

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

MARÍLIA MARQUES PEREIRA LIRA

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS CARDIOMETABÓLICOS E
SUPERCRESCIMENTO BACTERIANO DE INTESTINO DELGADO EM
INDIVÍDUOS COM DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA:
um estudo transversal**

JOÃO PESSOA-PB

2020

MARÍLIA MARQUES PEREIRA LIRA

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS CARDIOMETABÓLICOS E
SUPERCRESCIMENTO BACTERIANO DE INTESTINO DELGADO EM
INDIVÍDUOS COM DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA:
um estudo transversal**

JOÃO PESSOA-PB

2020

MARÍLIA MARQUES PEREIRA LIRA

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS CARDIOMETABÓLICOS E
SUPERCRESCEMENTO BACTERIANO DE INTESTINO DELGADO EM
INDIVÍDUOS COM DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA:
um estudo transversal**

Dissertação apresentada ao Programa de pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição.

Linha de Pesquisa: Clínica e Epidemiologia Aplicada à Nutrição

Orientador: Prof. Dr. José Luiz de Brito Alves

Coorientador: Prof. Dr. José Eymard Moraes de Medeiros Filho

JOÃO PESSOA-PB

2020

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

L768a Lira, Marília Marques Pereira.

Avaliação de parâmetros cardiometabólicos e
supercrecimento bacteriano de intestino delgado em
indivíduos com doença hepática gordurosa não alcoólica
: um estudo transversal / Marília Marques Pereira Lira.

- João Pessoa, 2020.

78 f. : il.

Orientação: José Luiz de Brito Alves.

Coorientação: José Eymard Moraes de Medeiros Filho.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Doença hepática gordurosa não alcoólica. 2.
Disbiose. 3. Variabilidade da frequência cardíaca. I.
Alves, José Luiz de Brito. II. Medeiros Filho, José
Eymard Moraes de. III. Título.

UFPB/BC

CDU 616.36(043)

MARÍLIA MARQUES PEREIRA LIRA

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS CARDIOMETABÓLICOS E
SUPERCRESCIMENTO BACTERIANO DE INTESTINO DELGADO EM
INDIVÍDUOS COM DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA:
um estudo transversal**

Dissertação aprovada em 25/08/2020

BANCA EXAMINADORA

José Luiz de Brito Alves

Prof. Dr. José Luiz de Brito Alves

Orientador

(Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição / Centro de Ciências da Saúde /
UFPB)

José Eymard Moraes de Medeiros Filho

Prof. Dr. José Eymard Moraes de Medeiros Filho

Coorientador

(Departamento de Medicina Interna / Centro de Ciências Médicas / UFPB)

M^a da Conceição R. Gonçalves

Profa. Dra. Maria Da Conceição Rodrigues Gonçalves

Membro interno – Titular

(Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição / Centro de Ciências da Saúde /
UFPB)

Prof. Dr. Vinicius Jose Baccin Martins

Membro interno – Suplente

(Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição / Centro de Ciências da Saúde /
UFPB)

Assinado de forma digital por
André Telis de Vilela Araújo
Dados: 2020.08.27 14:27:53 -0300

Prof. Dr. André Telis de Vilela Araújo

Membro externo – Titular

(Departamento de Obstetrícia e Ginecologia / Centro de Ciências Médicas / UFPB)

Profa. Dra. Mônica Souza de Miranda Henriques

Membro externo – Suplente

(Departamento de Medicina Interna / Centro de Ciências Médicas / UFPB)

JOÃO PESSOA-PB

2020

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus que sempre me fortaleceu em todas as situações. Ele tem sido meu alicerce, minha força e segurança, sem Ele certamente eu não estaria aqui. Em tudo que faço sinto Sua forte e poderosa presença me guiando pelo melhor caminho.

Agradeço aos meus pais, Lenira e Luziel, por todo o amor e dedicação; e em especial à minha mãe pelo exemplo de fé, pelos esforços sem limites, por se doar por completo, pelo imenso cuidado comigo e com minha família.

Ao meu amado esposo, Marcílio, minha gratidão por zelar por nós, por entender meus momentos de ausência mesmo sabendo dos sacrifícios que isso implica, por me apoiar e festejar comigo cada pequena conquista. Seu amor e cuidado são essenciais para nosso crescimento e harmonia. Te amo!

Aos nossos filhos, Arthur, Rafael e Alice por renovarem minhas forças diariamente, muitas vezes com um simples olhar, sorriso ou abraço. Por serem meus motivos para acordar e lutar todos os dias com a mesma garra, me impulsionando a ser uma pessoa melhor e por me amarem incondicionalmente apesar dos meus defeitos.

Às minhas irmãs, Cristhiane e Jordana, agradeço a parceria, o amor, as palavras de incentivo e o apoio emocional. Aos demais familiares, cunhados, sogros, tios, primos e em especial meus amados sobrinhos, sou grata por completarem minha vida.

Agradeço de uma forma especial ao meu orientador, Prof. José Luiz, que me acolheu e me conduziu nessa longa jornada. Obrigada pelos ensinamentos, pela atenção e por me mostrar, com seu exemplo, como melhorar a cada dia como profissional. Sua dedicação ao que faz tem sido um referencial na minha vida acadêmica.

Ao meu coorientador, Prof. José Eymard Filho, agradeço o apoio, a generosidade, por confiar em mim e fazer parte de mais esse importante momento da minha vida profissional. À você, minha admiração e gratidão.

Agradeço ao professor Vinicius Baccin pela preciosa colaboração com as análises estatísticas, bem como aos demais professores que se disponibilizaram prontamente para

compor a banca avaliadora desta minha dissertação e por me ajudarem com valiosas críticas construtivas. Aos professores e funcionários do programa de pós-graduação em ciências da nutrição agradeço toda a dedicação.

À minha amiga Nara, pessoa que admiro pela competência e desenvoltura em tudo que faz, agradeço o incentivo para ingressar nessa caminhada. Aos meus colegas de turma do mestrado, obrigada pela companhia leve e prazerosa e por dividirem comigo os bons e maus momentos dessa jornada. Certamente guardarei boas lembranças desse momento único em nossas vidas.

Sou grata a todos que me ajudaram no processo de coleta de dados desta pesquisa, em especial todas as funcionárias da Sala Vermelha do HULW que gentilmente me acolheram e não mediram esforços para me ajudar. Meu agradecimento especial à Gitana por ter sido meu referencial nesse momento da pesquisa. Aos médicos e residentes do HULW, em especial André Telis, Ayreme e Keilha, que me ajudaram a recrutar os participantes desta pesquisa. Aos alunos de graduação em medicina, Raíssa, Luanna, Eduardo e Kaio, pelo apoio na realização dos testes.

Agradeço também a todos os funcionários do laboratório de análises clínicas do HULW na pessoa de Laerte, pelo processamento inicial das amostras e ao LEFTADS nas pessoas do professor Alexandre e Éder, por cederem o espaço e dedicarem valioso tempo para nossas análises.

Aos pacientes e participantes do estudo agradeço o empenho em dedicar seu tempo para participar desta pesquisa.

A todos que de alguma forma me ajudaram na conclusão deste projeto, meus sinceros agradecimentos.

Muito obrigada.

Marília Marques.

“ Consagre ao Senhor tudo o que faz e seus planos serão bem sucedidos.”

