricota+ 1 ovo cozido 1 fatia de tomate+ 1 folha média de alface 1 copo de suco da fruta (adoçar separadamente- sugestão: 1 col. de chá de açúcar)</p>
	Banana Farelo de Aveia	1 unidade média 2 col. sopa	

			<p><u>Sugestão de Lanches: Mix de frutas saboroso</u> Frutas cortadas em cubos (manga, banana, morango, kiwui, mamão, uva)- 1 copo de 200ml + 1 col. sopa de leite em pó+ 3 castanhas do pará OU 1 col. chá de amendoim torrado.</p> <p><u>Sugestão de Lanches: Pipoca+ Leite com cacau</u> 1 vasilha média de pipoca (sugestão- fazer no microondas (colocar o milho numa vasilha tampada por 2min)- EVITAR ADICIONAR MANTEIGA, CHOCOLATE, COCO dentre outros.) 1 copo de 200 ml de leite semi desnatado+ 1 ½ col. sopa de cacau em pó</p> <p><u>Sugestão de Lanches: Bolinho Nutritivo e saboroso</u> 4 unidades + 1 copo de suco da fruta (adoçar separadamente- sugestão: 1 col. de chá de açúcar) + 1 maçã pequena.</p> <p><u>Sugestão de preparo do bolinho: cozinhar batata inglesa + aipim → amassar e temperar com um pouco de sal+ especiarias+ azeite+ tempero verde+ aveia em flocos → abrir uma quantidade da massa nas mãos e rechear com 1 ovo de codorna → assar por 25 min.</u> Observações:</p>
Almoço Arroz integral, Feijão cozido, Frango grelhado e Salada crua	Arroz integral	1 ½ col. servir cheia	<p><u>Sugestão Almoço 2: Macarrão + Feijão fradinho cozido + Carne Bovina + Salada crua.</u> 1 ½ pegador de Macarrão (evitar adicionar grandes quantidades de molhos e/ou de azeite/ manteiga para refogar)- preferir temperar com tomate, cebola e alho. 1 ½ concha média de Feijão fradinho- evitar adicionar calabresa e/ou carne seca à preparação. 2 bifés pequenos de carne Bovina magra (patinho, filé, músculo) OU 4 col. sopa de carne moída (patinho) Salada crua (Cenoura, Beterraba, Repolho, Alface, Tomate, Pepino, Cebola, Pimentão, Rúcula, Acelga) (escolher pelo menos 3 vegetais e compor pelo menos ½ prato). 1 fatia pequena de abacaxi</p> <p><u>Sugestão Almoço 3: Arroz parboilizado com Feijão Preto + Sobrecoxa de Frango Assada+ salada Vinagrete</u> 1 ½ col. servir de Arroz parboilizado cozido (se desejar, adicionar cenoura ralada) 2 conchas médias de Feijão Preto - Preparar o feijão sem carnes e /ou temperos prontos e caldos concentrados 2 sobrecoxas pequenas de Frango Assadas 3 colheres de sopa de Salada Vinagrete (adicionar pequenas quantidades de sal e azeite de oliva extra virgem).</p>
	Feijão cariquinho - Preparar o feijão sem carnes e /ou temperos prontos e caldos concentrados	2 conchas médias	
	Frango grelhado - Utilizar 1 col. de sobrema rasa de azeite extra virgem ou em frigideira antiaderente. (evitar fritar em muito óleo ou margarina) - Temperar com tempero naturais: alho, cebola, açafrão, especiarias	2 filezinhos médios	

<b>Ceia</b> <b>Fruta + Leite+</b> <b>Aveia</b>	Fruta	1 banana pequena	<u>Outras opções:</u> Iogurte Natural+ fruta Mingau de Aveia (1 copo de leite semi desnatado + 3 col. de aveia) 1 copo de leite + 1 fatia média de mamão com semente de chia
	Leite em pó	1 col. sopa	
	Farelo de Aveia	1 col. sopa	





**INGESTÃO HÍDRICA:** No mínimo levar para escola uma garrafinha de 500ml/ 2 copos de 200ml pela manhã/ 2 copos de 200ml pela tarde 2 copos de 200ml pela noite .

**NÃO DEIXAR FICAR COM SEDE PARA BEBER ÁGUA!!!**




## ANEXOS

## Anexo A - Ficha técnica e informações de cadastro do Probiótico

		<b>FICHA TÉCNICA</b> Informações para Cadastro		Versão: 01	
				PÁG.: 1 de 1	
NOME COMERCIAL: BIDRILAC 15 SACHÊ					
Data: 29/07/2014		CÓDIGO INTERNO DO PRODUTO: 1010515001			
APRESENTAÇÃO: CARTUCHO CONTENDO 15 SACHÊS DE 1G.		LINHA DO PRODUTO: VENDA			
PRINCÍPIO ATIVO / COMPONENTES ATIVOS: LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS, LA-5 E BIFIDOBACTERIUM BB12 LACTIS					
CLASSIFICAÇÃO DO PRODUTO: ALIMENTO		GRUPO DE PRODUTO: EQUILÍBRIO DA FLORA INTESTINAL			
PRODUTO CONTROLADO: <input checked="" type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/> SIM		VALIDADE: 24 MESES			
CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO: CONSERVAR EM LOCAL FRESCO.					
CÓDIGO DE BARRAS DO PRODUTO (EAN 13): 7896026100250		CÓDIGO DE BARRAS DA CAIXA DE EMBARQUE (DUN 14): 17896026100257			
NÚMERO DE REGISTRO (ANVISA): M.S.4.9041.0067.001-8		CLASSIFICAÇÃO FISCAL: 3002.90.92			
ALÍQUOTA DO IPI: NÃO		ICMS: SIM			
CAIXA DE EMBARQUE (UNIDADES DE ABASTECIMENTO): 12 UNIDADES					
PREÇO FÁBRICA: DE ACORDO COM A TABELA EM ANEXO.					
PESO LÍQUIDO DO PRODUTO: 0,015Kg		PESO BRUTO DO PRODUTO: 0,030Kg			
LARGURA DO PRODUTO: 9 cm	ALTURA DO PRODUTO: 8 cm	PROFUNDIDADE DO PRODUTO: 4 cm			
PADRÃO DE PALLET ( QUANTIDADE DE CAIXAS POR PALLET): 210 CAIXAS POR PALLET		EMPILHAMENTO MÁXIMO: 7 lastros			
PESO LÍQUIDO CAIXA DE EMBARQUE: 0,180Kg		PESO BRUTO CAIXA DE EMBARQUE: 0,360Kg			
COMPRImento CX DE EMBARQUE: 18,5 cm	ALTURA CX DE EMBARQUE: 13,5 cm	LARGURA CX DE EMBARQUE: 16,6 cm			
Motivo da Alteração: Alteração do código do produto devido a mudança do sistema de Logix para SAP..				Elaboração:  Desenv. Embalagem	
Aprovação:  Garantia da Qualidade	Aprovação:  Dir. Comercial	Aprovação:  Dir. Financeira			
POP - DEM 001					



## Anexo B - Ficha técnica e informações de cadastro do Placebo


**accent**  
 leading precision

**QUALITY CONTROL**  
**CERTIFICATE OF ANALYSIS**

Product	MICROCRYSTALLINE CELLULOSE	Batch No. : D107180527
Grade	ACCEL- 101	Mfg. Date : 25/07/2018
Party Name		Re-evaluation Date: 24/07/2023
MOA	USP/NF,JP,Ph.Eur.,BP	Batch Qty: 5000 Kgs.

Description	Fine, White or almost white powder, it consists free flowing, nonfibrous particles. Practically insoluble in sodium hydroxide solution (1 in20), insoluble in water, in dilute acids and most of organic solvents.	
-------------	--	--

Pharmacopoeial test items	Batch Results	Specification
Identification A(Zinc Chloride test)	Passes	Have to correspond as USP/NF,JP,Ph.Eur.,BP
Identification B (Degree of Polymerization)	Complies	NMT 350 as USP/NF,JP,Ph.Eur.,BP
Solubility (coppertetramine solution)	Complies	Have to correspond as Ph. Eur.,BP
pH	6.47	5.0-7.5 as USP/NF,JP,Ph.Eur.,BP
Conductivity	42 $\mu\text{S.cm}^{-1}$	NMT 75 $\mu\text{S.cm}^{-1}$ as USP/NF,JP,Ph.Eur.,BP
Water - Soluble Substance	0.1340 %	NMT 0.25% as USP/NF,JP,Ph.Eur.,BP
Ether - Soluble Substance	0.0289 %	NMT 0.05% as USP/NF,JP,Ph.Eur.,BP
Loss on Drying	3.485 %	NMT 7.0% as USP/NF,JP,Ph.Eur.,BP
Heavy Metals	Complies	NMT 10 PPM as USP/NF,JP,Ph.Eur.,BP
Residue on Ignition / Sulphated Ash	0.0293 %	NMT 0.1% as USP/NF,JP,Ph.Eur.,BP


Standards	Batch Results	In house Specification
Bulk Density	0.3051 g/ml	0.27 to 0.34 g/ml
Assay (Dried)	99.57 %	97.0% to 102.0%
Sieve Analysis (% Retention)		
60 Mesh	NIL	$\leq 1.0\%$
200 Mesh	20.58 %	$\leq 30.0\%$
Particle Size Distribution		
D <sub>10</sub>	10 $\mu$	$\leq 30\mu$
D <sub>50</sub>	51 $\mu$	40 – 60 $\mu$
D <sub>90</sub>	119 $\mu$	$\geq 80 \mu$


**MICROBIAL LIMITS**

Total Viable Aerobic Count	Complies	N.M.T. 1000 cfu/g as USP/NF,JP,Ph.Eur.,BP
Total yeast & Mould Count	Complies	N.M.T 100 cfu/g as USP/NF,JP,Ph.Eur.,BP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Complies	Absent as USP/NF,JP,Ph.Eur.,BP
<i>Escherichia Coli</i>	Complies	Absent as USP/NF,JP,Ph.Eur.,BP
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Complies	Absent as USP/NF,JP,Ph.Eur.,BP
<i>Salmonella species</i>	Complies	Absent as USP/NF,JP,Ph.Eur.,BP

The raw materials, manufacturing process, and product do not contain any of solvents listed in Organic Volatile Impurities (USP<467>) & residual solvents (Ph – Eur<5.4>).

Storage recommendation: Preserve in tight containers.



  
 Jayesh Pranjapati  
 Quality Control  
 Accent Microcell Pvt Ltd.

Unit 1 (Pharma) Survey No. 533/P, Paldi Kankaj, Phansa Road, Ta. Dabhoi,  
 Dist. Ahmedabad - 382425, Gujarat, India | Phone: +91 2119 20000/208002  
 Unit 2 (Daboi) - S.E.2 Post No. 2-09,80,83,84 Daboi-SEZ Limited Phase-1, Ta. Vagra,  
 Dist. Bharuch - 380135, Gujarat, India | Phone: +91 75758 05960

Phone: +91 79 4004296/7 3245980/9  
 3252283/ 4039490/8  
 email: info@accentmicrocell.com  
 www.accentmicrocell.com  
 CIN : U72304GJ2012PT10365790

Regional Office  
 314, Bhargvika Acada,  
 Shyamal Cross Road, Anandnagar Road,  
 Banihata, Ahmedabad - 380015  
 Gujarat, India

Anexo C - Laudo da Bioimpedância

# InBody 520 Body Composition Analysis

I.D.	AGE	HEIGHT	GENDER	DATE/TIME
DEIVISON	15.0	172.0cm	M	2020/01/31 09:52(915)

**InBody 520**  
Biospace Co., Ltd.

### Body Composition Analysis

Compartment	Values	Total Body Water	Soft Lean Mass	Fat Free Mass	Weight	Normal Range
<b>T B W</b> (L) <small>Total Body Water</small>	41.7	41.7	53.6	56.8	83.3	36.6 ~ 44.7
<b>Protein</b> (kg)	11.2					
<b>Mineral</b> (kg)	3.89	<i>OSSEOUS: 3.21</i>				3.38 ~ 4.13
<b>Body Fat Mass</b> (kg)	26.5					7.8 ~ 15.6

\* Mineral is estimated.

### Muscle-Fat Analysis

	Under	Normal	Over	UNIT%	Normal Range
<b>Weight</b> (kg)	[Progressive bar]			83.3	55.2 ~ 74.7
<b>S M M</b> (kg) <small>Skeletal Muscle Mass</small>	[Progressive bar]			31.7	27.7 ~ 33.9
<b>Body Fat Mass</b> (kg)	[Progressive bar]			26.5	7.8 ~ 15.6

### Body Shape Graph

Cons 3

Lean     Lean / Ideal Lean x 100(%)  
 Under     Normal     Over    --- Standard

### Nutritional Evaluation

Protein  Normal  Deficient

Mineral  Normal  Deficient

Fat  Normal  Deficient  Excessive

Edema  Normal  Slight Edema  Edema

### Weight Management

Weight  Normal  Under  Over

S M M  Normal  Strong  Under

Fat  Normal  Under  Over

### Obesity Diagnosis

B M I  Normal  Under  Over  Extremely Over

P B F  Normal  Over  Extremely Over

W H R  Normal  Over  Extremely Over

### Body Balance

Upper  Balanced  Slightly Unbalanced  Extremely Unbalanced

Lower  Balanced  Slightly Unbalanced  Extremely Unbalanced

Upper-Lower  Balanced  Slightly Unbalanced  Extremely Unbalanced

### Body Strength

Upper  Normal  Developed  Weak

Lower  Normal  Developed  Weak

Muscle  Normal  Muscular  Weak

### Weight Control

Target Weight	66.8	kg
Weight Control	-16.5	kg
Fat Control	-16.5	kg
Muscle Control	0.0	kg
Fitness Score	65	Points

### Impedance

Z	RA	LA	TR	RL	LL
5kHz	308.1	312.5	25.1	273.2	275.3
50kHz	270.0	275.1	21.4	241.2	240.9
500kHz	234.0	238.0	16.6	212.2	212.0

### Lean Balance

	Under	Normal	Over	UNIT%
<b>Right Arm</b> (kg)	[Progressive bar]			3.39
<b>Left Arm</b> (kg)	[Progressive bar]			3.35
<b>Trunk</b> (kg)	[Progressive bar]			26.5
<b>Right Leg</b> (kg)	[Progressive bar]			8.37
<b>Left Leg</b> (kg)	[Progressive bar]			8.36

### Body Composition History

DATE / TIME	Weight	SMM	Fat	Score
19/12/18 10:23	85.8	32.3	28.3	65
20/01/31 09:52	83.3	31.7	26.5	65

### Additional Data (Normal Range)

Obesity Degree = 128%    90.0 ~ 110

B C M = 37.0kg    32.5 ~ 39.7

B M C = 3.21kg    2.78 ~ 3.40

B M R = 1596kcal    1746 ~ 2052

A C = 35.1cm

A M C = 28.2cm

## Anexo D - IPAQ -C

**Physical Activity Questionnaire for Older Children  
PAQ-C**

1. Atividade física no **tempo livre**: Você realizou alguma dessas atividades nos últimos 7 dias (última semana). Se a resposta for sim, quantas vezes? (Marcar uma única resposta por atividade).