Provérbios 16:3

RESUMO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é caracterizada por um espectro de doenças que incluem infiltração gordurosa hepática, esteatohepatite e cirrose hepática, e tem sido associada com supercrescimento bacteriano no intestino delgado (SCBID) e complicações cardiovasculares. O objetivo deste estudo foi avaliar parâmetros cardiometabólicos e a presença de supercrescimento bacteriano de intestino delgado em indivíduos portadores de doença hepática gordurosa não alcoólica com diferentes graus de fibrose hepática estimados por escore de fibrose da doença hepática (*NAFLD fibrosis score* – *NFS*). Foi realizado um estudo transversal, analítico, que envolveu 78 participantes maiores de 18 e menores de 75 anos, de ambos os sexos, alocados em três grupos distintos. Grupo 1: Controles saudáveis ($n = 30$), indivíduos sem evidência de doença hepática, cardíaca ou metabólica; Grupo 2: 17 indivíduos com DHGNA e com baixo risco estimado de fibrose avançada (FA); e Grupo 3: indivíduos com DHGNA e com risco moderado e alto de de fibrose hepática avançada ($n = 31$). Em todos os grupos foram avaliadas medidas antropométricas (peso corporal, estatura e índice de massa corporal), pressão arterial e eletrocardiograma, o qual foi utilizado para acessar as medidas de variabilidade da frequência cardíaca (VFC). Apenas os indivíduos com diagnóstico de DHGNA (Grupos 2 e 3) foram submetidos a análises bioquímicas sanguíneas e teste respiratório de hidrogênio exalado com glicose para diagnóstico de supercrescimento bacteriano de intestino delgado. A média de idade dos participantes foi $41,03 \pm 14,72$ anos. Os dois grupos de indivíduos com DHGNA apresentaram idade e índice de massa corporal significativamente maiores quando comparados ao grupo controle ($p < 0.01$). O componente de baixa frequência (LF) e a relação baixa frequência/alta frequência (LF / HF ratio) foram menores em indivíduos com DHGNA associada a alto risco estimado de fibrose avançada do que em indivíduos também portadores de DHGNA com baixo risco de fibrose avançada ($p = 0.04$ e $p = 0.02$, respectivamente). Hipoalbuminemia e trombocitopenia foram maiores em indivíduos com pior grau de fibrose hepática estimada ($p < 0.01$ e $p = 0.02$). A prevalência de supercrescimento bacteriano de intestino delgado foi similar entre os grupos. O presente estudo evidenciou que a DHGNA está associada a disfunção autonômica cardíaca sendo notado maior comprometimento em indivíduos com pior grau de fibrose hepática.

Palavras-chave: Doença hepática gordurosa não alcoólica; Disbiose; Variabilidade da frequência cardíaca.

ABSTRACT

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is characterized by a spectrum of diseases that include fatty liver, steatohepatitis and liver cirrhosis, and has been associated with small intestinal bacterial overgrowth (SIBO) and cardiovascular diseases. In this cross-sectional study, we aimed to evaluate cardiometabolic parameters and the presence of small intestinal bacterial overgrowth in individuals with non-alcoholic fatty liver disease and different degrees of liver fibrosis estimated by the liver disease fibrosis score (*NAFLD fibrosis score* - *NFS*). This study involved 78 participants with age ranging between 18 and 75 years, both gender, who were allocated into three different groups. Group 1: Healthy controls (n = 30), individuals with no evidence of liver, heart or metabolic disease; Group 2: 17 individuals with non-alcoholic fatty liver disease and low estimated risk of advanced fibrosis (AF) and Group 3: individuals with non-alcoholic fatty liver disease and high estimated risk of advanced liver fibrosis (n = 31). In all groups, anthropometric measurements (body weight, height and body mass index), blood pressure and heart rate variability (HRV) measures were evaluated. Only individuals diagnosed with non-alcoholic fatty liver disease (Groups 2 and 3) underwent blood biochemical analyzes and breath test of hydrogen exhaled with glucose to small intestinal bacterial overgrowth diagnosis. The average age was ($\pm$ standard deviation) 41.03 ± 14.72 years. Both groups of individuals with liver disease had a higher age and body mass index when compared to the control group ($p < 0.01$). The low frequency component (LF) and the low / high frequency ratio (LF / HF ratio) were lower in patients with liver disease associated with a high estimated risk of advanced fibrosis than in individuals with non-alcoholic fatty liver disease and low risk of advanced fibrosis ($p = 0.04$ and $p = 0.02$, respectively). Hypoalbuminemia and thrombocytopenia were lower in subjects with worse estimated liver fibrosis ($p < 0.01$ and $p = 0.02$). Prevalence of small intestinal bacterial overgrowth was similar between groups. The present study shows that non-alcoholic fatty liver disease is associated with an autonomic cardiac dysfunction and the higher impairment being noted in individuals with the worst degree of liver fibrosis estimated by score.

Key Words: Non-alcoholic fatty liver disease; Dysbiosis; Heart rate variability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Teoria dos múltiplos insultos na fisiopatologia da DHGNA

Figura 2: Figura esquemática representando os princípios dos testes respiratórios

Figura 3: Esquema da anatomia dos sistemas nervosos simpático e parassimpático com conexões e efeitos nos vários órgãos e sistemas

Figura 4: Fluxograma de seleção de participantes para a pesquisa e instrumentos para coleta de dados

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Table 1 – Assessment of general characteristics of the study population

Table 2 – Blood pressure and laboratorial characteristics between groups

Table 3 – Comparison of ECG analysis and heart rate variability measures between the three groups studied

Table 4. Linear correlation coefficients between heart rate variability measures and clinical, anthropometric, body composition and laboratory variables.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
BARD score	Escore de fibrose BARD
BCAA	Aminoácidos de cadeia curta
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DP	Doença periodontal
ECG	Eletrocardiograma
EH	Esteatose hepática
EHNA	Esteatohepatite não alcoólica
FA	Fibrose avançada
FC	Frequência cardíaca
FGNA	Fígado gorduroso não alcoólico
FIB-4	Escore de fibrose <i>Fibrosis 4</i>
GGT	Gama glutamiltranspeptidase
HF	<i>High frequency</i>
HULW	Hospital Universitário Lauro Wanderley
HDL- c	<i>High density lipoprotein cholesterol</i>
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de massa corporal
LDL-c	<i>Low density lipoprotein cholesterol</i>
LEFTADS	Laboratório de estudos de treinamento físico aplicado ao desempenho e saúde
LF	<i>Low frequency</i>
LPS	Lipopolissacarídeos
NFS	Escore de fibrose NAFLD

PCR	Proteína C Reativa
PNPLA3	<i>patatin-like phospholipase domain containing</i>
RM	Ressonância magnética
SCBID	Supercrescimento bacteriano de intestino delgado
SNA	Sistema nervoso autônomo
TC	Tomografia computadorizada
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TLR	<i>Toll-like</i> receptores
TMA	Trimetilamina
TMAO	N-óxido-trimetilamina
TM6SF2	<i>transmembrane 6 superfamily member 2</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
USG	Ultrassonografia
UFC	Unidades formadoras de colônias
ULF	<i>Ultra-low frequency</i>
VFC	Variabilidade da frequência cardíaca
VLF	<i>Very low frequency</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

$\geq$ Maior ou igual

$\leq$ Menor ou igual

$<$ Menor

$>$ Maior

$=$ Igual

% Percentual

$+$ Mais

$-$ Menos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA	19
2.1.1	Definição, Epidemiologia e Diagnóstico	19
2.1.2	Fisiopatologia	20
2.1.3	Achados laboratoriais e métodos de avaliação prognóstica	21
2.2	SUPERCRESCIMENTO BACTERIANO DO INTESTINO DELGADO NA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA	25
2.2.1	Definição e epidemiologia	25
2.2.2	Diagnóstico	27
2.3	DISFUNÇÃO AUTÔNOMICA CARDIOVASCULAR NA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA	30
2.3.1	Definição, fisiopatologia e epidemiologia	30
2.3.2	Avaliação da função autonômica através da Variabilidade da Frequência Cardíaca	32
3	ABORDAGEM METODOLÓGICA	35
3.1	DESENHO DO ESTUDO	35
3.2	ASPECTOS ÉTICOS	36
3.3	LOCAL DO ESTUDO	36
3.4	POPULAÇÃO DO ESTUDO	36
3.5	CRITÉRIOS E PROCEDIMENTOS PARA SELEÇÃO DO ESTUDO.....	36
3.6	PROCEDIMENTOS E INSTRUMENTOS PARA COLETA DE DADOS	37
3.6.1	Avaliação Antropométrica	38
3.6.2	Avaliação Bioquímica	38
3.6.3	Avaliação do Supercrescimento Bacteriano de Intestino Delgado..	39
3.6.4	Avaliação eletrocardiográfica e variabilidade da frequência cardíaca	39
3.7	ANÁLISE DE DADOS	40
4	RESULTADOS	41
	REFERÊNCIAS	42
	APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	
	APÊNDICE B – FICHA DE COLETA DE DADOS	
	APÊNDICE C – ARTIGO	
	ANEXO A- PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP HULW	

1 INTRODUÇÃO

Em 1980, Ludwig e colaboradores da Clínica Mayo criaram o termo esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) para descrever uma forma de hepatopatia observada em pacientes de meia idade com resultados anormais de testes bioquímicos hepáticos e evidências histológicas de hepatite alcoólica, porém sem nenhuma evidência de uso excessivo de álcool (LUDWIG et al., 1980).

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) consiste em importante causa de disfunção hepática crônica no mundo e se refere ao acúmulo excessivo de gordura hepática na ausência de história de abuso de álcool ou outras causas secundárias de esteatose (CHALASANI et al., 2012; ZHANG et al., 2018). Sua prevalência tem aumentado em várias sociedades (AL-MUZAFAR; AMIN, 2017) sendo considerada uma das principais causas de hepatocarcinoma nos Estados Unidos (ESTES et al., 2018) e será a principal causa de indicação de transplante hepático no mundo nas próximas décadas (SAYINER et al., 2016).

A prevalência de DHGNA é variável e depende da população estudada e do método diagnóstico utilizado. Por exemplo, a prevalência global estimada é de 25% (SUNG et al., 2019). No Brasil, esta prevalência varia de 18% a 23% (CRUZ et al., 2016) e nos Estados Unidos de 18% a 30% (ESTES et al., 2018; SAYINER et al., 2016).

A patogênese da DHGNA parece estar relacionada com múltiplos fatores, tais como: resistência insulínica, síndrome metabólica, diabetes tipo 2 e variantes genéticas do gene PNPLA3 (*patatin-like phospholipase domain containing 3*) e TM6SF2 (*transmembrane 6 superfamily member 2*) (COBBINA; AKHLAGHI, 2017).

Um avanço recente tem sido o reconhecimento de alterações na composição da microbiota intestinal em sua fisiopatologia (BELEI et al., 2017; SALTZMAN et al., 2018; VESPASIANI-GENTILUCCI; GALLO; PICARDI, 2018). Em 2001, Wigg e colaboradores demonstraram que o supercrescimento bacteriano de intestino delgado (SCBID) diagnosticado por teste respiratório é mais prevalente entre portadores com EHNA quando comparado à indivíduos sem doença hepática (WIGG et al., 2001). Em 2017, Ghoshal e colaboradores também demonstraram, com uso de cultura de aspirado jejunal, que baixo grau de supercrescimento bacteriano especialmente de bactérias gram-

negativas, é mais comum entre indivíduos com EHNA quando comparados com controles (GHOSHAL et al., 2017).

A DHGNA pode ser considerada ainda como uma doença multissistêmica que afeta órgãos e tecidos extra-hepáticos, associando-se a maior prevalência de doenças cardiovasculares e elevadas taxas de mortalidade (MOTAMED et al., 2017). Alterações na composição da microbiota intestinal e sua atividade metabólica também são relatados como poderosos determinantes da doença cardiovascular, onde a microbiota atua como um “sistema endócrino” produtor de vários metabólitos biologicamente ativos (SCHIATTARELLA et al., 2018; TANG; KITAI; HAZEN, 2018).

Ademais, a própria DHGNA especialmente em suas formas mais graves, exacerba a resistência insulínica sistêmica e hepática, causa dislipidemia aterogênica e libera uma variedade de mediadores pró-inflamatórios, pró-coagulantes e pró-fibrogênicos que podem desempenhar papéis fundamentais na fisiopatologia de disfunções cardiovasculares (ANSTEE et al., 2018; BALLESTRI et al., 2014).

Como ferramenta de avaliação da função autonômica cardíaca ressalta-se a análise da variabilidade da frequência cardíaca (VFC), uma medida amplamente utilizada para caracterizar as funções do sistema nervoso autônomo (SNA) (SASSI et al., 2015) e que tem sido proposta como ferramenta útil na identificação de pacientes com risco de morte cardíaca súbita (BALLESTRI et al., 2014). Na doença hepática gordurosa, os comprometimentos cardíacos e autonômicos parecem depender do nível de gordura hepática, disfunção metabólica, inflamação e estadiamento da fibrose, mas em menor grau da ingestão de álcool (HOUGHTON et al., 2019).

Diante da escassez de dados em nossa população e, apesar dos estudos anteriores mostrarem que pacientes com DHGNA apresentam função cardiometabólica prejudicada e disbiose intestinal, em nosso melhor entendimento, ainda não foi demonstrado se a piora da DHGNA acentua a disfunção cardiometabólica e a disbiose intestinal. Por isso, os objetivos do presente estudo foram avaliar parâmetros cardiometabólicos e presença de supercrescimento bacteriano de intestino delgado em indivíduos portadores de DHGNA com diferentes graus de fibrose hepática estimados por um painel de biomarcadores não invasivos; bem como, determinar se existe correlação entre disfunção autonômica cardíaca, comprometimento metabólico e o supercrescimento bacteriano do intestino delgado nesta população.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA

2.1.1 Definição, Epidemiologia e Diagnóstico

A Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA) representa um espectro de doenças do fígado gorduroso não alcoólico (FGNA) caracterizada por acúmulo de gordura hepática sem inflamação até esteatohepatite não alcoólica (EHNA), que se apresenta com deposição de gordura hepática com inflamação, acúmulo de fibrose e, finalmente, cirrose hepática (EL-ZAYADI, 2008).

Para definir a DHGNA, deve haver evidência de esteatose hepática (EH), seja por imagem ou histologia, e ausência de causas secundárias de acúmulo de gordura hepática, tais como consumo significativo de álcool, uso prolongado de medicação esteatogênica ou distúrbios hereditários monogênicos. Histologicamente, o FGNA é definido como a presença de 5% ou mais de esteatose hepática sem evidência de lesão hepatocelular na forma de balonização de hepatócitos. Já a EHNA é definida como a presença de 5% ou mais de esteatose hepática e inflamação, dano ao hepatócito com ou sem fibrose (CHALASANI et al., 2018).

Em termos epidemiológicos, vários estudos tentaram quantificar a verdadeira incidência mundial de FGNA/EHNA; no entanto, devido variações extremas nos estudos, parâmetros e testes disponíveis, um dado claro e confiável sobre a taxa de ocorrência não está atualmente disponível. Dito isto, estimativas foram postuladas sugerindo uma prevalência global de 24% (YOUNOSSI et al., 2018) a 25% (SUNG et al., 2019) e uma incidência de DHGNA de 20%-30% nos países ocidentais e 5%-18% na Ásia (SAYINER et al., 2016).

A cirrose relacionada à EHNA é atualmente uma das principais causas de doença hepática crônica e um fator de risco relevante para carcinoma hepatocelular, o qual tem emergido como a segunda indicação principal para o transplante de fígado nos Estados Unidos. A DHGNA representa uma das principais causas de morbimortalidade relacionada ao fígado, bem como constitui uma das principais causas para mortalidade global por doenças cardiovasculares, aumento na incidência de diabetes melito tipo 2 e aumento do risco de doenças renais (OFOSU, 2018).