<b>Atividade Física</b>	<b>Não</b>	<b>1-2</b>	<b>3-4</b>	<b>5-6</b>	<b>≥ 7</b>
Pular corda	( )	( )	( )	( )	( )
Andar de patins	( )	( )	( )	( )	( )
Skate	( )	( )	( )	( )	( )
Brincar de peqa-peqa	( )	( )	( )	( )	( )
Andar de bicicleta	( )	( )	( )	( )	( )
Caminhar como exercício físico	( )	( )	( )	( )	( )
Correr	( )	( )	( )	( )	( )
Nadar	( )	( )	( )	( )	( )
Dançar	( )	( )	( )	( )	( )
Fazer exercício em academias de ginástica	( )	( )	( )	( )	( )
Jogar basquete	( )	( )	( )	( )	( )
Jogar futebol/futsal	( )	( )	( )	( )	( )
Jogar voleibol	( )	( )	( )	( )	( )
Jogar handebol	( )	( )	( )	( )	( )
Jogar tênis de campo/tênis de mesa	( )	( )	( )	( )	( )
Lutar judô, karate, etc.	( )	( )	( )	( )	( )
Outros: _____	( )	( )	( )	( )	( )
Outros: _____	( )	( )	( )	( )	( )

2. Nos últimos 7 dias, durante as **aulas de educação física**, quantas vezes você permaneceu muito ativo fisicamente: jogando intensamente, correndo, saltando, fazendo lançamentos, etc.?
- ( ) Não tenho aula de educação física  
 ( ) Quase nunca  
 ( ) Algumas vezes  
 ( ) Muitas vezes  
 ( ) Sempre
3. Nos últimos 7 dias, o que você normalmente fez no horário do **recreio escolar**?
- ( ) Fico sentado (conversando, lendo, fazendo tarefas de aula, etc.)  
 ( ) Fico passeando pelas dependências da escola  
 ( ) Corro ou jogo um pouco  
 ( ) Corro ou jogo bastante  
 ( ) Corro ou jogo intensamente durante todo o recreio
4. Nos últimos 7 dias, fora da escola, no **período da manhã**, quantas vezes você brincou, praticou esporte, realizou exercício físico ou dançou de tal forma que ficou muito ativo fisicamente?
- ( ) Nenhuma vez  
 ( ) Um vez na última semana  
 ( ) 2 – 3 vezes na última semana  
 ( ) 4 – 5 vezes na última semana  
 ( ) 6 ou mais vezes na última semana
5. Nos últimos 7 dias, fora da escola, no **período da tarde**, quantas vezes você brincou, praticou esporte, realizou exercício físico ou dançou de tal forma que ficou muito ativo fisicamente?
- ( ) Nenhuma vez  
 ( ) Um vez na última semana  
 ( ) 2 – 3 vezes na última semana  
 ( ) 4 – 5 vezes na última semana  
 ( ) 6 ou mais vezes na última semana

6. Nos últimos 7 dias, fora da escola, no **período da noite**, quantas vezes você brincou, praticou esporte, realizou exercício físico ou dançou de tal forma que ficou muito ativo fisicamente?
- ( ) Nenhuma vez  
 ( ) Um vez na última semana  
 ( ) 2 – 3 vezes na última semana  
 ( ) 4 – 5 vezes na última semana  
 ( ) 6 ou mais vezes na última semana
7. No último **final de semana**, quantas vezes você brincou, praticou esporte, realizou exercício físico ou dançou de tal forma que ficou muito ativo fisicamente?
- ( ) Nenhuma vez  
 ( ) Uma vez  
 ( ) 2 – 3 vezes  
 ( ) 4 – 5 vezes  
 ( ) 6 ou mais vezes
8. Qual das seguintes situações melhor descreve seus **últimos 7 dias**? Leia as 5 opções antes de decidir por uma resposta que melhor descreve sua última semana.
- ( ) Todo ou a maioria do tempo livre realizei atividades que exige pouco ou nenhum esforço físico.  
 ( ) Algumas vezes (1-2 vezes na última semana) realizei atividade física no meu tempo livre (por exemplo, pratiquei esporte, joguei bola, corri, nadei, dancei, andei de bicicleta, fiz exercício físico, etc.)  
 ( ) Frequentemente (3-4 vezes na última semana) realizei atividade física no meu tempo livre  
 ( ) Bastante frequentemente (5-6 vezes na última semana) realizei atividade física no meu tempo livre  
 ( ) Muito frequentemente (7 ou mais vezes na última semana) realizei atividade física no meu tempo livre
9. Assinale com que frequência você realizou atividade física (por exemplo, praticou esporte, jogou bola, correu, nadou, dançou, andou de bicicleta, fez exercício físico, etc.) em cada dia da semana.
- | Atividades | Nenhuma | Pouco | Médio | Bastante | Muito |
|------------|---------|-------|-------|----------|-------|
| 2ª Feira   | ( )     | ( )   | ( )   | ( )      | ( )   |
| 3ª Feira   | ( )     | ( )   | ( )   | ( )      | ( )   |
| 4ª Feira   | ( )     | ( )   | ( )   | ( )      | ( )   |
| 5ª Feira   | ( )     | ( )   | ( )   | ( )      | ( )   |
| 6ª Feira   | ( )     | ( )   | ( )   | ( )      | ( )   |
| Sábado     | ( )     | ( )   | ( )   | ( )      | ( )   |
| Domingo    | ( )     | ( )   | ( )   | ( )      | ( )   |
10. Você esteve doente nesta última semana, ou apresentou alguma situação que o impediu de realizar normalmente atividade física?
- ( ) Não  
 ( ) Sim
- Qual foi o impedimento? \_\_\_\_\_

## Anexo E - IPAQ-A

**Physical Activity Questionnaire for Adolescents  
PAQ-A**

1. Atividade física no **tempo livre**: Você realizou alguma dessas atividades nos últimos 7 dias (última semana). Se a resposta for sim, quantas vezes? (Marcar uma única resposta por atividade).

Atividade Física	Não	1-2	3-4	5-6	≥ 7
Pular corda	( )	( )	( )	( )	( )
Andar de patins	( )	( )	( )	( )	( )
Skate	( )	( )	( )	( )	( )
Brincar de pega-pega	( )	( )	( )	( )	( )
Andar de bicicleta	( )	( )	( )	( )	( )
Caminhar como exercício físico	( )	( )	( )	( )	( )
Correr	( )	( )	( )	( )	( )
Nadar	( )	( )	( )	( )	( )
Dançar	( )	( )	( )	( )	( )
Fazer exercício em academias de ginástica	( )	( )	( )	( )	( )
Jogar basquete	( )	( )	( )	( )	( )
Jogar futebol/futsal	( )	( )	( )	( )	( )
Jogar voleibol	( )	( )	( )	( )	( )
Jogar handebol	( )	( )	( )	( )	( )
Jogar tênis de campo/tênis de mesa	( )	( )	( )	( )	( )
Lutar judô, karate, etc.	( )	( )	( )	( )	( )
Outros: _____	( )	( )	( )	( )	( )
Outros:	( )	( )	( )	( )	( )

2. Nos últimos 7 dias, durante as **aulas de educação física**, quantas vezes você permaneceu muito ativo fisicamente: jogando intensamente, correndo, saltando, fazendo lançamentos, etc.?
- ( ) Não tenho aula de educação física  
 ( ) Quase nunca  
 ( ) Algumas vezes  
 ( ) Muitas vezes  
 ( ) Sempre
3. Nos últimos 7 dias, fora da escola, no **período da manhã**, quantas vezes você brincou, praticou esporte, realizou exercício físico ou dançou de tal forma que ficou muito ativo fisicamente?
- ( ) Nenhuma vez  
 ( ) Um vez na última semana  
 ( ) 2 – 3 vezes na última semana  
 ( ) 4 – 5 vezes na última semana  
 ( ) 6 ou mais vezes na última semana
4. Nos últimos 7 dias, fora da escola, no **período da tarde**, quantas vezes você brincou, praticou esporte, realizou exercício físico ou dançou de tal forma que ficou muito ativo fisicamente?
- ( ) Nenhuma vez  
 ( ) Um vez na última semana  
 ( ) 2 – 3 vezes na última semana  
 ( ) 4 – 5 vezes na última semana  
 ( ) 6 ou mais vezes na última semana
5. Nos últimos 7 dias, fora da escola, no **período da noite**, quantas vezes você brincou, praticou esporte, realizou exercício físico ou dançou de tal forma que ficou muito ativo fisicamente?
- ( ) Nenhuma vez  
 ( ) Um vez na última semana  
 ( ) 2 – 3 vezes na última semana  
 ( ) 4 – 5 vezes na última semana  
 ( ) 6 ou mais vezes na última semana

6. No último **final de semana**, quantas vezes você brincou, praticou esporte, realizou exercício físico ou dançou de tal forma que ficou muito ativo fisicamente?

Nenhuma vez  
 Uma vez  
 2 – 3 vezes  
 4 – 5 vezes  
 6 ou mais vezes

7. Qual das seguintes situações melhor descreve seus **últimos 7 dias**? Leia as 5 opções antes de decidir por uma resposta que melhor descreve sua última semana.

Todo ou a maioria do tempo livre realizei atividades que exige pouco ou nenhum esforço físico.  
 Algumas vezes (1-2 vezes na última semana) realizei atividade física no meu tempo livre (por exemplo, pratiquei esporte, joguei bola, corri, nadei, dancei, andei de bicicleta, fiz exercício físico, etc.)  
 Frequentemente (3-4 vezes na última semana) realizei atividade física no meu tempo livre  
 Bastante frequentemente (5-6 vezes na última semana) realizei atividade física no meu tempo livre  
 Muito frequentemente (7 ou mais vezes na última semana) realizei atividade física no meu tempo livre

8. Assinale com que frequência você realizou atividade física (por exemplo, praticou esporte, jogou bola, correu, nadou, dançou, andou de bicicleta, fez exercício físico, etc.) em cada dia da semana.

Atividades	Nenhuma	Pouco	Médio	Bastante	Muito
2ª Feira	( )	( )	( )	( )	( )
3ª Feira	( )	( )	( )	( )	( )
4ª Feira	( )	( )	( )	( )	( )
5ª Feira	( )	( )	( )	( )	( )
6ª Feira	( )	( )	( )	( )	( )
Sábado	( )	( )	( )	( )	( )
Domingo	( )	( )	( )	( )	( )

9. Você esteve doente nesta última semana, ou apresentou alguma situação que o impediu de realizar normalmente atividade física?

Não  
 Sim

Qual foi o impedimento? \_\_\_\_\_



## Anexo F - Escala de Bistrol

## Escala de Bistrol

Tipo 1		Pedaços separados e duros, feito coquinhos ou fezes de cabrito
Tipo 2		Formato de salsicha encaroçada, com bolinhas grudadas
Tipo 3		Formato de salsicha com rachaduras na superfície
Tipo 4		Alongada, com formato de salsicha ou cobra, lisa e macia
Tipo 5		Pedaços macios e separados, com bordas bem definidas
Tipo 6		Massa pastosa e fofa, com bordas mal definidas
Tipo 7		Sem forma ou líquida, sem pedaços sólidos

## Anexo G - Laudo da Ressonância nuclear magnética de fígado

Nome: BEATRIZ CARDOSO CANDIDO MAIA  
 Data de Nascimento: 01/06/2003 Data: 16/03/2020  
 Unidade: ITAIGARA - SALVADOR  
 Atendimento: 034 - 0544911  
 Prontuário: 5385357

### ELASTOGRAFIA HEPÁTICA POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA

**Técnica:** Estudo dirigido para a avaliação da rigidez hepática através da sequência de elastografia guiada por RM, sem a injeção do meio de contraste endovenoso. Foram realizadas ainda algumas sequências adicionais para quantificação de gordura e ferro no parênquima hepático.

#### Achados:

Fígado de forma, contornos e dimensões preservadas, apresentando sinais de esteatose moderada, com fração média estimada de gordura (PDFF) de 16,5% (VN  $\leq$  5,1%)\*, valor este que poderá ser utilizado para comparações futuras.

A elastografia por ressonância magnética evidencia rigidez ("stiffness") hepática dentro dos limites da normalidade, com média estimada em 2,3 kPa\*\*.

Não foram caracterizadas sinais de sobrecarga de ferro no parênquima hepático, com T2\* médio: 27,7 msec (VN > 16 msec) e R2\* médio: 36 Hz.

Quantificação de gordura	Quantificação de ferro		Elastografia Hepática
(PDFF)* - VR: $\leq$ 5,1%	R2*	T2* - VR: > 16 msec	<2,5 kPa: normal
16,5%	36 Hz	27,7 msec	2,3 kPa

Vesícula biliar normodistendida, com paredes finas e conteúdo líquido homogêneo. Ausência de dilatação das vias biliares.

#### Como achados adicionais observamos:

- Pequeno cisto renal polar inferior à direita, com fina septação interna, medindo 1,1 cm.
- Linfonodos aumentados em número na raiz do mesentério e hilo hepático, medindo até 0,8 cm e alguns em dimensões na região ileocólica, medindo até 12 cm no menor eixo, inespecíficos.

#### Impressão Diagnóstica: Exame controle. Em relação à Elastografia Hepática por RM realizada neste Serviço em 22/10/2019, observa-se:

- Sinais de esteatose hepática moderada, com PDFF: 16,5% (anterior era de 13,4%)\*.
- A elastografia por ressonância magnética evidencia rigidez ("stiffness") hepática preservada (média estimada em 2,3 kPa, anterior era de 2,0 kPa)\*\*.
- Este achado apresenta correlação com grau F0 de estadiamento de fibrose.
- Ausência de sobrecarga de ferro no parênquima hepático.
- Pequeno cisto renal septado polar inferior à direita.
- Linfonodos aumentados em número na raiz do mesentério, hilo hepático e ileocólicos, inespecíficos, de provável natureza reacional.

Valores Sugeridos de PDFF para Classificação Esteatose*	
0 (Normal)	$\leq$ 5,1%
1 (Leve)	5,1 - 14,0%
2 (Moderada)	14,0 - 28,0%
3 (Acentuada)	> 28%

\*Radiology 2017 Sep;284(3):706-716; Radiology 2012 Oct;265(1):133-42

Accesse as imagens e/ou resultados dos seus exames em nosso site: [www.delfinmedicina@agnostica.com.br](http://www.delfinmedicina@agnostica.com.br)  
 Agora na Delfin, unidade Itaigara, você também realiza os seus exames laboratoriais.

Nome: BEATRIZ CARDOSO CANDIDO MAIA  
 Data de Nascimento: 01/06/2003 Data: 16/03/2020  
 Unidade: ITAIGARA - SALVADOR  
 Atendimento: 034 - 0544911  
 Prontuário: 5385357

Valores de Referência Elastografia Hepática Por RM **	
<2,5 kPa	normal
2,5 - 2,9 kPa	normal ou inflamação
2,9 - 3,5 kPa	F1 / F2
3,5 - 4,0 kPa	F2 / F3
4,0 - 5,0 kPa	F3 / F4
> 5,0 kPa	F4

\*\*Magn Reson Imaging Clin N Am. 2014 Aug; 22(3):433-46



\* A leitura do QR-Code permitirá a visualização dos principais achados deste exame.

Laudo Por:

*Dr. Thais*  
 Dra. THAIS DIAS GONZALEZ  
 CRM-SA: 17146

*Dr. Fernando*  
 Dra. FERNANDA DIAS GONZALEZ GUINDALINI  
 CRM-SA: 18908



## Anexo H - Parecer do Comitê de ética e pesquisa



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** EFICÁCIA DO USO DE LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS E BIFIDOBACTERIUM LACTIS NO TRATAMENTO DA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ÁLCOOLICA E RESISTÊNCIA A INSULINA EM ADOLESCENTES OBESOS: ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO.

**Pesquisador:** NEY CRISTIAN AMARAL BOA SORTE

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 01265418.3.0000.5544

**Instituição Proponente:** Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.095.307

#### Apresentação do Projeto:

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é considerada como a doença hepática mais comum entre crianças e adolescentes que ocorre como uma das manifestações da síndrome metabólica. O termo doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é genérico e se refere a um espectro amplo de doença, que engloba a steatose, esteatohepatite e fibrose. Durante as últimas décadas, a prevalência da DHGNA,

aumentou de forma substancial na população pediátrica, e os fatores que contribuíram para esse fato foram à transição nutricional associado ao aumento da prevalência da obesidade. O mecanismo pelo qual ocorre a progressão da doença hepática ainda é pouco conhecido. Vários autores descrevem o papel da microbiota intestinal na patogênese da doença, inclusive sugerindo a sua implicação não só na indução da doença hepática, mas na progressão da mesma. Em pacientes com DHGNA, a permeabilidade intestinal e a prevalência de super crescimento bacteriano intestinal estão elevados. As recomendações primárias para o tratamento da DHGNA incluem mudanças dietéticas associadas a mudanças no estilo de vida, o tratamento medicamentoso incluindo antioxidantes, agentes anti-TNF- (fator de necrose tumoral), e probióticos, sendo que o uso destes vem evoluindo, mas muito embora existam estudos nessa temática, existe

**Endereço:** AVENIDA DOM JOÃO VI, 275

**Bairro:** BROTAS

**CEP:** 40.290-000

**UF:** BA

**Município:** SALVADOR

**Telefone:** (71)3276-8225

**E-mail:** cep@bahiana.edu.br



Continuação do Parecer: 3.095.307

escassez de ensaios clínicos publicados, e essas terapias ainda não estão licenciadas para uso. Os estudos com uso de probióticos são numerosos em literatura, especialmente estudos experimentais em animais. Contudo, estudos em humanos ainda falham na sua metodologia, especialmente na forma de avaliação da gordura hepática, bem como tem-se escassez de estudos randomizados e bem controlados. Por conta disso, em revisão sistemática conduzida pela COCHRANE, em 2007, há referência ao uso de probióticos para tratar as doenças hepáticas, inclusive a DHGNA como promissor. Contudo, nesta mesma revisão, está relatado a carência de estudos controlados e randomizados em literatura, bem como um padrão de definição das cepas de microorganismos a serem utilizadas e tempo de utilização.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:** Verificar a eficácia do uso de *Lactobacillus Acidophilus* e *Bifidobacterium Lactis* na redução da esteatose hepática e da quantificação de gordura hepática, em adolescentes obesos.

**Objetivo Secundário:** 1) Caracterizar o perfil laboratorial da DHGNA em adolescentes obesos; 2) Testar a hipótese de que a suplementação de *Lactobacillus Acidophilus* e *Bifidobacterium Lactis* reduz os valores de aminotransferases e GGT em adolescentes obesos com DHGNA; 3) Verificar o impacto da suplementação com *Lactobacillus Acidophilus* e *Bifidobacterium Lactis* nos valores de HOMA-IR e ferritina séricas; 4) Descrever os níveis de marcadores bioquímicos (ácido hialurônico) e radiológicos (Proton density fat fraction – PDFF) de evolução para fibrose hepática (antes da intervenção e observar as alterações após a administração desses probióticos); 5) Correlacionar os níveis de PDFF e elastografia com os marcadores bioquímicos de evolução para fibrose hepática antes e após intervenção; 6) Verificar o impacto da suplementação com *Lactobacillus Acidophilus* e *Bifidobacterium Lactis* nos valores de TNF alfa, adiponectina e IL2 e IL6; 7) Verificar o impacto da suplementação com *Lactobacillus Acidophilus* e *Bifidobacterium Lactis* nos indicadores antropométricos para a avaliação da obesidade; 8) Avaliar o impacto da suplementação com *Lactobacillus Acidophilus* e *Bifidobacterium Lactis* nos valores de percentual de gordura corporal da amostra estudada.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:** Serão coletados exames laboratoriais de sangue e de fezes em dois momentos (visita 1 e visita 4), o que implica nos riscos de dor localizada, hematoma, desmaio e infecção local. Para tal, em caso de hematoma, bolsa de gelo será colocada no local e um componente da equipe

**Endereço:** AVENIDA DOM JOÃO VI, 275

**Bairro:** BROTAS

**UF:** BA

**Telefone:** (71)3276-8225

**Município:** SALVADOR

**CEP:** 40.290-000

**E-mail:** cep@bahiana.edu.br



Continuação do Parecer: 3.095.307

acompanhando o processo de coleta. Em caso de algum desconforto emocional ou físico prévio a coleta (medo de coletar sangue),

reagendaremos a coleta para um momento mais adequado, se necessário. AS fezes podem trazer algum constrangimento por ser necessário o armazenamento em geladeira. Será explicado a necessidade dessa conservação. Os questionários que serão aplicados e as

mensurações antropométricas que serão realizadas podem trazer um desconforto pelo tempo despendido para realizar o protocolo, previsto em 30 a 40 minutos. Sala com condições físicas adequadas, com privacidade, e o treinamento da equipe do protocolo para minimizar o tempo reduzirão esse risco. As garantias de suspensão do protocolo a qualquer momento serão garantidas pelo TCLE. Serão realizados exames de ressonância nuclear magnética (RNM) para detectar a quantidade de gordura do fígado, também nas visitas 1 e 4. Esse exame não utiliza radiação ionizante (raios X), nem utilizará contraste, o que reduz os riscos inerentes ao exame. O aparelho a ser utilizado não é fechado, o que reduz, de maneira importante, o risco de claustrofobia (medo de ambientes fechados). O acompanhante do participante pode ficar ao lado do paciente durante a realização do exame. Um membro da equipe de pesquisa também estará presente. A clínica Delphin, que realizará os exames de maneira gratuita e será parceira do protocolo, disponibilizará toda a sua estrutura física e de recursos humanos para dar suporte a qualquer desconforto que ocorra. O tratamento utilizado (probiótico) pode causar alguma alteração leve do ritmo intestinal (deixar as fezes mais duras ou mais moles) ou flatulência (produção de gases intestinais), reações que são leves e transitórias.

Essas alterações, caso ocorram, serão abordadas pela equipe do protocolo, mediante telefone disponível 24h/dia e atendimento presencial na EBMS ou no HUPES de segunda a sexta, em horário comercial.

Casos que necessitem, o que não é esperado, de ida a um pronto atendimento (UPA, por exemplo) será acompanhado de um membro da equipe de pesquisa. Há o risco de quebra de confidencialidade dos dados, para os quais, no protocolo utilizado, os participantes não serão identificados pelo nome e sim por um número aleatório (código especial da pesquisa) e que todas as informações colhidas serão usadas somente para fins dessa pesquisa e permanecerão em total sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a privacidade do paciente.

**Benefícios:** A pesquisa poderá proporcionar benefício para o participante deste estudo (benefício direto), uma vez que em dados de estudos prévios observam-se os efeitos benéficos do uso de

**Endereço:** AVENIDA DOM JOÃO VI, 275

**Bairro:** BROTAS

**UF:** BA

**Município:** SALVADOR

**CEP:** 40.290-000

**Telefone:** (71)3276-8225

**E-mail:** cep@bahiana.edu.br





Continuação do Parecer: 3.095.307

probióticos na obesidade e especialmente na redução da doença hepática gordurosa não alcoólica. Contudo, somente ao final do estudo este provável benefício poderá ser provado. Ainda se comprovado o benefício, o protocolo contribuirá para que este produto seja liberado para uso no tratamento da esteatose (gordura no fígado), beneficiando outros adolescentes obesos com esteatose que não participaram da pesquisa, mas que se beneficiarão com os resultados positivos. Será garantido a todos os participantes, inclusive do grupo comparativo, o acesso ao probiótico, pós estudo, em caso de comprovação de efetividade.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Será realizado estudo de intervenção (ensaio clínico), randomizando, duplo cego com grupo comparativo (placebo). Serão estudados adolescentes de 10 a 19 anos de idade, de Salvador e região metropolitana que serão acompanhados no Ambulatório de Pediatria no Ambulatório Docente Assistencial de Brotas (ADAB), vinculado ao curso de graduação em Medicina da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP).

Os participantes serão convidados no Serviço de Nutrologia Pediátrica, localizado no Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (COM-HUPES) da Universidade Federal da Bahia (UFBA) do ambulatório de Obesidade Infantil, já com diagnóstico ultrassonográfico prévio de DHGNA. Este serviço acompanha, regularmente, cerca de 350 pacientes ao ano, sendo que 75% destes são adolescentes de 10 a 19 anos. Tamanho e seleção amostral: Com nível de confiança de 95%, poder de 80%, baseado em níveis médios (DP) de percentual de PDFF à ressonância magnética de 18,3% previamente descritos em adultos com DHGNA na estimativa de mudança (diferença) de média em 15% obtém-se um tamanho amostral mínimo de 14 pacientes em cada grupo. Considerando perdas de até 20%, e a necessidade de maior amostra para análises multivariadas, 30 participantes serão alocados em cada grupo do estudo. Os grupos serão randomizados a partir da aplicação dos critérios de inclusão na visita de triagem, detalhada adiante. Protocolo de intervenção, instrumentos e procedimentos de coleta: A intervenção consistirá na administração de alimento a base dos probióticos Lactobacillus acidophilus LA-5® e Bifidobacterium lactis BB-12®, contendo 1 x 10<sup>9</sup> células (UFC) de cada um dos probióticos, a ser administrado por via oral, uma vez ao dia, em forma de cápsulas com ingestão de água ou outra bebida não aquecida. Durante 12 semanas, em todos os dias, a intervenção será realizada. O grupo placebo receberá cápsulas contendo 1g de celulose anidra, diariamente. Os dois grupos serão avaliados, com exame clínico, mensalmente, recebendo as orientações médicas e nutricionais de rotina no atendimento. O

**Endereço:** AVENIDA DOM JOÃO VI, 275

**Bairro:** BROTAS

**CEP:** 40.290-000

**UF:** BA

**Município:** SALVADOR

**Telefone:** (71)3276-8225

**E-mail:** cep@bahiana.edu.br



Continuação do Parecer: 3.095.307

avaliador (médico e/ou nutricionista) não

saberá em qual grupo o paciente se encontrará alocado (cegueira). Um outro membro da equipe de pesquisa fará a coleta dos frascos das cápsulas para contagem da ingestão. Para avaliar a modificação na microflora intestinal, esperada no grupo intervenção, fezes serão coletadas nas visitas pertinentes e a quantificação de eubactérias totais, filos Firmicutes e Bacteroidetes, gêneros *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp serão obtidas conforme descrito previamente, por meio da obtenção do DNA de todas

as amostras fecais a serem submetidas ao ensaio de PCR (Polymerase Chain Reaction) em tempo real. A dosagem das interleucinas (ILs) será realizada conforme descrito previamente. A ressonância nuclear magnética (RNM), por meio do método de PDFF - Proton Density Fat Fraction, será utilizada para a quantificação de gordura hepática e da elastografia (para a avaliação da evolução para fibrose) será realizada conjuntamente nas visitas 1 e 4. Serão avaliados nas visitas 1 (pré-avaliação) e visita 4 (pós intervenção) peso, altura, IMC, circunferência abdominal (CA) e pregas triptal e subescapular além da bioimpedância para avaliação de composição corporal, realizada pelo aparelho Inbody 520®, realizadas pelo mesmo avaliador, que não terá

conhecimento do grupo do paciente. Glicemia, perfil lipídico, insulina, ferritina, AST, ALT, GGT, HOMA-IR, vitamina D, PCR-US, TNF-alfa, IL-10 e IL-6, ácido hialurônico e adiponectina serão coletados. Na visita 1, visita 2 (4 semanas após a intervenção), visita 3 (8 semanas após a intervenção) e visita 4, serão obtidos recordatório alimentar de 24h, com avaliação quantitativa da ingestão por meio de álbum fotográfico padronizado e validado e aplicação do IPAQ-c para descrição da atividade física Critério de Inclusão: 1) adolescentes de 10 a 19 anos; 2) ter qualquer grau de obesidade, baseado no indicador IMC/idade acima de +2 escores z da curva da OMS(53); 3) diagnóstico ultrassonográfico prévio de DHGNA; 4) consentam em participar do estudo, mediante assinatura do TCLE (termo de consentimento livre e esclarecido) e TALE5) histórico prévio de assiduidade ao serviço (ausência de faltas no ano anterior), 6) não apresentar diabetes mellitus (glicemia de jejum abaixo de 100 mg/dl); 7) Ser da região metropolitana e de Salvador Critério de Exclusão: 1) obesidade endógena, comorbidade psiquiátrica ou doença que interfira diretamente na evolução ponderal; 2) uso de medicações como metformina, estatinas, laxantes, antibióticos, antidepressivos, corticóides, ansiolíticos e/ou qualquer outra medicação que possa interferir na microbiota intestinal ou ter dano hepático como reação adversa 3) participantes classificados como PIGs (pequenos para idade gestacional) ao nascimento.

Tamanho da amostra: n=60

Hipótese: O uso de probióticos, neste caso cepas de *Lactobacillus Acidophilus* e *Bifidobacterium*

**Endereço:** AVENIDA DOM JOÃO VI, 275  
**Bairro:** BROTAS  
**UF:** BA **Município:** SALVADOR  
**Telefone:** (71)3276-8225

**CEP:** 40.290-000

**E-mail:** cep@bahiana.edu.br



Continuação do Parecer: 3.095.307

Lactis, reduz o percentual de gordura hepática obtido pelo PDFF (Proton Density Fat Fraction) e outros marcadores bioquímicos (Glicemia, perfil lipídico, insulina, ferritina, AST, ALT, GGT, HOMA-IR, vitamina D, PCR-US,

TNF-alfa, IL-10 e IL-6, ácido hialurônico e adiponectina) e antropométricos (indicador IMC/idade, circunferência abdominal (CA), pregas triéptal e subescapular e composição corporal). Análise dos dados: As variáveis quantitativas serão descritas com média (desvio-padrão) e medidas de frequência simples e relativas serão utilizadas para descrever as variáveis categóricas. Para comparar os exames laboratoriais, percentual de gordura hepática via ressonância nuclear magnética (método PDFF) e os parâmetros antropométricos entre as visitas 4 e 1 será utilizado o teste t para amostras pareadas ou o teste não paramétrico de Wilcoxon SignRank, se indicado. A avaliação da variação do peso, IMC e CA e composição corporal através da bioimpedância entre as visitas 1, 2, 3 e 4 será analisada pela análise de variância de medidas repetidas (MANOVA). A incidência de melhora da DHGNA, em cada grupo (intervenção e placebo), será calculada mediante a razão entre os casos que obtiveram melhora da DHGNA e o total de participantes do grupo, multiplicado por 100. O risco relativo (RR) com os respectivos IC95% será obtido para cálculo da eficácia. Ajuste de confundimento para

consumo alimentar, nível de atividade física e valores de gordura hepática iniciais serão realizados pela obtida pela Regressão de Poisson com variância robusta que estimará os RR ajustados com os respectivos IC95%. O programa STATA, versão 13.0 será utilizado para realizar as análises. Valores de  $p < 0,05$  serão considerados estatisticamente significantes.