O diagnóstico da DHGNA baseia-se na combinação de fatores clínicos e imagem hepática. A avaliação clínica envolve uma história detalhada sobre uso de álcool, exames de fatores de risco metabólicos pessoais e familiares, histórico de uso de medicamentos ou suplementos e realização de testes sorológicos (CARR; ORANU, 2016) visando excluir etiologias concorrentes para a esteatose hepática bem como as causas associadas de doenças hepáticas crônicas (CHALASANI et al., 2018).

Para avaliação radiológica; ultrassonografia (USG), tomografia computadorizada (TC) e ressonância magnética (RM) são as modalidades utilizadas na prática clínica (PAPPACHAN et al., 2017), entretanto, a USG oferece a melhor combinação de custo e facilidade de desempenho para a detecção de DHGNA com uma sensibilidade de 85% (PANDYARAJAN et al., 2019).

A USG permite estimar subjetivamente o grau de infiltração gordurosa hepática e esta classificação geralmente é obtida avaliando características como o brilho do fígado, contraste entre fígado e rins, aparência dos vasos intra-hepáticos, parênquima hepático e diafragmático. Seu desempenho para a detecção de esteatose leve é baixo, porém para detecção de casos moderados a grave é semelhante à tomografia e ressonância (FERRAIOLI; MONTEIRO, 2019).

A tomografia é altamente sensível na quantificação da gordura hepática e visceral em pacientes com síndrome metabólica e DHGNA, porém tem alto custo e associa-se ao risco do uso da radiação. A RNM é altamente sensível e específica para a avaliação quantitativa e qualitativa da DHGNA e novas técnicas permitem avaliar o grau de fibrose de forma não invasiva. No entanto são técnicas caras e disponíveis apenas em centros especializados (PAPPACHAN et al., 2017).

A biópsia hepática é recomendada como método padrão-ouro para o diagnóstico e classificação da esteatose, inflamação hepática e estadiamento da fibrose em pacientes com EHNA. Entretanto, devido seu custo elevado, possibilidade de risco, uso de recursos de saúde, torna-se pouco adequada para uma condição tão prevalente (IMAJO et al., 2016).

2.1.2 Fisiopatologia

A DHGNA é considerada um distúrbio metabólico que resulta da interação complexa entre fatores genéticos, nutricionais e hormonais (CARR; ORANU, 2016). A proteína PNPLA3 do tipo selvagem tem atividade hidrolásica para triglicérides e ésteres de retinil e, a substituição da isoleucina por metionina na posição 148M deste gene, induz

uma perda de função enzimática, resultando em um aprisionamento de triglicerídeos e ésteres de retinila em gotículas lipídicas nos hepatócitos e nas células estreladas hepáticas (ESLAM; VALENTI; ROMEO, 2018).

Dietas obesogênicas podem provocar efeitos próinflamatórios precoces em núcleos hipotalâmicos, promovendo um desacoplamento nos processos orexígenos e anorexígenos da ingestão calórica e do gasto energético, em parte, potencializando o apetite e ganho de peso (JAIS; BRÜNING, 2017; ZHANG et al., 2018). Além disso, processos próinflamatórios hipotalâmicos contribuem para a resistência à insulina e a deterioração do metabolismo da glicose associadas à obesidade (JAIS; BRÜNING, 2017).

Tanto a hiperinsulinemia quanto a resistência à insulina são centrais na fisiopatologia da DHGNA. Em pacientes com DHGNA, o desenvolvimento de resistência à insulina resulta em aumento de lipólise dos adipócitos e ácidos graxos livres circulantes tornam-se disponíveis para subsequente captação hepática. Talvez em resposta a resistência sistêmica à insulina, desenvolve-se hiperinsulinemia que aumenta as vias de lipogênese hepática *de novo* culminando com acumulação lipídica intra-hepática. Nos hepatócitos, a incapacidade de acomodar lipídios dentro de gotículas lipídicas expõe células a lipotoxicidade e prejudica ainda mais a sinalização da insulina, causa dano oxidativo e promovendo inflamação e fibrose (CARR; ORANU, 2016; COBBINA; AKHLAGHI, 2017).

Adicionalmente, a disfunção do tecido adiposo na obesidade, lipodistrofia ou resistência insulínica promove a liberação de citocinas pró-inflamatórias e adipocinas como leptina e adiponectina (ZHANG et al., 2018). A adiponectina possui ação anti-inflamatória e sensibilizadora da ação da insulina hepática e periférica; A leptina está envolvida na homeostase energética, possui ação pró-inflamatória e no fígado, apresenta ação pró-fibrogênica via ativação de células estreladas (BOUTARI; PERAKAKIS; MANTZOROS, 2018).

Além disso, evidências emergentes sugerem que alterações na composição e na diversidade da microbiota intestinal podem influenciar o desenvolvimento e a progressão da DHGNA, possivelmente através do eixo intestino-fígado (GRABHERR et al., 2019; VESPASIANI-GENTILUCCI; GALLO; PICARDI, 2018).

A ligação anatômica e funcional entre o intestino e o fígado garante 70% de suprimento de sangue hepático através da veia porta (RAMAN et al., 2013). Quando a

barreira mucosa intestinal está comprometida, expõe o tecido hepático a fatores tóxicos como por exemplo os lipopolissacarídeos (LPS). A translocação intestinal de LPS e ativação de receptores toll-like (TLR) estão associadas com ativação de cascatas próinflamatórias na DHGNA ou na EHNA (WANG; XIA; JIANG, 2019).

A interação entre hospedeiro e a microbiota intestinal é fundamental para o desenvolvimento e para homeostase do sistema imune inato e adaptativo do hospedeiro (NOVERR; HUFFNAGLE, 2004). Entretanto, o rompimento da permeabilidade intestinal leva ao aumento da translocação bacteriana, ativação de macrófagos que liberam citocinas inflamatórias e de células dendríticas que estimulam a diferenciação de Células T virgens para células Th17 pró-inflamatórias. Essas células Th17 secretam IL-17 ativadora de neutrófilos. Ao chegarem ao fígado, a IL-17 estimula monócitos, células de Kupffer, células epiteliais biliares e células estreladas, secretando citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e induzindo inflamação hepática (Figura 1).

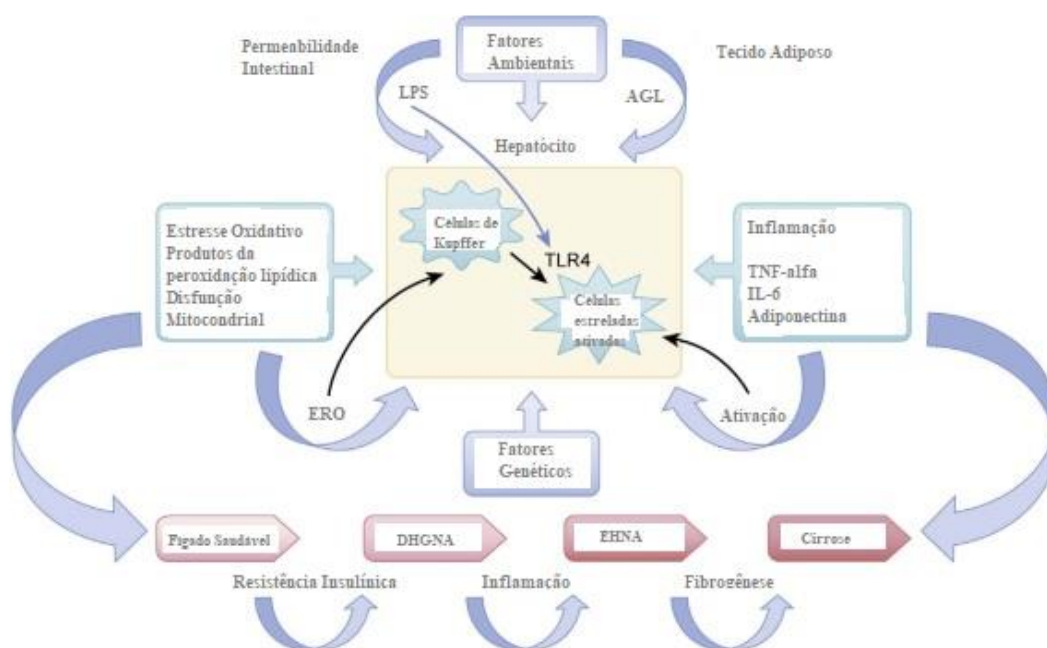


Figura 1: Teoria do múltiplos insultos na fisiopatologia da DHGNA. Os insultos incluem resistência à insulina, hormônios secretados pelo tecido adiposo, fatores nutricionais, endotoxinas (lipopolissacarídeos) liberadas pela microbiota intestinal, dano por estresse oxidativo e fatores genéticos e epigenéticos. Esses insultos agem sobre células parenquimatosas do fígado através de receptores toll-like para conduzir a progressão da EHNA. Adaptado da referência (BORRELLI et al., 2018).