**Desfecho Primário:** O percentual de gordura hepática obtido pelo PDFF, desfecho primário deste estudo, será avaliado como contínuo, baseado nas diferenças entre os valores da visita 4 (pós-intervenção) e visita 1 (pré-intervenção). Será considerado melhora da DHGNA uma redução de 15% ou mais da fração média de gordura hepática (52), utilizada como variável dicotômica. **Desfecho Secundário:** 1) Antropométricos

(IMC, circunferência abdominal (CA) e pregas triéptal e subescapular além da bioimpedância para avaliação de composição corporal); 2) Laboratoriais (Glicemia, perfil lipídico, insulina, ferritina, AST, ALT, GGT, HOMA-IR, vitamina D, PCR-US, TNF-alfa, IL-10 e IL-6, ácido hialurônico e adiponectina); 3) Consumo alimentar; 4) Atividade física.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

- Folha de rosto: devidamente apresentada com dados e assinaturas;
- TCLE e TALE: apresenta e aborda em linguagem acessível os aspectos pertinentes ao

<b>Endereço:</b> AVENIDA DOM JOÃO VI, 275	<b>CEP:</b> 40.290-000
<b>Bairro:</b> BROTAS	
<b>UF:</b> BA	<b>Município:</b> SALVADOR
<b>Telefone:</b> (71)3276-8225	<b>E-mail:</b> cep@bahiana.edu.br





Continuação do Parecer: 3.095.307

consentimento livre e esclarecido dos participantes e seu responsável legal;

- Cronograma: coleta de dados prevista para 07/01/2018 a 31/05/2018, informam envio de relatórios parcial e final ao CEP;

-Orçamento: R\$56.145,00. Os pesquisadores informam que esse protocolo será submetido ao Edital Universal do CNPq para buscar financiamento para compra de material;

- Responde pendências relativas a:

\* Anuências: Apresenta termos de anuências do Hospital Professor Edgard Santos, assinado pelo chefe do setor de atenção a saúde da criança e do adolescente; termo de anuência do Ambulatório Saúde Bahina do Centro Médico da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, devidamente assinado pelo responsável técnico; e termo de anuência da Delfin Medicina Diagnóstica, assinado pelo responsável técnico;

\* Uso do probiótico pelo grupo controle em caso de benefício comprovado: os pesquisadores informam que será oferecido também ao grupo controle o probiótico em caso de benefício comprovado. Também que, ambos os grupos poderão utilizar probiótico através de orientação para uso de cepas habitualmente disponíveis.

#### **Recomendações:**

Recomendamos que, dentro do possível, o TCLE seja resumido sem perder o seu teor. Documentos muito extensos podem se tornar confundidores.

#### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Após reanálise bioética embasada na Res. 466/12 e documentos afins, as pendências assinaladas no Parecer Consubstanciado de nº 3.006.293

relativas a inclusão das cartas de anuência das coparticipantes, e benefícios foram devidamente sanadas garantindo a execução deste projeto dentro da metodologia e objetivos propostos.

#### **Considerações Finais a critério do CEP:**

Atenção : o não cumprimento à Res. 466/12 do CNS abaixo transcrita implicará na impossibilidade de avaliação de novos projetos deste pesquisador.

#### **XI DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL**

XI.1 - A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

**Endereço:** AVENIDA DOM JOÃO VI, 275

**Bairro:** BROTAS

**UF:** BA

**Telefone:** (71)3276-8225

**Município:** SALVADOR

**CEP:** 40.290-000

**E-mail:** cep@bahiana.edu.br



Continuação do Parecer: 3.095.307

- XI.2 - Cabe ao pesquisador: a) e b) (...)
- c) desenvolver o projeto conforme delineado;
  - d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final;
  - e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento;
  - f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa;
  - g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e
  - h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1182619.pdf	18/11/2018 08:15:36		Aceito
Outros	Carta_CEP_respostas_Pendencias.pdf	18/11/2018 08:13:25	NEY CRISTIAN AMARAL BOA SORTE	Aceito
Outros	Anuencia_Delfin_Imagem.pdf	18/11/2018 08:11:40	NEY CRISTIAN AMARAL BOA SORTE	Aceito
Outros	Anuencia_Hupes_Ambulatorio.pdf	18/11/2018 08:11:12	NEY CRISTIAN AMARAL BOA SORTE	Aceito
Outros	Anuencia_Bahiana_ADAB.pdf	18/11/2018 08:10:44	NEY CRISTIAN AMARAL BOA SORTE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_vFINAL_CEP_SUBMISSAO_alteracoes_destacadas.pdf	18/11/2018 08:10:04	NEY CRISTIAN AMARAL BOA SORTE	Aceito
Cronograma	Cronograma_Protocolo_ECR_Probioticos_e_DHGNA_versao_CEP_Resposta_pendencias.pdf	18/11/2018 08:09:48	NEY CRISTIAN AMARAL BOA SORTE	Aceito
Outros	Encaminhamento_Protocolo_ECR_DHGNA_Probioticos.pdf	17/10/2018 02:31:45	NEY CRISTIAN AMARAL BOA SORTE	Aceito
Outros	CV_lattes_Carolina_Santos_Mello.pdf	17/10/2018 02:27:39	NEY CRISTIAN AMARAL BOA SORTE	Aceito

**Endereço:** AVENIDA DOM JOÃO VI, 275

**Bairro:** BROTAS

**CEP:** 40.290-000

**UF:** BA

**Município:** SALVADOR

**Telefone:** (71)3276-8225

**E-mail:** cep@bahiana.edu.br





Continuação do Parecer: 3.095.307

Outros	CV_lattes_Anibal_Santos_Jr.pdf	17/10/2018 02:27:22	NEY CRISTIAN AMARAL BOA SORTE	Aceito
Orçamento	Orcamento_vFINAL_CEP_SUBMISSAO.pdf	17/10/2018 02:18:51	NEY CRISTIAN AMARAL BOA SORTE	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_Compromisso_Pesquisador_Protocolo_DHGNA_Probioticos.pdf	17/10/2018 02:18:35	NEY CRISTIAN AMARAL BOA SORTE	Aceito
Outros	Justificativa_Placebo_Protocolo_DHGNA_Probioticos.pdf	17/10/2018 02:00:44	NEY CRISTIAN AMARAL BOA SORTE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Protocolo_ECR_Probioticos_DHGNA_vFINAL_CEP_SUBMISSAO.pdf	17/10/2018 01:52:33	NEY CRISTIAN AMARAL BOA SORTE	Aceito
Folha de Rosto	Folha_Rosto_Protocolo_DHGNA_Probioticos.pdf	17/10/2018 01:52:09	NEY CRISTIAN AMARAL BOA SORTE	Aceito
Outros	CV_lattes_Junaury_Barreto.pdf	17/10/2018 01:48:59	NEY CRISTIAN AMARAL BOA SORTE	Aceito
Outros	CV_lattes_Ney_Boa_Sorte.pdf	17/10/2018 01:48:41	NEY CRISTIAN AMARAL BOA SORTE	Aceito
Outros	CRF_Protocolo_DHGNA_Probioticos_vFINAL_CEP_SUBMISSAO.pdf	17/10/2018 01:44:26	NEY CRISTIAN AMARAL BOA SORTE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_vFINAL_CEP_SUBMISSAO.pdf	17/10/2018 01:43:04	NEY CRISTIAN AMARAL BOA SORTE	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SALVADOR, 19 de Dezembro de 2018

Assinado por:  
**Roseny Ferreira**  
(Coordenador(a))

**Endereço:** AVENIDA DOM JOÃO VI, 275

**Bairro:** BROTAS

**UF:** BA

**Município:** SALVADOR

**Telefone:** (71)3276-8225

**CEP:** 40.290-000

**E-mail:** cep@bahiana.edu.br

## Anexo I - Artigo Publicado: Heightened Plasma Levels of Transforming Growth Factor Beta (TGF- $\beta$ ) and Increased Degree of Systemic Biochemical Perturbation Characterizes Hepatic Steatosis in Overweight Pediatric Patients: A Cross-Sectional Study.



Article

### Heightened Plasma Levels of Transforming Growth Factor Beta (TGF- $\beta$ ) and Increased Degree of Systemic Biochemical Perturbation Characterizes Hepatic Steatosis in Overweight Pediatric Patients: A Cross-Sectional Study

Junaura R. Barretto <sup>1,2,†</sup>, Ney Boa-Sorte <sup>1,2,3,†</sup>, Caian L. Vinhaes <sup>4,5,6,†</sup>, Hayna Malta-Santos <sup>4,7</sup>, Jessica Rebouças-Silva <sup>4,7</sup>, Camila F. Ramos <sup>1</sup>, Monica A. S. Torres-Nascimento <sup>1</sup>, Valeria M. Borges <sup>4,7</sup> and Bruno B. Andrade <sup>1,4,5,6,7,8,\*</sup>

<sup>1</sup> Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador 41150-100, Brazil; junaura@gmail.com (J.R.B.); neyboasorte@gmail.com (N.B.-S.); cmilafr.nut@gamil.com (C.F.R.); monicatorres@bahiana.edu.br (M.A.S.T.-N.)

<sup>2</sup> Fima Lifshitz Metabolic Unit, Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador 40170-110, Brazil

<sup>3</sup> Departamento de Ciências da Vida, Universidade do Estado da Bahia, Salvador 48000-000, Brazil

<sup>4</sup> Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador 40296-710, Brazil; caianleal@gmail.com (C.L.V.); haynamalta@gmail.com (H.M.-S.); jeureboucas@gmail.com (J.R.-S.); vborges@bahia.fiocruz.br (V.M.B.)

<sup>5</sup> Multinational Organization Network Sponsoring Translational and Epidemiological Research (MONSTER) Initiative, Salvador 41810-710, Brazil

<sup>6</sup> Curso de Medicina, Faculdade de Tecnologia e Ciências, Salvador 45600-080, Brazil

<sup>7</sup> Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador 40170-110, Brazil

<sup>8</sup> Curso de Medicina, Universidade Salvador (UNIFACS), Laureate Universities, Salvador 41770-235, Brazil

\* Correspondence: bruno.andrade@fiocruz.br; Tel.: +55-71-3176-2264

† These authors equally contributed to the work.

Received: 24 April 2020; Accepted: 29 May 2020; Published: 2 June 2020



**Abstract:** Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) is a common cause of chronic liver disease in childhood and strongly associated with obesity. Routine biochemical non-invasive tests remain with low accuracy for diagnosis of NAFLD. We performed a cross-sectional study to examine potential associations between anthropometric and biochemical parameters, specially TGF- $\beta$ , a prognosis marker for hepatic steatosis (HS). Between May and October 2019, seventy-two overweight adolescents were enrolled, of which 36 had hepatic steatosis. Hepatic, lipidic and glycemic profiles, and levels of vitamin D, ferritin and TGF- $\beta$  were analyzed. Hierarchical cluster and a discriminant model using canonical correlations were employed to depict the overall expression profile of biochemical markers and the biochemical degree of perturbation. Median values of alanine aminotransferase (ALT), gamma glutamyl transpeptidase (GGT), and TGF- $\beta$  were higher in the adolescents with HS. Values of body mass index (BMI)/age and ALT, but not of TGF- $\beta$ , were gradually increased proportionally to augmentation of steatosis severity. In a multivariate analysis, TGF- $\beta$  plasma concentrations were associated with occurrence of hepatic steatosis independent of other covariates. Discriminant analysis confirmed that TGF- $\beta$  concentrations can identify HS cases. Our data reveal that HS patients exhibit a distinct biosignature of biochemical parameters and imply TGF- $\beta$  as an important biomarker to evaluate risk of steatosis development.

**Keywords:** non-alcoholic fatty liver disease; pediatric obesity; transforming growth factor beta; systemic biochemical perturbation; transaminases; cross-sectional studies

## 1. Introduction

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) represents a generic term that includes hepatic steatosis, nonalcoholic steatohepatitis (NASH), and the evolution to fibrosis or cirrhosis [1,2]. Such a condition develops in the absence of secondary causes, such as medications or metabolic diseases [1,2]. NAFLD is the most common cause of chronic liver disease in adults and children, affecting 2.6% of children and 9.6% of adolescents [3–5]. Of note, the prevalence is even higher among obese children and adolescents, varying between 12 to 80% [4,6,7]. Hence, a higher prevalence of childhood obesity and its associated comorbidities, especially metabolic syndrome and dyslipidemia, is followed by increases in the prevalence and severity of NAFLD [1,4,5,8–10]. Furthermore, severe obesity is also associated with more adverse clinical outcomes and greater risk of progression to NASH and cirrhosis in childhood [11,12].

In adults, NASH is associated with increased all-cause mortality, cirrhosis, and end-stage liver disease [2,13]. In childhood, despite the lack of data about the NAFLD prognosis in these patients, morbidity and mortality has been described to be higher than in adults [1,5,14]. Despite the fact that there are a number of noninvasive tests and scoring systems available to characterize NAFLD and NASH, the diagnosis of NASH requires a histopathology analysis of liver biopsy demonstrating steatosis, inflammation, and cytological ballooning of liver hepatocytes [2]. Albeit being strictly necessary for confirmatory diagnosis, histopathological examination of hepatic tissue is rarely performed in asymptomatic pediatric patients because it is an invasive method with potential complications [1,15]. In this scenario, biochemical analyzes and ultrasound are the most commonly used methods to perform initial diagnosis of NASH [2]. Of note, the most accessible image examination, standard ultrasound, is able to show the presence of hepatic steatosis, but it lacks accuracy to demonstrate inflammation or fibrosis, which limits its use to identify early manifestations of NASH.

Hepatic steatosis (HS) is necessary to occur but it seems that other mechanisms are required to fully explain the pathogenesis of NASH [16]. Recent studies have shown that the pathogenesis of NAFLD and NASH involves a metabolic perturbation, including impaired glycemic control, altered lipid metabolism, and insulin resistance [17]. In fact, an imbalanced relationship between triglyceride (TG) production or uptake by the liver and clearance or removal is thought to underlie the HS [18]. More recently, it has been suggested that an intricate association between the intestinal microbiome and adipokines secreted by adipose tissue results in lipotoxicity, oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and hepatic inflammation [10,18,19].

Several biochemical tests such as alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase, gamma glutamyl transpeptidase (GGT), insulin, and triglycerides have been studied in the context of diagnostic investigation of NAFLD, but such markers have been shown to exhibit low capacity to clearly identify patients with this condition [1,5,20,21]. Similarly, systemic inflammatory markers, such as ultra-sensitive C reactive protein (US-CRP), which has been previously described as a marker of liver inflammation in adults and children, had proven to be limited to evaluate liver damage [1,5,20,21]. In this setting, novel biomarkers not yet routinely used in clinical practice, such as hemoxygenase-1 (HO-1), and transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ), have been suggested as having great potential to help assessment of NAFLD [22–26].

Here, we performed a detailed description of biochemical profiles associated with hepatic steatosis in children, to potentially delineate novel insights in the pathogenesis of NAFLD. We also aimed at identifying candidate biomarkers measured in blood that could help diagnose this condition.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Study Design and Participants

We performed a cross-sectional study in Salvador Bahia, northeast of Brazil, with a non-casual sample, including 72 overweight adolescents, screened to a clinical trial and attended at the Bahiana School of Medicine and Public Health outpatient clinic between May and October 2019. Participants



of both sexes aged between 10 and 19 years were selected. Overweight, obesity, and severe obesity were defined based, respectively, on the body mass index-for-age (BMI-for-age, z-score) indicator above +1, +2, and +3 z scores using the WHO reference [27]. After signing the informed consent form (legal guardians), all participants were submitted to abdominal ultrasound examination, collection of laboratory tests and medical and nutritional consultation. Patients with obesity of endogenous etiology, had a genetic syndrome, or who had previous liver diseases were excluded from the study.

## 2.2. Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Diagnosis

After a minimum period of two hours of fasting, ultrasound examination was performed using a Canon brand Xario 100 Platinum<sup>®</sup> device, using a 2 to 5 MHz convex transducer after. Hepatic steatosis diagnosis and classification (grades I, II, and III) were investigated, based on changes in liver echogenicity, in the identification of intrahepatic vessels and the diaphragm, according to criteria described by Hamaguchi et al. [28]. All ultrasound examinations were performed at the research institute by a single radiologist (the author M.T.N.).

## 2.3. Clinical, Anthropometric, and Biochemical Procedures

Clinical and anthropometric characteristics were measured by a pediatrician and a dietician, these included weight (kg), height (cm), waist circumferences (cm), and blood pressure (mmHg). A Body Composition Analyzer InBody520<sup>®</sup> (Biospace Co., Ltd., Urbandale, IA, USA) was used to measure body weight. To measure height, a portable stadiometer<sup>®</sup> (SECA 206, SECA Medical Measuring Systems and Scales, Hamburg, Germany) was used. The body mass index (BMI) was calculated using the standard formula as kg/m<sup>2</sup>. The abdominal circumference was measured using a non-elastic millimeter tape measure, the reference point being the midpoint between the iliac crest and the last rib [29].

Blood pressure was measured twice using an automatic medical grade monitor OMRON Control HEM-7122<sup>®</sup> (OMRON Co., Osaka, Japan). The first measurement was taken after five minutes of rest, while participants were sitting with the dominant arm supported at heart level. The second measurement was taken in the same way, five minutes after [30].

An overnight fasting blood sample was collected in a vacutainer from each participant and centrifuged using a standard tabletop centrifuge for the separation of serum using standardized laboratory techniques and sent for assays to determine concentrations of fasting glucose, insulin, total cholesterol (totC), low density cholesterol (LDL-c), high density cholesterol (HDL-c), triglycerides (TG), urea, creatinine, ultrasensitive CRP (us-CRP), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), gamma-glutamyl transferase (GGT), alkaline phosphatase, total bilirubin and fractions, vitamin D, free thyroxine (fT4), thyroid-stimulating hormone (TSH) and ferritin using an automated biochemical analyzer (Cobas c8000-Roche Diagnostics International Ltd., Risch-Rotkreuz, Switzerland). In EDTA tubes, hematological analyses were performed using standardized laboratory techniques (XN1000S-Sysmex<sup>®</sup>, Kobe, Japan). Plasma levels of Transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) and heme oxygenase-1 (HO-1) were measured using single enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's instructions. Of note, we quantified the active form of soluble TGF- $\beta$  following the manufacturer's protocol.

## 2.4. Obesity Definition

Abdominal obesity was defined by waist circumference > 90th percentile to sex and to age according to Freedman et al. [29]. Systemic Arterial Hypertension (SAH) was defined according to the American Society of Pediatrics criteria [30]. Diagnosis of Metabolic Syndrome was obtained using the IDF criteria [31]. The severity of hepatic steatosis was categorized on three levels (0 = no steatosis; 1 = mild steatosis-grade I by USG; 2 = moderate/severe-grades II and III by USG).

## 2.5. Statistical Analysis

Descriptive statistics were performed to characterize the study population. Continuous variables were tested for Gaussian distribution using the D'Agostino-Pearson test. No variables exhibited normal distribution. The median values with interquartile ranges were used as measures of central tendency and dispersion, respectively. The Mann-Whitney *U* test (comparing 2 groups) or Kruskal–Wallis test with the Dunn's multiple-comparison or non-parametric linear trend ad hoc tests (for more than 2 groups) were used to compare continuous variables whereas the Pearson's chi-square test was used to compare variables displayed as percentages. Hierarchical cluster analyses (Ward's method) of log<sub>10</sub> transformed and z-score normalized data were employed to depict the overall expression profile of indicated biochemical markers in the study subgroups. All comparisons were pre-specified and two-tailed. Differences with *p*-values below 0.05 after Holm-Bonferroni's adjustment for multiple comparisons were considered statistically significant. Profiles of correlation between biochemical parameters were examined using network analysis of the Spearman correlation matrices. Correlations with *p*-value < 0.05 were included in the network visualization. Spearman rank values ( $\rho$ ) were used to describe the strength of correlations between grade/severity of hepatic steatosis and circulating concentrations of biochemical parameters.

A discriminant model using sparse canonical correlation analysis (CCA) was employed to assess whether a combination of circulating biomarkers could discriminate individuals with hepatic steatosis from those without this condition. Our experience with biomarkers has revealed that not only is the concentrations of a given parameter important, but also the correlation profile with other parameters is critical in evaluation of its involvement in a biological phenomenon [32,33]. Thus, we employed basically two types of analyses: one based on individual concentration values and a second exploring the profile of correlations between several markers in each clinical group. Following this idea, the discriminant model used in the exploration of the data was based on CCA. In this analysis, the way each biomarker correlates with each other, rather than its concentration values, is used to infer differences between the study groups [32,34]. This model is not based on number of correlations, but the quality (whether a correlation is positive or negative) and strength ( $\rho$  value) are computed to test dissimilarities between the groups.

The molecular degree of perturbation (MDP) was calculated using values of the biochemical parameters to infer the degree of biochemical perturbation (DBP) associated with hepatic steatosis. This method has been used and detailed previously [33–35]. In the present study, "No steatosis" was defined as the "reference" group, and the average level and standard deviation of this reference group were calculated for the plasma concentrations of each inflammatory marker. The DBP score of an individual marker in a given sample "s" was defined by taking the difference in concentration level in sample "s" from the average of the marker in reference group divided by the corresponding standard deviation. Thus, the DBP score represents the number of standard deviations from the reference. Individuals who had DBP values above two standard deviations from mean value of controls were considered biochemically perturbed.

A multivariable regression model using variables with univariate *p*-value < 0.2 was performed to assess the odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CIs) of the associations between values of indicated parameters and occurrence of hepatic steatosis. Receiver Operator Characteristics (ROC) curve analysis was employed to test the performance of the plasma levels of TGF- $\beta$  to distinguish patients with or without hepatic steatosis.

The statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA), STATA 11 (StataCorp, College Station, TX, USA), JMP 14.0 (SAS, Cary, NC, USA) and R statistical software.

## 2.6. Ethics Statement

The research project was approved by the Ethics and Research Committee of Bahiana School of Medicine and Public Health (protocol 3.095.307/2018). Written informed consent was obtained from

all participants or their legally responsible guardians, and all clinical investigations were conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki.

### 3. Results

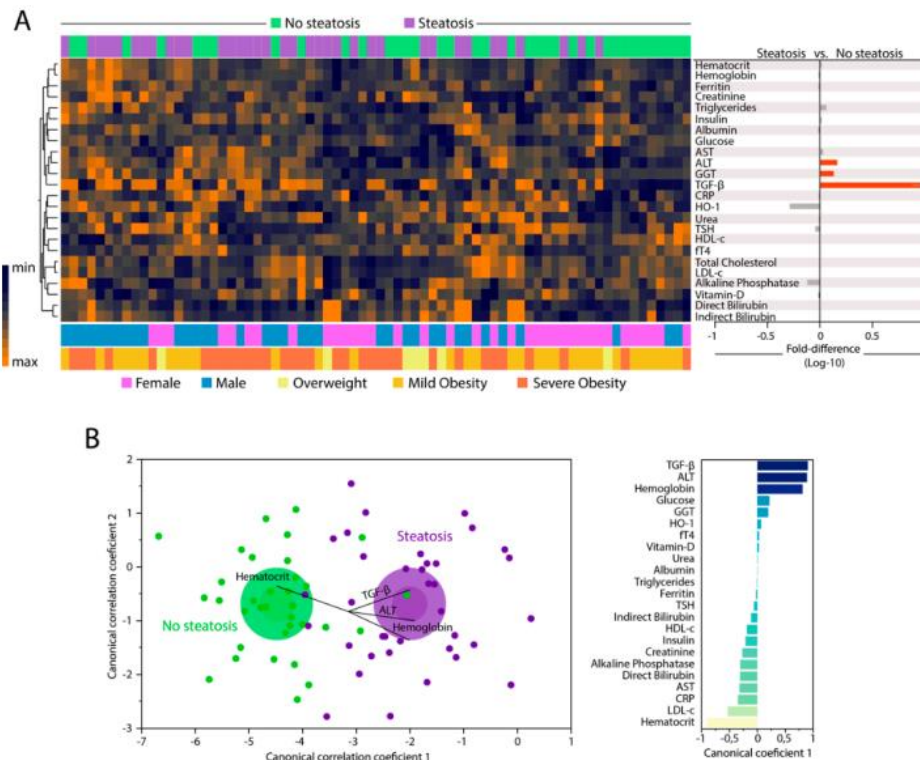
#### 3.1. Characteristics of Participants

A total of 72 participants were enrolled, 36 without hepatic steatosis and 36 with hepatic steatosis. The median age was lower in individuals without steatosis (12 years old, IQR: 10.2–14.7) than in those with steatosis (14 years old, IQR: 12–16) ( $p = 0.009$ , Table S1). The groups of patients stratified according to diagnosis of steatosis were similar with regard to sex ( $p = 0.47$ , Table S1). The median body mass index-for-age (BMI-for-age) indicator ( $p = 0.012$ ) and waist circumference ( $p = 0.0003$ ) were higher in adolescents with steatosis, but not the frequency of abdominal obesity ( $p = 0.245$ , Table S1). These adolescents with steatosis also more frequently had hypertension and metabolic syndrome than those from the control group (Table S1).

#### 3.2. Changes in Biochemical Parameters in Peripheral Blood Can Distinguish Patients with and without Hepatic Steatosis

We examined the expression of 25 parameters in peripheral blood to compare the biochemical/inflammatory profiles of individuals with or without hepatic steatosis. A summary of the univariate comparisons is described in Table S2. Unsupervised hierarchical clustering analysis of the log<sub>10</sub>-transformed and z-score normalized values/concentrations of each parameter revealed no clear distinction of biochemical profiles between the study groups when all markers were examined simultaneously. Individuals with hepatic steatosis exhibited a tendency of decreased levels of HO-1 and alkaline phosphatase, and increased levels of triglycerides, AST, ALT, GGT, and TGF- $\beta$  (Figure 1A, left panel and Figure S1). Furthermore, fold-difference analysis of the circulating concentrations of each biochemical marker are summarized in Figure 1A, right panel. Among all markers, only median values of ALT, GGT, and TGF- $\beta$  were statistically distinct between the study groups, with higher values being detected in the group of participants with hepatic steatosis (all with adjusted  $p$ -values < 0.05). After identifying the consistent changes in the concentrations of biochemical parameters between the clinical groups, we employed a discriminant model using sparse canonical correlation analysis (CCA), as previously described [32–34] to test whether the statistical relationships between the biomarkers, rather their concentrations/values themselves, could be used to distinguish the groups. Using this approach, we found that the patients with hepatic steatosis could be distinguished from those without steatosis with high degree of accuracy (area under the curve (AUC) of the receiver operator characteristics (ROC) curve = 0.97 (CI: 0.85–1.0), sensitivity 91% (CI: 77.0–96.7), specificity 86% (72.0–94.0);  $p < 0.0001$ , Figure 1B, left panel). Assessment of the canonical coefficient values of the CCA model revealed that the most significant markers responsible for the discrimination between individuals with or without steatosis were LDL-c, triglycerides, TGF- $\beta$ , ALT, HDL-c, and hematocrit (Figure 1B, right panel).



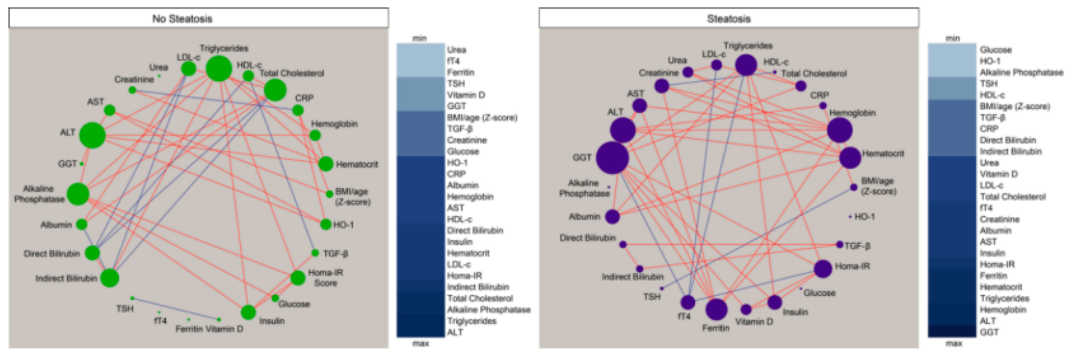


**Figure 1.** Changes in biochemical proteins of peripheral blood distinguish patients with and without hepatic steatosis. Plasma was assessed in samples from patients without hepatic steatosis ( $n = 36$ ) and patients with hepatic steatosis ( $n = 36$ ). Data were Log10 transformed and z-score normalized. **(A)** Left panel: In hierarchical cluster analysis (Ward's method with 100X bootstrap) was employed to depict the overall expression of plasma proteins in study population. Right panel: Average fold-difference values in plasma proteins levels for patients with hepatic steatosis and without steatosis group. Differences which reached statistical significance with the Mann-Whitney  $U$  test adjusted for multiple comparisons using the Holm-Bonferroni's method (Adjusted  $p < 0.05$ ) are represented in colored bars. **(B)** Left panel: In an exploratory approach, a sparse canonical correlation analysis (sCCA) was employed to test whether experimental groups could be distinguished based on correlation profiles of the combined circulating markers. Vector analysis was used to plot the direction of influence of the most significant parameters in the canonical space. Right panel: Canonical coefficient scores were calculated to identify the biomarkers responsible for the difference between groups in the sCCA model. Abbreviations (alphabetic order): ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; CRP: C-reactive protein; fT4: free thyroxine; GGT: gamma-glutamyl transferase; HDL-c: high density cholesterol; HO-1: heme oxygenase-1; TGF- $\beta$ : transforming growth factor  $\beta$ ; TSH: thyroid-stimulating hormone.