A perda de seletividade na permeabilidade intestinal, supercrescimento bacteriano de intestino delgado e níveis séricos elevados de LPS tem sido relatados em pacientes com DHGNA (SALTZMAN et al., 2018).

2.1.3 Achados laboratoriais e métodos de avaliação prognóstica

Considerando a elevada incidência mundial de DHGNA, há uma necessidade de métodos para um diagnóstico simples e de identificação precoce para esses pacientes (ÖNNERHAG et al., 2019).

Indivíduos com DHGNA em estágios pré-cirróticos habitualmente são assintomáticos, e em geral, demonstram elevações nos níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e gama glutamiltranspeptidase (GGT). Apesar destes achados laboratoriais não serem específicos para o diagnóstico da DHGNA, um aumento na relação AST/ALT correlaciona-se positivamente com a severidade necroinflamatória e fibrose (ALLER et al., 2018; KUPČOVÁ, 2019). Os níveis séricos de ferritina, a principal proteína de reserva do ferro, costumam estar elevados em indivíduos com EHNA quando comparados com esteatose simples (YONEDA et al., 2010).

A DHGNA, em geral, pode acometer cerca de 25% da população e predispor ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, câncer e complicações hepáticas. Neste sentido, é razoável inferir que o grau de fibrose hepática seja avaliado de forma acurada para determinar de maneira precisa a severidade da doença (BOURSIER et al., 2019; KUPČOVÁ, 2019). Preditores para fibrose moderada e severa incluem idade avançada, sexo masculino, elevação de enzimas hepáticas (AST e ALT), diabetes melitus e hipertensão arterial.

Para uma avaliação adequada da atividade inflamatória e do grau de fibrose hepática tem sido utilizado um sistema de estadiamento da doença através da análise de amostras por biópsia hepática. Um sistema utilizado é o METAVIR, um sistema de escore composto de letras e números: A - atividade histológica (A0: sem atividade, A1: leve atividade, A2: moderada atividade e A3: severa atividade) e F – Fibrose (F0: ausência de fibrose, F1: fibrose portal sem septos, F2: fibrose portal com raros septos, F3: numerosos septos sem cirrose e F4: cirrose) (BEDOSSA; POYNARD, 1996). De acordo com a Rede

de Pesquisa Clínica em esteatohepatite não alcoólica, a fibrose hepática pode ser caracterizada em fibrose ausente ou discreta (Metavir F= 0-1), fibrose significativa (Metavir $F \geq 2$) ou fibrose avançada (Metavir F= 4); e o grau de fibrose se correlaciona com a mortalidade global da DHGNA (ZHOU et al., 2019).

A biópsia hepática continua sendo o padrão-ouro para caracterizar a histologia hepática em pacientes com DHGNA. Contudo, devido ao seu alto custo, alguma morbidade e raríssima mortalidade, deve ser realizada naqueles que se beneficiariam das orientações diagnósticas, terapêuticas e prognósticas, como os indivíduos sob elevado risco de esteatohepatite ou fibrose avançada (CHALASANI et al., 2012). Nesse contexto, métodos não invasivos foram desenvolvidos para cobrir todo o espectro de distúrbios da DHGNA, mas nem todos são confiáveis para diferenciar esteatose, esteatohepatite e fibrose (KUPČOVÁ, 2019).

Dentre os métodos prognósticos, alguns marcadores bioquímicos, tais como o TNF- α , IL-6, PCR, ferritina e citoqueratina-18 têm sido propostos como preditores de severidade nas DHGNA/EHNA, embora nenhum destes seja suficientemente sensível e específico para aplicação clínica de rotina (ALLER et al., 2018; PAPPACHAN et al., 2017).

Os métodos para exclusão de fibrose hepática avançada mais promissores, amplamente disponíveis e de fácil execução parecem ser os sistemas de escores, tais como FIB-4, escore NAFLD de fibrose e escore BARD, biomarcadores séricos (painel de fibrose hepática avançada, FibroTest e Hepascore) ou exames de imagem (por exemplo, elastografia transitória, elastografia por Ressonância Magnética ou elastografia de onda de cisalhamento supersônica) (CASTERA, 2020; CHALASANI et al., 2018).

O escore de fibrose NAFLD (NFS) é um método amplamente validado para diferentes raças, não invasivo, quantificável, e de avaliação da gravidade da DHGNA (CASTERA, 2020). É obtido a partir de seis parâmetros rotineiramente usados: idade, índice de massa corporal ($IMC = \text{peso}/\text{altura}^2$), hiperglicemia, relação AST/ALT, plaquetas e albumina sérica (PAPPACHAN et al., 2017; ZHOU et al., 2019).

O escore é calculado seguindo a fórmula: $-1.675 + 0.037 \times \text{idade (anos)} + 0.094 \times IMC (kg/m^2) + 1.13 \times \text{Hiperglicemia/diabetes (Sim = 1, Não = 0)} + 0.99 \times \text{AST/ALT razão}$

– $0.013 \times \text{plaquetas} (\times 10^9/\text{l}) - 0.66 \times \text{albumina} (\text{g/dl})$. Aplicando um ponto de corte ($< -1,455$), pode-se excluir fibrose avançada com alta precisão (valor preditivo negativo de 93%), enquanto um ponto de corte ($> 0,676$) oferece detecção precisa de fibrose avançada (valor preditivo positivo de 90%) (ANGULO et al., 2007; RAY; AGARWALA, 2019).

Um estudo comparando vários escores de risco e elastografia contra a biópsia hepática mostraram que o NFS e o FIB-4 foram melhores que os outros escores e igualmente eficazes quando comparados a elastografia por RNM para prever fibrose avançada em pacientes com DHGNA comprovada por biópsia (IMAJO et al., 2016).

2.2 SUPERCRESCIMENTO BACTERIANO DO INTESTINO DELGADO NA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA

2.2.1 Definição e epidemiologia

O trato gastrointestinal abriga uma flora complexa que supera as células eucarióticas do hospedeiro. Tal flora inclui cerca de 500 espécies diferentes de bactérias com elevada concentração no cólon e exercendo funções importantes, tais como: imunoregulação, estimulação, efeito de barreira, funções tróficas, metabólicas e síntese de vitaminas (ROCCARINA et al., 2010).

As concentrações de bactérias variam ao longo do trato digestivo aumentando de 10^3 unidades formadoras de colônias (UFC)/ml no trato intestinal superior até 10^{14} UFC/ml no cólon. Qualquer desequilíbrio (qualitativo ou quantitativo) nesse importante complexo microbiológico pode gerar consequências tanto locais quanto sistêmicas (GABRIELLI et al., 2013).

Além da quantidade de bactérias presentes no trato digestivo, a sua composição pode variar entre os diferentes indivíduos e cada grupo associa-se com um padrão único de enterotipos bacterianos. Por exemplo, estudos têm demonstrado diferenças relevantes em filos, famílias e gêneros bacterianos entre indivíduos saudáveis e pacientes obesos (com ou sem EHNA) (MOUZAKI et al., 2013; ZHU et al., 2013).