### 3.3. Hepatic Steatosis Leads to Consistent Changes in the Profile of Correlations between Blood Biochemical Parameters

Given that we observed in the results presented above that the overall profile of correlations was distinct between the study groups, we then tried to visualize the numerous correlations detected. We employed an approach using network analysis in which Spearman correlations are visualized as connections between the parameters [33–37]. This approach helped us to identify the dynamicity, strength and quality of the relationships between values of the biochemical markers and inflammatory proteins in plasma of the different groups of individuals. We found that networks from the distinct clinical groups displayed differences in complexity and quality of statistical interactions between biochemical markers (Figure 2). Regardless of the clinical group, most of the relevant correlations were positive, meaning that the increases in values of a given marker were followed by heightened

concentrations of other biochemical parameters. Importantly, the density of networks (related to number of statistically significant correlations) was higher in the group of patients with hepatic steatosis.



**Figure 2.** Hepatic steatosis leads consistent changes in correlations between plasma proteins concentrations. Network analysis of the biomarker correlation matrices was performed with bootstrap (100×). Significant correlations ( $p < 0.05$ ) are shown. Each circle represents a different parameter. Circle size infers number of correlations involving each parameter. Lines represent the rho values. Red color infers positive correlation whereas blue color denotes negative correlations. Node analysis heatmap shows the number of statistically significant correlations involving each marker per clinical group. Abbreviations (alphabetic order): ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; BMI: body mass index; CRP: C-reactive protein; fT4: free thyroxine; GGT: gamma-glutamyl transferase; HDL-c: high density cholesterol; HO-1: heme oxygenase-1; Homa-IR: homeostatic model assessment; TGF- $\beta$ : transforming growth factor  $\beta$ ; TSH: thyroid-stimulating hormone.

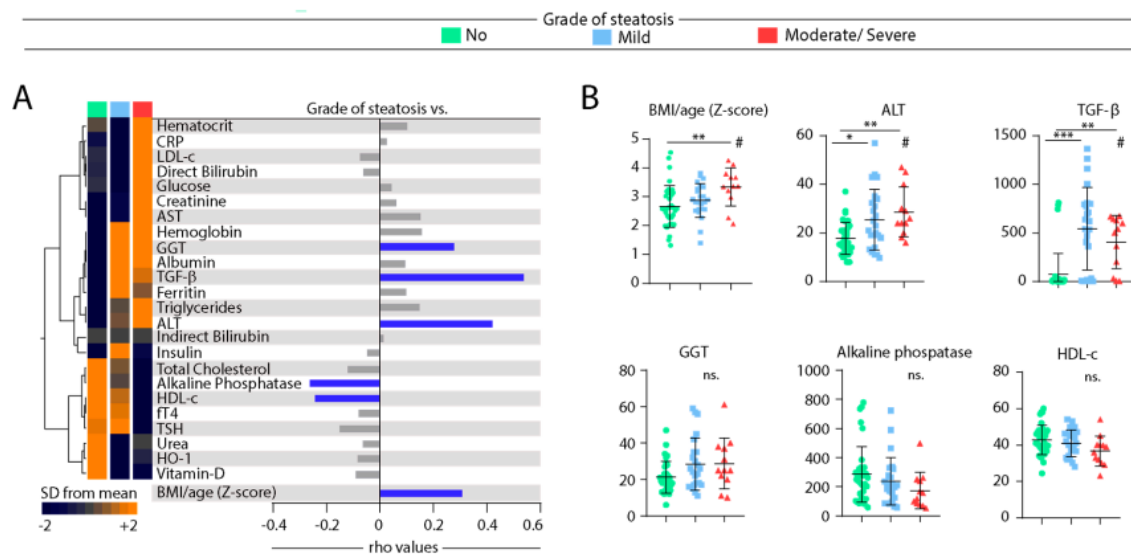
In the group of participants without steatosis, we detected eight negative significant correlations whereas in the group of hepatic steatosis, six negative correlations were observed, highlighting fT4, that exhibited only negative interactions with values of Homa-IR, triglycerides, LDL-c, and GGT. Of note, the markers exhibiting the highest number of significant relationships in the group of individuals without hepatic steatosis were alkaline phosphatase, ALT, and triglycerides (Figure 2, left panel) whereas in the group of patients with steatosis, GGT, ALT, and hemoglobin were the markers with the highest connectivity in the networks (Figure 2, right panel). The analyses also revealed that TGF- $\beta$  was not the marker with the highest number of correlations in the distinct matrices. However, such marker was related with different parameters in the networks, and with distinct correlation profile (positive vs. negative correlations) (Figure 2), which explained in part why TGF- $\beta$  was relevant to explain the differences between the study groups described in the discriminant model based on correlations described in Figure 1B. Thus, these results argue that hepatic steatosis is associated with alterations in the profile of correlations between values of the biochemical parameters evaluated here.

### 3.4. Associations between Grade of Hepatic Steatosis and Values of Biochemical Parameters in Peripheral Blood

We next tested whether gradual increases in the severity of hepatic steatosis are proportional to changes in values of biochemical parameters in blood. Median values of each biochemical parameter per group of individuals stratified according to the grade of hepatic steatosis were calculated (Table S3). These values were log<sub>10</sub>-transformed, and z-score normalized, to build a heatmap to illustrate trends in data variation (Figure 3A, left panel). This analysis revealed that the individuals stratified based on the grade of steatosis exhibit a distinct expression profile of biochemical parameters. Hierarchical clustering of the biochemical parameters could identify three principal clusters. The first cluster displayed relatively higher values of hematocrit, CRP, LDL-c, direct bilirubin, glucose, creatinine, and AST in those with ultrasonographic diagnosis of moderate or severe steatosis (Figure 3A, left panel). The second cluster exhibited markers that had similar levels between the groups with mild or moderate/severe steatosis, with increased levels of hemoglobin, GGT, and albumin. In addition, TGF- $\beta$  levels were relatively higher in the group of mild disease, whereas triglycerides and ALT values were higher in



moderate/severe steatosis (Figure 3A, left panel). The last cluster showed increased levels of total cholesterol, alkaline phosphatase, HDL-c, ft4, urea, HO-1, and vitamin D in the group of individuals without hepatic steatosis (Figure 3A, left panel).

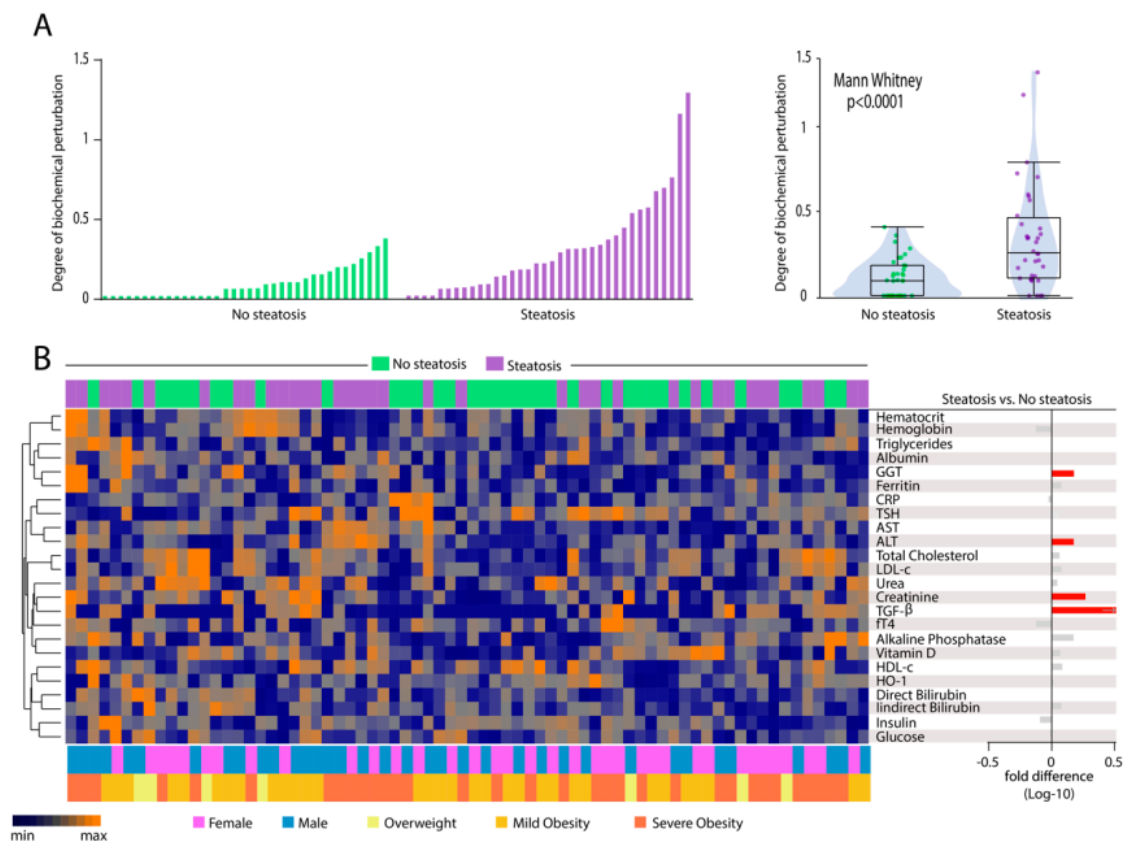


**Figure 3.** Spearman correlation of biochemical parameters in blood of patients according grade of hepatic steatosis. (A) Left panel: Data on each parameter was Log10 transformed. Mean values for each indicated clinical group were z-score normalized and a Hierarchical cluster analysis was performed to illustrate the overall biochemical profiles according the grade of diseases. Right panel: Correlation between grade of hepatic steatosis and biochemical parameters. Spearman correlation analysis was used, and rho values are shown. Blue lines represent correlations with statistical relevance. (B) Scatterplots of concentrations of indicated parameter which values presented statistically significant differences between the study groups using the Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons ad hoc test (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , ns: nonsignificant) # represent statistical significance ( $p < 0.05$ ) of non-parametric linear trend ad hoc test. Bars represent median values whereas whiskers represent the interquartile ranges. Abbreviations (alphabetic order): ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; BMI: body mass index; CRP: C-reactive protein; ft4: free thyroxine; GGT: gamma-glutamyl transferase; HDL-c: high density cholesterol; HO-1: heme oxygenase-1; TGF-β: transforming growth factor β; TSH: thyroid-stimulating hormone.

The concentration values of each biomarker were further examined for direct correlation with the grade of hepatic steatosis using the Spearman correlation test (Figure 3A, right panel). Values of GGT, TGF-β, ALT, and BMI/age presented positive correlation, whereas those of alkaline phosphatase and HDL-c were negatively correlated, with grade of hepatic steatosis (Figure 3A, right panel). Figure 3B shows scatter plots with distribution of the six parameters which were statistically associated with hepatic steatosis severity in the correlation analysis. We observed that median values of BMI, ALT, and TGF-β were increased in individuals with steatosis using the Kruskal-Wallis test. Median values of GGT, alkaline phosphatase and HDL-c did not exhibit a clear variation following the degree of steatosis. Of note, although the concentrations of TGF-β were higher in individuals with HS, the values were indistinguishable between patients with mild disease and those with moderate/severe presentation (Figure 3B). Furthermore, we examined in more detail the correlations between values of BMI, ALT, and TGF-β when all the study participants were investigated as a single group, regardless of steatosis (Figure S2). Importantly, concentration of both TGF-β and ALT were positively correlated with BMI/age Z-score values ( $r = 0.23$ ;  $p = 0.04$  and  $r = 0.34$ ;  $p = 0.003$ , respectively). Similar analysis also revealed a positive correlation between levels of TGF-β and ALT ( $r = 0.31$ ;  $p = 0.0006$ ).

### 3.5. Patients with Hepatic Steatosis Display Higher Degree of Biochemical Perturbation in Peripheral Blood

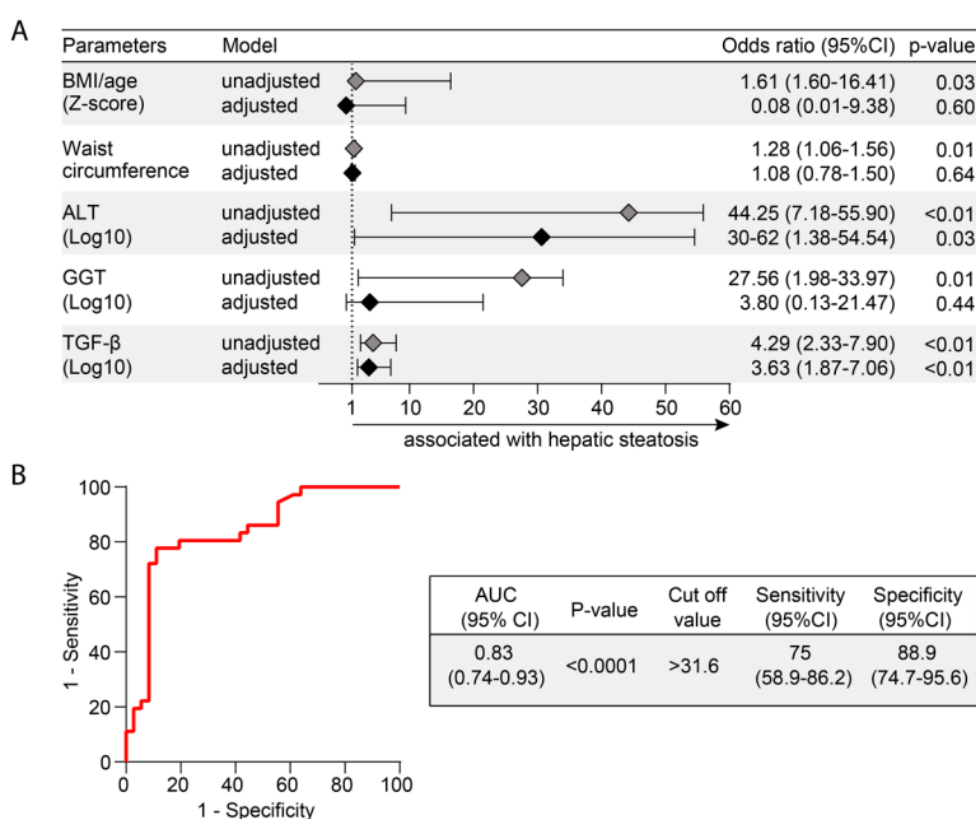
To deepen the analyses in overall disturbances in biochemical profiles, we calculated the Degree of Biochemical Perturbation (DBP, as described in Methods) (Figure 4A), which is an adaptation from the molecular degree of perturbation previously published [33–35]. We found that patients with hepatic steatosis exhibited substantial increase in DBP score values compared to those without steatosis ( $p < 0.0001$ ). We next employed a hierarchical clustering analysis using the DBP values calculated for each biomarker (Figure 4B). Although the overall DBP values were on average higher in individuals with hepatic steatosis, the individual DBP values calculated for each biomarker could not clearly distinct the subgroups of participants stratified by occurrence of steatosis (Figure 4B), degree of steatosis (Figure S3) or degree of obesity (Figure S4) as well as by sex (Figure 4B). Only perturbations of ALT, GGT, creatinine, and TGF- $\beta$  were statistically higher in steatosis (Figure 4B, right panel). Our findings reinforce the hypothesis that hepatic steatosis is hallmarked by an altered overall biochemical profile in peripheral blood.