O supercrescimento bacteriano de intestino delgado (SCBID) é uma condição caracterizada por um contagem bacteriana $\geq 10^5$ UFC/ml no intestino delgado proximal (GABRIELLI et al., 2013; PIMENTEL et al., 2020), cujos principais sintomas incluem dor

abdominal, inchaço, flatulência e diarreia, similarmente ao observado em pacientes com Síndrome do Intestino irritável (BELEI et al., 2017; YAKOOB et al., 2011).

Vários fatores de risco para o SCBID tem sido identificados, incluindo disordens na motilidade do intestino delgado, distorção anatômica do trato gastrointestinal por cirurgia, deficiência de IgA, síndrome da imunodeficiência adquirida causada pelo vírus da imunodeficiência humana, obesidade (WIJARNPREECHA et al., 2019) e uso de bloqueadores de bomba de prótons (JACOBS et al., 2013).

A exata prevalência de SCBID é desconhecida, porque seu diagnóstico requer uso de testes invasivos como a cultura do aspirado jejunal ou testes respiratórios. A prevalência de SCBID entre as diversas populações é bem variada. Por exemplo, o SCBID foi observado em 33% de indivíduos com queixas abdominais gerais (gases, distensão ou dor abdominal e diarreia) (BALMORI et al., 2019), 40,8% entre portadores de cirrose hepática (MASLENNIKOV; PAVLOV; IVASHKIN, 2018), 22,3% entre indivíduos com diagnóstico de Síndrome do Intestino Irritável (SHAH et al., 2019) e 15% entre portadores de pancreatite crônica não cirúrgica (NÍ CHONCHUBHAIR et al., 2018).

Dados da década de 1970 sugeriram que o SCBID pode exercer um papel na DHGNA com descrição de degeneração gordurosa relatada em pacientes obesos com bypass jejuno-ileal ou diverticulose de intestino delgado, ambas condições que favorecem o supercrescimento bacteriano (SABATÉ et al., 2008).

Em 2009, Miele e colaboradores demonstraram uma prevalência de SCBID duas vezes maior em indivíduos com DHGNA quando comparados com controles normais e forneceram a primeira evidência de que a DHGNA em humanos poderia estar associada com aumento da permeabilidade intestinal e SCBID nesses pacientes (MIELE et al., 2009).

Em 2019, um estudo realizado na Indonésia demonstrou uma prevalência de 65,5% de SCBID entre pacientes com DHGNA; porém não foi evidenciada correlação significativa com o desenvolvimento da doença, esteatose ou grau de fibrose hepática (FITRIAKUSUMAH et al., 2019).

No Brasil, os dados de prevalência do SCBID na população portadora de DHGNA são escassos. Em 2016, embora elevados índices de permeabilidade intestinal alterada

tenham sido relatados em pacientes com DHGNA, uma baixa prevalência de SCBID foi reportada nestes pacientes (FEROLLA et al., 2016). Neste sentido, estudos são necessários para tentar determinar a real prevalência de SCBID e a sua relação com o grau de fibrose hepática em brasileiros portadores de DHGNA.

2.2.2 Diagnóstico

O teste padrão ouro para o diagnóstico do SCBID é a cultura direta do aspirado jejunal (GABRIELLI et al., 2013), sendo considerada positiva uma contagem superior a 10^5 UFC/mL (LOSURDO et al., 2019). Em testes diagnósticos baseados em cultura, a técnica asséptica é decisiva para minimizar a contaminação cruzada e, por isso, métodos padronizados são necessários. As limitações deste método incluem sua natureza invasiva, custo elevado, incapacidade de detectar cepas bacterianas que são difíceis de crescer sob condições padrão de cultura, detecção apenas de SCBID proximal e contaminação da amostra (RAO; BHAGATWALA, 2019).

Diante das desvantagens das culturas, diferentes testes respiratórios foram desenvolvidos. Existem três tipos principais de testes respiratórios para diagnosticar SCBID. O primeiro foi o teste respiratório de ácido biliar, dependendo da capacidade bacteriana em desconjugar tais ácidos, porém raramente utilizado hoje. No teste respiratório de 1g de ^{14}C -D-xilose os pacientes recebem 1g de D-xilose marcada com ^{14}C Carbono. Na presença de bactérias no intestino delgado, a xilose é metabolizada para $^{14}\text{CO}_2$ que será absorvido e expirado possibilitando a detecção de picos precoces ou tardios (SIMRÉN; STOTZER, 2006). Testes respiratórios de hidrogênio (ou metano) usando glicose ou lactulose são os mais utilizados atualmente por serem não invasivos, baratos, simples e seguros (GABRIELLI et al., 2013; PIMENTEL et al., 2020).

Durante o teste respiratório de hidrogênio/metano, o carboidrato ingerido no teste é metabolizado por bactérias da microbiota gastrointestinal levando à produção de gases que são detectados e mensurados. Alguns desses são absorvidos pela corrente sanguínea e finalmente exalados pelos pulmões. A análise da amostra respiratória obtida representa uma medida indireta de detecção de SCBID (RAO; BHAGATWALA, 2019).

Os substratos mais utilizados nos testes são glicose e lactulose. O primeiro é um monossacarídeo completamente absorvido no intestino delgado proximal, o último é um

dissacarídeo mal absorvido que atinge o ceco. Em indivíduos com SCBID, o teste respiratório com glicose mostra um pico único precoce de hidrogênio, enquanto que no teste com lactulose são percebidos dois picos distintos: o pico precoce devido à atividade da microflora do intestino delgado e o segundo pico devido ao metabolismo bacteriano colônico (GASBARRINI; CORAZZA; GASBARRINI, 2009) (Figura 2).

Para a realização do teste recomenda-se evitar tratamento com antibióticos nas últimas 4 semanas, agentes pró-cinéticos e laxativos uma semana antes do teste, manter uma dieta evitando alimentos fermentáveis no dia anterior ao exame. No dia do teste, orienta-se jejum de 8-12 horas, evitar fumar e minimizar atividades físicas (RAO; BHAGATWALA, 2019).

Infelizmente, os testes respiratórios ainda não são totalmente padronizados, em termos de concentração dos substratos, duração dos testes, intervalo entre coleta de amostras respiratórias e valores de pontos de corte (AUGUSTYN; GRYS; KUKLA, 2019; GABRIELLI et al., 2013).

Para o diagnóstico do SCBID, o Consenso de Roma III recomenda uma amostra respiratória basal seguida da administração de 50g de glicose ou 10g de lactulose e novas amostras respiratórias a cada 15 minutos por 2 a 4 horas, respectivamente para o teste com glicose ou lactulose. O ponto de corte mais utilizado para um teste ser considerado positivo é a elevação de 10-12ppm em relação ao valor basal (GASBARRINI; CORAZZA; GASBARRINI, 2009).

O grupo de consenso norte-americano sobre testes respiratórios com hidrogênio e metano sugere utilizar uma dose de 10g de lactulose ou 75g de glicose misturada ou seguida por um copo de água e um ponto de corte ≥ 20 ppm acima do basal em 90 minutos (REZAIE et al., 2017). O teste respiratório com lactulose tem se mostrado com uma pobre performance diagnóstica para detectar SCBID, enquanto que o teste com glicose apresenta um performance levemente melhor (BARBARA et al., 2016). As sensibilidades e especificidades diagnósticas de acordo com a modalidade do teste são, respectivamente: 6%-93% e 78%-100% para o teste respiratório com glicose e 6%-68% e 44%-70% para o teste com lactulose (LO; CHAN, 2013).