**Figure 4.** Hepatic steatosis is associated with increases in degree of biochemical perturbation. **(A)** Left panel: Histograms show the single sample degree of biochemical perturbation (DBP) score values relative to each study group as indicated. Right panel: Box plots represent the distribution of the DBP between study groups. Values were compared between patients with and without steatosis using Mann Whitney  $U$  test. **(B)** Left panel: A hierarchical cluster analysis (Ward's method) was employed to show the molecular degree of perturbation of each biochemical marker. Right panel: Average fold-difference values in DBP for patients with hepatic steatosis and without steatosis group. Abbreviations (alphabetic order): ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; CRP: C-reactive protein; ft4: free thyroxine; GGT: gamma-glutamyl transferase; HDL-c: high density cholesterol; HO-1: heme oxygenase-1; TGF- $\beta$ : transforming growth factor  $\beta$ ; TSH: thyroid-stimulating hormone.

### 3.6. Heightened Plasma Levels of TGF- $\beta$ Hallmarks Hepatic Steatosis

Finally, we employed a multivariate analysis to identify biochemical parameters that could be independently associated with hepatic steatosis. Markers that displayed  $p$ -value  $\leq 0.2$  in univariate comparisons between the groups of participants with or without hepatic steatosis were included in the multivariate model (Tables S1 and S2 and Figure 5A). Importantly, after adjustment for sex, age, BMI/age z score, and waist circumference, increases in 1-log in TGF- $\beta$  plasma concentrations were associated with 3.63 higher odds of hepatic steatosis. We used a ROC curve analysis to calculate accuracy of this potential biomarker of hepatic steatosis. We found that TGF- $\beta$  plasma concentrations (cut off value  $> 31.6$  pg/mL) had a total accuracy of 83% (area under the curve (AUC) of the ROC (95% CI) = 0.83 (0.74–0.93), with 75% sensitivity and 88.9% specificity to diagnose hepatic steatosis.



**Figure 5.** Biochemical parameters associated with hepatic steatosis. **(A)** Multivariable regression model of variables that were statistically significant ( $p < 0.05$ ) in univariate comparisons (see univariate comparisons in Tables S1 and S2). **(B)** Receiver Operator Characteristic (ROC) curves were employed to test the performance of TGF- $\beta$  to distinguish patients with or without hepatic steatosis. Abbreviations (alphabetic order): ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; AUC: area under the curve; BMI: body mass index; 95% CI: 95% confidence interval; GGT: gamma-glutamyl transferase; TGF- $\beta$ : transforming growth factor  $\beta$ .

## 4. Discussion

NASH has recently become the first cause of cirrhosis and liver-related deaths worldwide [38] and remains an important public health problem. The prevalence of NASH is increasing along with the rate of overweight and obesity with the metabolic syndrome [5,8,17]. The detailed description of biochemical profiles of NASH may contribute to understanding of pathophysiological processes and could help the clinical management of these patients. In the present study, we show that obese adolescents with hepatic steatosis exhibit a distinct biochemical profile in peripheral blood. Interestingly, our analyses reveal that these changes in the expression profile of such biochemical parameters are



able to distinguish steatosis patients from those without this condition. Additionally, to the best of our knowledge, this study represents the first attempt to establish an association between elevated levels on TGF- $\beta$  and hepatic steatosis in obese adolescents. Furthermore, the results indicate an important biochemical imbalance in steatosis patients, which could guide further studies of new diagnostics tools and therapeutic targets in order to optimize clinical management.

Inflammation is a coordinated process that occurs with synchronized changes in production of several immunologic and non-immunologic markers [6,39]. Although studies have shown the activation of the inflammatory response in hepatocytes after the lipid accumulation in liver is the principal trigger to NASH [40], the potential influence of other biochemical markers in clinical outcomes is still unknown. In steatosis, activation on the inflammatory pathways is observed in early stage of diseases [41,42] with release of known markers due to their association with injury in hepatic tissue. As expected, our results revealed substantially increases in levels of ALT, GGT, and TGF- $\beta$  in patients with steatosis compared to those without steatosis, and all of such makers have been associated with NASH prediction [43]. The consistent changes in expression of biochemical parameters observed in steatosis group are able to distinguish the different clinical groups compared in the present study, detected by a discriminant analysis based on canonical correlations. Of note, canonical coefficient analysis identified candidate biomarkers likely responsible for the distinction between no steatosis and steatosis groups, such as TGF- $\beta$ , ALT, hemoglobin, and hematocrit.

Importantly, in a previous report with adult patients presenting hepatic steatosis caused by obesity or alcohol, TGF- $\beta$  has been strongly associated with this clinical outcome [44]. Our findings suggest that the disturbed biochemical profile detected in steatosis patients was so substantially different that could reliably distinguish the different study groups. It is possible that the top markers describe above, mainly TGF- $\beta$ , play a significant role in the pathogenesis of liver injury induced during NASH. TGF- $\beta$  is secreted in response to cell damage, and plays the dominant role in the mediation of fibrosis, through its contribution to the activation of stellate cells and their production of extracellular matrix proteins. As detailed recently, TGF- $\beta$  desirable acts through activin receptor-like kinase 5 (ALK5) type I receptor (TGF- $\beta$  RI) and the TGF- $\beta$  type II receptor (TGF- $\beta$  RII) [45]. The serum level of TGF- $\beta$  and the tissue level of TGF- $\beta$  receptor mRNA can be measured and used as diagnostic and prognostic markers for liver diseases [25,45]. This growth factor has many actions in the liver, including: (i) fibrogenesis (ii) growth inhibition (of normal hepatocytes and stellate cells) (iii) mitogenesis (iv) pro-apoptosis and (v) chemo-attraction. Described as a biochemical marker for progression to NASH, there is no description of studies involving the marker in the pediatric age group [26,46]. Considering the crucial role in the development and progression of liver fibrosis [45], we could hypothesize that the majority of obese adolescents studied here present or will evolve to NASH.

Here, two hypotheses should be considered to explain the meaning of increased TGF- $\beta$  and if it is really associated to steatosis alone or in fact is a predictor for fibrosis and NASH. The extremely significant elevation of TGF- $\beta$  levels among our steatosis participants can represent a spectrum of patients who already have steatohepatitis and could not be diagnosed by the impossibility of performing liver biopsy. In fact, we observed that one third of participants with hepatic steatosis ( $n = 12/36$ ) had ALT  $\geq 30$  U/L (data not shown) [47]. Moreover, we observed a significant correlation between ALT and TGF- $\beta$  levels. This hypothesis has some evidence in literature among adults [46]. However, we could not find previously reported data on pediatric patients that could mirror the findings presented here. Further investigation with sequential monitoring of ALT levels and other biochemical parameters and imaging markers and/or a liver biopsy could help in clarifying this possibility in the future. On the other hand, elevated levels of TGF- $\beta$  may also represent patients only with hepatic steatosis without NASH. In fact, 20 of 36 patients exhibited ALT levels  $\leq 25$  U/L [1]. Although ALT is not a definitive biochemical marker to NASH, it is commonly used as indicator of hepatic damage in clinical medicine [47]. Thus, lower levels can be a proxy of absence/minimal hepatic tissue damage. Furthermore, a faster and more severe evolution/progression of the disease is observed in pediatric NAFLD patients compared to adults [11,48,49] and we hypothesize that the elevated levels

of TGF- $\beta$  could be a marker of this condition in pediatric population, although we failed to formally demonstrate that levels of this biomarker directly reads progression of hepatic steatosis. A follow-up of these children and adolescents is underway to clarify this question.

An important contribution of our study was the assessment of the quality and magnitude of the statistical interactions between the biochemical parameters. Spearman correlation matrices have been used in several diseases marked by both acute and chronic inflammation [33,36,50,51] and suggest that changes in the correlation network profile indicate alteration of systemic inflammation status. Indeed, our correlation analyses revealed different profiles between the clinical groups with intense interactions being detected in the group of hepatic steatosis. Interesting, this group was marked by the presence of two positive correlation involving important markers associated with liver diseases. We hypothesize that hepatic steatosis is characterized by a hepatic inflammatory milieu that leads to consistent changes in systemic concentrations of biochemical parameters.

Next, we evaluated the correlation between grade of hepatic steatosis and the concentrations/values of biochemical parameters as well as of BMI. We found that linear increases occurred in BMI and ALT according steatosis severity. Although the levels of TGF- $\beta$  presented higher expression values among children and adolescents with steatosis, these concentrations were not different between patients with mild and those with moderate/severe disease. This observation reinforces the idea that TGF- $\beta$  may be more useful to identify presence steatosis than to infer prognosis/disease progression. In addition, we found that decreases in alkaline phosphatase and HDL-c values were proportional to gradual augmentation of steatosis severity. Further studies are warranted to delineate the molecular mechanisms underlying these associations.

Another important contribution of our results is the assessment to the degree of biochemical perturbation. To our knowledge, no previous study has estimated the global biochemical disturbance in hepatic steatosis patients. We demonstrated that hepatic steatosis is indeed linked to overall higher biochemical imbalance, which was shown to be even more significant in the individuals with obesity, both mild or severe. Our result reinforces the role of obesity, associated with the consequent degree of insulin resistance as a potential factor driving chronic inflammation and implicated in homeostatic disturbance underlying steatosis [52,53].

Finally, using multivariable analysis, we examined the biochemical parameters most associated with hepatic steatosis. Among such parameters, the TGF- $\beta$  was the most robust in the predictive model employed. Importantly, to minimize the possible effects of extra-hepatic TGF- $\beta$  production, as adipose tissue [54], and because levels of this cytokine were positively correlated with values of BMI in the study population, our model was adjusted for BMI/age Z-score and waist circumference. After the adjustment, increases of 1 Log of TGF- $\beta$  levels remained independently associated with 3.63 increased risk of steatosis development. Within the biochemical parameters used in this multivariable analysis was ALT. Spearman correlation analysis revealed a positive association between concentrations of ALT and those of TGF- $\beta$  in the entire study population, reinforcing our hypotheses that the higher levels of TGF- $\beta$  found here are a consequence of liver injury, and not by other tissues production. Of note, it has been demonstrated the importance of TGF- $\beta$  as a critical factor determining steatohepatitis [26,46,55]. Taken together, these data suggest that in patients with hepatic steatosis, there is an up-regulation of markers involved in persistent inflammation, which may contribute to the pathophysiology of hepatic steatosis. Additional studies are needed to investigate the immune activation profile of these patients, in order to suggest new therapeutic targets. In that sense, our finding on the potential use of TGF- $\beta$  plasma levels as an accurate biomarker of hepatic steatosis seems promising. Furthermore, this finding is especially important given that the adolescents studied here were mostly severely obese and traditional biochemical markers such as triglycerides, HDL-c, insulinemia, and HOMA-IR were not able to adequately identify presence of hepatic steatosis. Usually, the assessment of the disease severity is based on noninvasive radiologic examination, specifically ultrasonography [56]. However, this method is subject to errors depending on the operator. In this context, TGF- $\beta$  could emerge as a potential tool in the diagnosis of steatosis, maybe associated with ultrasonography, but without a



clear relevant impact in the evaluation of the grade of hepatic steatosis. Future studies are needed to test and validate the accuracy of TGF- $\beta$ , alone or in association with other non-invasive methods, in a larger number of patients.

Our study has some limitations. The limited sample size, the absence of measurements of other inflammatory cytokines to establish a more detailed profile of the metabolic disorder, and the absence of a histological method for the diagnosis of NASH for a comparison with the results of the non-invasive evaluation performed. In addition, our study design was cross-sectional. Thus, further longitudinal studies are therefore needed in order to assess the chronological relationship between TGF- $\beta$  levels and occurrence of NAFLD to clarify the probable impact of reverse causality. Independent of the direction of this association, further attention should be paid to the good accuracy observed between elevated levels of TGF- $\beta$  and the presence of hepatic steatosis in children and adolescents.

## 5. Conclusions

Our findings reveal that hepatic steatosis patients exhibit a distinct biosignature of biochemical parameters, and that TGF- $\beta$  is an important biomarker that could help evaluate individuals with hepatic steatosis, in association with other non-invasive techniques such as ultrasound.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6643/12/6/1650/s1>. Table S1: Characteristics of the study participants. Table S2: Median values of measured plasma markers. Table S3: Concentration of parameters according to grade of hepatic steatosis. Figure S1: Overall profile of concentrations of biochemical parameters according to occurrence of hepatic steatosis and degree of obesity. Figure S2: Correlations between values of BMI/age, ALT and TGF- $\beta$  in the study population. Figure S3: Degree of biochemical perturbation of each biomarker according to grade of hepatic steatosis. Figure S4: Degree of biochemical perturbation of each biomarker according to degree of obesity.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.R.B., N.B.-S., C.F.R., M.A.S.T.-N., V.M.B. and B.B.A.; Data curation, H.M.-S., J.R.-S. and B.B.A.; Formal analysis, C.L.V. and B.B.A.; Funding acquisition, N.B.-S., V.M.B. and B.B.A.; Investigation, J.R.B., H.M.-S., J.R.-S., C.F.R. and M.T.-N.; Methodology, N.B.-S., V.M.B. and B.B.A.; Project administration, J.R.B., H.M.-S. and J.R.-S.; Resources, J.R.B., N.B.-S. and V.M.B.; Software, N.B.-S., C.L.V. and B.B.A.; Supervision, N.B.-S., V.M.B. and B.B.A.; Validation, V.M.B.; Visualization, B.B.A.; Writing—original draft, J.R.B., C.L.V., C.F.R. and B.B.A.; Writing—review & editing, N.B.-S., M.A.S.T.-N. and B.B.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** The study was supported by the Intramural Research Program of the Institute Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Brazil. Valéria M. Borges and Bruno B. Andrade are senior scientist fellows from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Ney Boa-Sorte received a fellowship from Fundação Nacional de Desenvolvimento do Ensino Superior Particular (FUNADESP). Caian L. Vinhaes and Hayna Malta-Santos received a fellowship from the CNPq. Jéssica Rebouças-Silva received a fellowship from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (finance code 001).