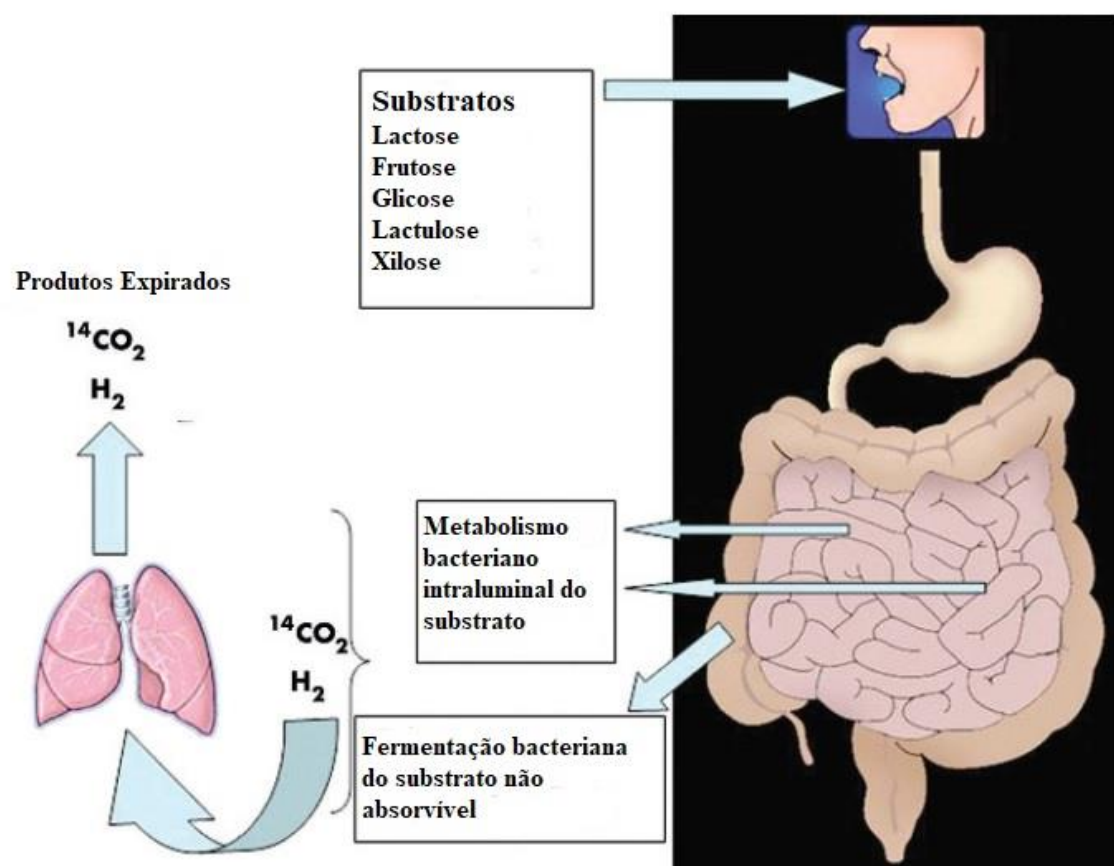


Figura 2: Figura esquemática representando os princípios dos testes respiratórios. Adaptado da referência (SIMRÉN; STOTZER, 2006).

Algumas limitações nos testes respiratórios com hidrogênio para o diagnóstico de SCBID podem ser relatadas. Uma proporção de indivíduos possui bactérias que não produzem hidrogênio, mas produzem outros gases como metano e sulfeto de hidrogênio, e o SCBID, se presente, pode não ser detectado (GHOSHAL, 2011). Por causa da absorção precoce da glicose, o teste respiratório com esse substrato pode não ser capaz de detectar supercrescimento de intestino delgado distal (íleo) (GABRIELLI et al., 2013; RAO; BHAGATWALA, 2019). Em indivíduos com tempo de trânsito intestinal acelerado podem apresentar resultados falso-positivos (GASBARRINI; CORAZZA; GASBARRINI, 2009).

2.3 DISFUNÇÃO AUTÔNOMICA CARDIOVASCULAR NA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA

2.3.1 Definição, fisiopatologia e epidemiologia

O fígado é innervado pelo sistema nervoso simpático e parassimpático. Esses sistemas enviam informações sobre osmolaridade hepática, concentrações de glicose e lipídios para o cérebro através dos neurônios aferentes, e recebem variedades de sinais incluindo fluxo sanguíneo, secreção biliar e metabolismo através dos neurônios eferentes (MIZUNO; UENO, 2017). Um adequado balanço autonômico hepático é importante na manutenção do ritmo circadiano de enzimas hepáticas e nível de glicose. O desequilíbrio desta função tem sido proposto como um componente da patogênese (KUMAR et al., 2016) e progressão da DHGNA (SABATH; BÁEZ-RUIZ; BUIJS, 2015).

O sistema nervoso autônomo (SNA) simpático e parassimpático também desempenha um papel central na regulação da função cardiovascular (Figura 3). Uma disfunção autonômica tem sido descrita como um fator de risco relevante para mortes por doenças cardiovasculares (OZVEREN et al., 2014).

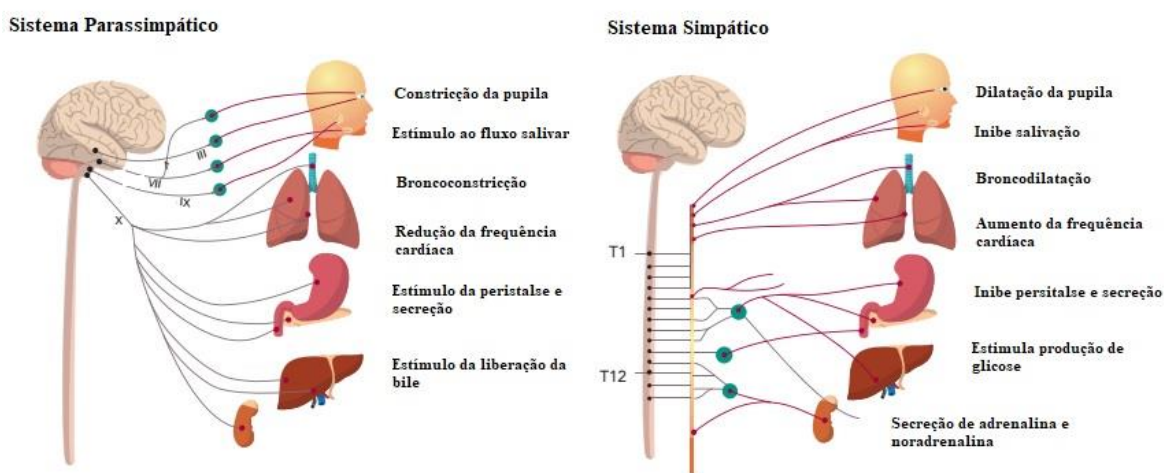


Figura 3: Esquema da anatomia dos sistemas nervosos simpático e parassimpático com conexões e efeitos nos vários órgãos e sistemas. Adaptado da referência (SINGH et al., 2018)

O SNA atua no controle do sistema cardiovascular através de nervos aferentes e eferentes ao coração, através de terminações simpáticas por todo o miocárdio e parassimpáticas para o nódulo sinusal, o miocárdio atrial e o nódulo atrioventricular. A

regulação do SNA sobre o coração provém de informações de receptores, como os barorreceptores, quimioceptores, receptores atriais, receptores cardiopulmonares, receptores ventriculares, além de modificações do sistema respiratório, sistema vasomotor, sistema renina-angiotensina-aldosterona e sistema termorregulador (VANDERLEI et al., 2009).

A partir das informações aferentes, através de uma complexa interação de estímulo e inibição, respostas das vias simpática e parassimpática são formuladas e ajustadas para controle da frequência cardíaca (FC). O aumento na FC é ocasionado por maior ação da via simpática e da menor atividade parassimpática, enquanto que, a sua redução depende basicamente do predomínio da atividade vagal (KHAN; LIP; SHANTSILA, 2019; VANDERLEI et al., 2009).