**Acknowledgments:** The authors thank the study participants. We also thank Artur T. L. Queiroz and María B. Arriaga (Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia) for consulting as external statistician and review of all the analyses. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Vos, M.B.; Abrams, S.H.; Barlow, S.E.; Caprio, S.; Daniels, S.R.; Kohli, R.; Mouzaki, M.; Sathya, P.; Schwimmer, J.B.; Sundaram, S.S.; et al. NASPGHAN Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children: Recommendations from the Expert Committee on NAFLD (ECON) and the North American Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (NASPGHAN). *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2017**, *64*, 319–334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Sheka, A.C.; Adeyi, O.; Thompson, J.; Hameed, B.; Crawford, P.A.; Ikramuddin, S. Nonalcoholic Steatohepatitis: A Review. *JAMA* **2020**, *323*, 1175–1183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Nobili, V.; Alkhoury, N.; Alisi, A.; Della Corte, C.; Fitzpatrick, E.; Raponi, M.; Dhawan, A. Nonalcoholic fatty liver disease: A challenge for pediatricians. *JAMA Pediatr.* **2015**, *169*, 170–176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Anderson, E.L.; Howe, L.D.; Jones, H.E.; Higgins, J.P.; Lawlor, D.A.; Fraser, A. The Prevalence of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Children and Adolescents: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0140908. [[CrossRef](#)]
5. Draijer, L.; Benninga, M.; Koot, B. Pediatric NAFLD: An overview and recent developments in diagnostics and treatment. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2019**, *13*, 447–461. [[CrossRef](#)]
6. Mann, J.P.; Valenti, L.; Scorletti, E.; Byrne, C.D.; Nobili, V. Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children. *Semin. Liver Dis.* **2018**, *38*, 1–13. [[CrossRef](#)]
7. Assuncao, S.N.F.; Sorte, N.C.B.; Alves, C.D.; Mendes, P.S.A.; Alves, C.R.B.; Silva, L.R. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) pathophysiology in obese children and adolescents: Update. *Nutr. Hosp.* **2017**, *34*, 727–730. [[CrossRef](#)]
8. Nobili, V.; Alisi, A.; Valenti, L.; Miele, L.; Feldstein, A.E.; Alkhourri, N. NAFLD in children: New genes, new diagnostic modalities and new drugs. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2019**, *16*, 517–530. [[CrossRef](#)]
9. Clemente, M.G.; Mandato, C.; Poeta, M.; Vajro, P. Pediatric non-alcoholic fatty liver disease: Recent solutions, unresolved issues, and future research directions. *World J. Gastroenterol.* **2016**, *22*, 8078–8093. [[CrossRef](#)]
10. Fang, Y.L.; Chen, H.; Wang, C.L.; Liang, L. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease in children and adolescence: From “two hit theory” to “multiple hit model”. *World J. Gastroenterol.* **2018**, *24*, 2974–2983. [[CrossRef](#)]
11. Holterman, A.X.; Guzman, G.; Fantuzzi, G.; Wang, H.; Aigner, K.; Browne, A.; Holterman, M. Nonalcoholic fatty liver disease in severely obese adolescent and adult patients. *Obesity (Silver Spring)* **2013**, *21*, 591–597. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Holterman, A.; Gurria, J.; Tanpure, S.; DiSomma, N. Nonalcoholic fatty liver disease and bariatric surgery in adolescents. *Semin. Pediatr. Surg.* **2014**, *23*, 49–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Rafiq, N.; Bai, C.; Fang, Y.; Srishord, M.; McCullough, A.; Gramlich, T.; Younossi, Z.M. Long-term follow-up of patients with nonalcoholic fatty liver. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2009**, *7*, 234–238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Vajro, P.; Lenta, S.; Socha, P.; Dhawan, A.; McKiernan, P.; Baumann, U.; Durmaz, O.; Lacaille, F.; McLin, V.; Nobili, V. Diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease in children and adolescents: Position paper of the ESPGHAN Hepatology Committee. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2012**, *54*, 700–713. [[CrossRef](#)]
15. Uppal, V.; Mansoor, S.; Furuya, K.N. Pediatric Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **2016**, *18*, 24. [[CrossRef](#)]
16. Day, C.P.; James, O.F. Hepatic steatosis: Innocent bystander or guilty party? *Hepatology* **1998**, *27*, 1463–1466. [[CrossRef](#)]
17. Esler, W.P.; Bence, K.K. Metabolic Targets in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Cell Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **2019**, *8*, 247–267. [[CrossRef](#)]
18. Cohen, J.C.; Horton, J.D.; Hobbs, H.H. Human fatty liver disease: Old questions and new insights. *Science* **2011**, *332*, 1519–1523. [[CrossRef](#)]
19. Machado, M.V.; Diehl, A.M. Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* **2016**, *150*, 1769–1777. [[CrossRef](#)]
20. Thamer, C.; Tschritter, O.; Haap, M.; Shirkavand, F.; Machann, J.; Fritsche, A.; Schick, F.; Haring, H.; Stumvoll, M. Elevated serum GGT concentrations predict reduced insulin sensitivity and increased intrahepatic lipids. *Horm. Metab. Res.* **2005**, *37*, 246–251. [[CrossRef](#)]
21. Assunção, S.N.F.; Sorte, N.C.A.B.; Alves, C.A.D.; Mendes, P.S.A.; Alves, C.R.B.; Silva, L.R. Inflammatory cytokines and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in obese children and adolescents. *Nutr. Hosp.* **2018**, *35*, 78–83. [[PubMed](#)]
22. Drummond, G.S.; Baum, J.; Greenberg, M.; Lewis, D.; Abraham, N.G. HO-1 overexpression and underexpression: Clinical implications. *Arch. Biochem. Biophys.* **2019**, *673*, 108073. [[CrossRef](#)]
23. Yuan, X.W.; Li, D.D.; Liu, L.D.; Zhang, Y.; Zhao, W.; Cui, L.Y.; Yang, Y.; Nan, Y.M. Application of heme oxygenase 1 in the diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* **2019**, *27*, 291–297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Abraham, N.G.; Junge, J.M.; Drummond, G.S. Translational Significance of Heme Oxygenase in Obesity and Metabolic Syndrome. *Trends Pharm. Sci.* **2016**, *37*, 17–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Gressner, A.M.; Weiskirchen, R.; Breitkopf, K.; Dooley, S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front. Biosci.* **2002**, *7*, d793–d807. [[CrossRef](#)]



26. Flisiak, R.; Pytel-Krolczuk, B.; Prokopowicz, D. Circulating transforming growth factor beta(1) as an indicator of hepatic function impairment in liver cirrhosis. *Cytokine* **2000**, *12*, 677–681. [[CrossRef](#)]
27. de Onis, M.; Garza, C.; Onyango, A.W.; Rolland-Cachera, M.F.; de pédiatrie, I.C.d.d.f. WHO growth standards for infants and young children. *Arch. Pediatr.* **2009**, *16*, 47–53. [[CrossRef](#)]
28. Hamaguchi, M.; Kojima, T.; Itoh, Y.; Harano, Y.; Fujii, K.; Nakajima, T.; Kato, T.; Takeda, N.; Okuda, J.; Ida, K.; et al. The severity of ultrasonographic findings in nonalcoholic fatty liver disease reflects the metabolic syndrome and visceral fat accumulation. *Am. J. Gastroenterol.* **2007**, *102*, 2708–2715. [[CrossRef](#)]
29. Freedman, D.S.; Serdula, M.K.; Srinivasan, S.R.; Berenson, G.S. Relation of circumferences and skinfold thicknesses to lipid and insulin concentrations in children and adolescents: The Bogalusa Heart Study. *Am. J. Clin. Nutr.* **1999**, *69*, 308–317. [[CrossRef](#)]
30. Flynn, J.T.; Kaelber, D.C.; Baker-Smith, C.M.; Blowey, D.; Carroll, A.E.; Daniels, S.R.; de Ferranti, S.D.; Dionne, J.M.; Falkner, B.; Flinn, S.K.; et al. Clinical Practice Guideline for Screening and Management of High Blood Pressure in Children and Adolescents. *Pediatrics* **2017**, *140*, e20171904. [[CrossRef](#)]
31. Zimmet, P.; Alberti, G.; Kaufman, F.; Tajima, N.; Silink, M.; Arslanian, S.; Wong, G.; Bennett, P.; Shaw, J.; Caprio, S.; et al. The metabolic syndrome in children and adolescents. *Lancet* **2007**, *369*, 2059–2061. [[CrossRef](#)]
32. Mayer-Barber, K.D.; Andrade, B.B.; Oland, S.D.; Amaral, E.P.; Barber, D.L.; Gonzales, J.; Derrick, S.C.; Shi, R.; Kumar, N.P.; Wei, W.; et al. Host-directed therapy of tuberculosis based on interleukin-1 and type I interferon crosstalk. *Nature* **2014**, *511*, 99–103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Vinhaes, C.L.; Arriaga, M.B.; de Almeida, B.L.; Oliveira, J.V.; Santos, C.S.; Calcagno, J.I.; Carvalho, T.X.; Giovanetti, M.; Alcantara, L.C.J.; de Siqueira, I.C.; et al. Newborns with Zika virus-associated microcephaly exhibit marked systemic inflammatory imbalance. *J. Infect. Dis.* **2020**, *221*, 1567. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Vinhaes, C.L.; Oliveira-de-Souza, D.; Silveira-Mattos, P.S.; Nogueira, B.; Shi, R.; Wei, W.; Yuan, X.; Zhang, G.; Cai, Y.; Barry, C.E., 3rd; et al. Changes in inflammatory protein and lipid mediator profiles persist after antitubercular treatment of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis: A prospective cohort study. *Cytokine* **2019**, *123*, 154759. [[CrossRef](#)]
35. Oliveira-de-Souza, D.; Vinhaes, C.L.; Arriaga, M.B.; Kumar, N.P.; Cubillos-Angulo, J.M.; Shi, R.; Wei, W.; Yuan, X.; Zhang, G.; Cai, Y.; et al. Molecular degree of perturbation of plasma inflammatory markers associated with tuberculosis reveals distinct disease profiles between Indian and Chinese populations. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 8002. [[CrossRef](#)]
36. Cruz, L.A.B.; Moraes, M.O.A.; Queiroga-Barros, M.R.; Fukutani, K.F.; Barral-Netto, M.; Andrade, B.B. Chronic hepatitis B virus infection drives changes in systemic immune activation profile in patients coinfecting with Plasmodium vivax malaria. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2019**, *13*, e0007535. [[CrossRef](#)]
37. Andrade, B.B.; Singh, A.; Narendran, G.; Schechter, M.E.; Nayak, K.; Subramanian, S.; Anbalagan, S.; Jensen, S.M.; Porter, B.O.; Antonelli, L.R.; et al. Mycobacterial antigen driven activation of CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes is a predictor of tuberculosis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome. *PLoS Pathog.* **2014**, *10*, e1004433. [[CrossRef](#)]
38. Suzuki, A.; Diehl, A.M. Nonalcoholic Steatohepatitis. *Annu. Rev. Med.* **2017**, *68*, 85–98. [[CrossRef](#)]
39. Ore, A.; Akinloye, O.A. Oxidative Stress and Antioxidant Biomarkers in Clinical and Experimental Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Medicina (Kaunas)* **2019**, *55*, 26. [[CrossRef](#)]
40. Angulo, P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N. Engl. J. Med.* **2002**, *346*, 1221–1231. [[CrossRef](#)]
41. Brenner, C.; Galluzzi, L.; Kepp, O.; Kroemer, G. Decoding cell death signals in liver inflammation. *J. Hepatol.* **2013**, *59*, 583–594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Hirsova, P.; Ibrahim, S.H.; Krishnan, A.; Verma, V.K.; Bronk, S.F.; Werneburg, N.W.; Charlton, M.R.; Shah, V.H.; Malhi, H.; Gores, G.J. Lipid-Induced Signaling Causes Release of Inflammatory Extracellular Vesicles from Hepatocytes. *Gastroenterology* **2016**, *150*, 956–967. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Bedogni, G.; Bellentani, S.; Miglioli, L.; Masutti, F.; Passalacqua, M.; Castiglione, A.; Tiribelli, C. The Fatty Liver Index: A simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol.* **2006**, *6*, 33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Chiappini, F.; Barrier, A.; Saffroy, R.; Domart, M.C.; Dagues, N.; Azoulay, D.; Sebah, M.; Franc, B.; Chevalier, S.; Debuire, B.; et al. Exploration of global gene expression in human liver steatosis by high-density oligonucleotide microarray. *Lab. Invest.* **2006**, *86*, 154–165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Nair, B.; Nath, L.R. Inevitable role of TGF- $\beta$ 1 in progression of nonalcoholic fatty liver disease. *J. Recept. Signal Transduct.* **2020**, *40*, 195–200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



46. Khalid, M.; Hadhoud, E.; Ayman, A.-R.; Fawzy, E.; Fawzy, M. Transforming Growth Factor Beta One and Non Alcoholic Fatty Liver Disease. *Afro-Egypt J. Infect. Endem. Dis.* **2014**, *4*, 136–142. [[CrossRef](#)]
47. Hadizadeh, F.; Faghihimani, E.; Adibi, P. Nonalcoholic fatty liver disease: Diagnostic biomarkers. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* **2017**, *8*, 11–26. [[CrossRef](#)]
48. Lavine, J.E.; Schwimmer, J.B.; Van Natta, M.L.; Molleston, J.P.; Murray, K.F.; Rosenthal, P.; Abrams, S.H.; Scheimann, A.O.; Sanyal, A.J.; Chalasani, N.; et al. Effect of vitamin E or metformin for treatment of nonalcoholic fatty liver disease in children and adolescents: The TONIC randomized controlled trial. *JAMA* **2011**, *305*, 1659–1668. [[CrossRef](#)]
49. McPherson, S.; Hardy, T.; Henderson, E.; Burt, A.D.; Day, C.P.; Anstee, Q.M. Evidence of NAFLD progression from steatosis to fibrosing-steatohepatitis using paired biopsies: Implications for prognosis and clinical management. *J. Hepatol.* **2015**, *62*, 1148–1155. [[CrossRef](#)]
50. Manion, M.; Andrade, B.B.; DerSimonian, R.; Gu, W.; Rupert, A.; Musselwhite, L.W.; Sierra-Madero, J.G.; Belaunzaran-Zamudio, P.F.; Sanne, I.; Lederman, M.M.; et al. Country of residence is associated with distinct inflammatory biomarker signatures in HIV-infected patients. *J. Virus Erad.* **2017**, *3*, 24–33.
51. Mendonca, V.R.; Queiroz, A.T.; Lopes, F.M.; Andrade, B.B.; Barral-Netto, M. Networking the host immune response in Plasmodium vivax malaria. *Malar J.* **2013**, *12*, 69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Wong, R.J.; Tran, T.; Kaufman, H.; Niles, J.; Gish, R. Increasing metabolic co-morbidities are associated with higher risk of advanced fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0220612. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Kojima, S.; Watanabe, N.; Numata, M.; Ogawa, T.; Matsuzaki, S. Increase in the prevalence of fatty liver in Japan over the past 12 years: Analysis of clinical background. *J. Gastroenterol.* **2003**, *38*, 954–961. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Lee, M.J. Transforming growth factor beta superfamily regulation of adipose tissue biology in obesity. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2018**, *1864*, 1160–1171. [[CrossRef](#)]
55. Alisi, A.; Nobili, V.; Ceccarelli, S.; Panera, N.; De Stefanis, C.; De Vito, R.; Vitali, R.; Bedogni, G.; Balsano, C.; Cucchiara, S.; et al. Plasma high mobility group box 1 protein reflects fibrosis in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2014**, *14*, 763–771. [[CrossRef](#)]
56. Lee, Y.S.; Yoo, Y.J.; Jung, Y.K.; Kim, J.H.; Seo, Y.S.; Yim, H.J.; Kim, I.H.; Lee, S.Y.; Kim, B.H.; Kim, J.W.; et al. Multiparametric MR is a Valuable Modality for Evaluating Disease Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin. Transl. Gastroenterol.* **2020**, *11*, e00157. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).