Evidências recentes sugerem a presença de disfunção autonômica cardíaca em indivíduos com DHGNA (ANSTEE et al., 2018). Em uma coorte de 2015, Sun e colaboradores demonstraram que pacientes com DHGNA foram associados com um risco maior de disfunção autonômica do que aqueles sem DHGNA; tal associação foi independente dos vários fatores de risco metabólicos tradicionais como índice de massa corporal, status do metabolismo lipídico e glicídico, vigência de tabagismo ou prática de atividade física (SUN et al., 2015).

Em 2016, Kumar et al. analisando 75 indivíduos (portadores de DHGNA diabéticos e não diabéticos e controles saudáveis) demonstraram que o grau de DHGNA, bem como o status diabético, contribuem para uma diminuição na função autonômica cardiovascular com diminuição da variabilidade global da frequência cardíaca, mas com um equilíbrio simpatovagal inalterado. Também mostraram que uma vez que a DHGNA é desenvolvida, a diminuição no controle autonômico é evidenciada principalmente em indivíduos com diabetes melito. Por outro lado, Liu e colaboradores (2013), demonstraram disautonomia em indivíduos com DHGNA independente dos fatores de risco cardiovasculares tradicionais, resistência à insulina e níveis séricos de leptina (LIU et al., 2013).

Pacientes com DHGNA exibem ainda maior prevalência de doença aterosclerótica coronariana, independente da incidência de síndrome metabólica (WÓJCIK-CICHY; KOŚLIŃSKA-BERKAN; PIEKARSKA, 2018). Vários mecanismos têm sido postulados para o desenvolvimento de aterosclerose acelerada em pacientes com DHGNA, especialmente nas formas necroinflamatórias (EHNA), incluindo predisposição genética, resistência à insulina, dislipidemia aterogênica, estresse oxidativo, inflamação crônica

subclínica, redução dos níveis de adiponectina e produção alterada de fatores pró e anticoagulantes (PATIL; SOOD, 2017).

Nos últimos anos têm crescido o interesse na interação microbiota-hospedeiro e o papel fundamental da microbiota intestinal na saúde e doença humana, incluindo doenças cardiovasculares. Um quadro de disbiose intestinal tem sido relacionada com aterosclerose, hipertensão arterial, insuficiência cardíaca, doença renal crônica, obesidade e diabetes melito tipo 2 (ANSTEE et al., 2018; BALLESTRI et al., 2014; TANG; KITAI; HAZEN, 2018).

Metabólitos oriundos da microbiota intestinal têm sido relacionados na gênese de diversas patologias cardiometabólicas. Trimetilamina (TMA) é uma amina sintetizada por enzimas bacterianas a partir de componentes da dieta como L-carnitina, lecitina, colina e betaina. Após ser produzida é metabolizada no fígado e convertida a N-óxido-trimetilamina (TMAO). Existem inferências de correlação do TMAO com risco de doença cardiovascular e seus efeitos deletérios à saúde humana vêm sendo discutidos (BRIAL et al., 2018; HAISSMAN et al., 2017; YANG et al., 2019). A interação entre disbiose intestinal e doenças cardiovasculares carece de mais estudos, especialmente no contexto da doença hepática gordurosa não alcoólica.

2.3.2 Avaliação da função autonômica através da Variabilidade da Frequência Cardíaca

Os batimentos cardíacos não possuem a regularidade de um relógio, e alterações na frequência cardíaca, definidas como variabilidade da frequência cardíaca (VFC), são normais e esperadas e indicam a habilidade do coração em responder aos múltiplos estímulos fisiológicos e ambientais (respiração, exercício físico, estresse mental, alterações hemodinâmicas e metabólicas, sono e ortostatismo), bem como em compensar desordens induzidas por doenças (VANDERLEI et al., 2009).

A VFC avalia as oscilações dos intervalos entre batimentos cardíacos consecutivos (intervalos R-R), que estão relacionadas às influências do SNA sobre o nódulo sinusal, sendo uma medida não invasiva, que pode ser utilizada para identificar fenômenos relacionados ao SNA em indivíduos saudáveis, atletas e portadores de doenças. A VFC pode variar quanto ao sexo, mulheres tem menor VFC; quanto à idade, o envelhecimento diminui a VFC e quanto à atividade física, indivíduos mais treinados, tem maior VFC (SHAFFER, GINSBERG, 2017).

A redução da VFC tem sido vista como um indicador de risco relacionado a eventos adversos em indivíduos normais e em várias doenças. Uma alta VFC é geralmente encontrada em indivíduos saudáveis, desde que determinadas condições como arritmias, por exemplo fibrilação atrial, não estejam presentes (SHAFFER; GINSBERG, 2017).

Critérios formais para Variabilidade da Frequência Cardíaca e comparação de variáveis foram desenvolvidos por uma força tarefa entre as Sociedades Européia de Cardiologia e Sociedade Norte Americana de Estimulação e Eletrofisiologia em 1996 e atualizadas em 2015. Os principais métodos de análise podem ser divididos em domínio do tempo (subdividido em abordagens estatísticas e geométricas) e no domínio da frequência (SINGH et al., 2018).

Preparar a medida da VFC deve envolver respostas a alguns questionamentos. O cumprimento da medida é relevante de acordo com o tipo de parâmetro de interesse. Quando o foco está em parâmetros básicos, um período de medida de 5 minutos ou menos pode ser suficiente. Quando as flutuações em longo prazo são relevantes, um período de medição maior será necessário (ERNST, 2017). Podemos descrever a variabilidade da frequência cardíaca usando domínio do tempo, domínio da frequência e medidas não lineares através de aferições em 24 horas, aferições de curto prazo (aproximadamente 5 minutos) ou ultracurto prazo (menor que 5 minutos).

Os índices de VFC no domínio do tempo medem as variações nas aferições do intervalo entre batimentos cardíacos sinusais sucessivos. Os valores podem ser expressos em unidades originais ou como logaritmo natural das unidades originais para obtenção de uma distribuição mais normal. As medições no domínio da frequência estimam a distribuição da potência absoluta ou relativa em quatro bandas de frequência, a saber: ultra-baixa frequência (ULF), frequência muito baixa (VLF), frequência baixa (LF) e alta frequência (HF) (SHAFFER; GINSBERG, 2017).

Os índices estatísticos, no domínio do tempo, obtidos pela determinação de intervalos RR correspondentes em qualquer ponto no tempo, são:

- a) SDNN - Desvio padrão de todos os intervalos RR normais gravados em um intervalo de tempo, expresso em ms;
- b) SDANN - Representa o desvio padrão das médias dos intervalos RR normais, a cada 5 minutos, em um intervalo de tempo, expresso em ms;

c) SDNNi - É a média do desvio padrão dos intervalos RR normais a cada 5 minutos, expresso em ms;

d) rMSSD - É a raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes, em um intervalo de tempo, expresso em ms;

e) pNN50 - Representa a porcentagem dos intervalos RR adjacentes com diferença de duração maior que 50ms.

Os índices SDNN, SDANN e SDNNi são obtidos a partir de registros de longa duração e representam as atividades simpática e parassimpática, porém não permitem distinguir quando as alterações da VFC são devidas ao aumento do tônus simpático ou à retirada do tônus vagal. Já os índices rMSSD e pNN50 representam a atividade parassimpática, pois são encontrados a partir da análise de intervalos RR adjacentes (VANDERLEI et al., 2009).

Os métodos no domínio da frequência permitem a distinção entre alta frequência (HF) e baixa frequência (LF). As bandas HF (entre 0,14 e 0,40 Hz) refletem a atividade do sistema nervoso parassimpático, enquanto que as bandas LF (entre 0,04 e 0,15 Hz) são aceitas como reflexo da atividade do sistema nervoso simpático (SINGH et al., 2018). A relação LF/HF reflete as alterações absolutas e relativas entre os componentes simpático e parassimpático do SNA, caracterizando o balanço simpato-vagal sobre o coração (VANDERLEI et al., 2009).

Uma grande variedade de dispositivos médicos e esportivos ambulatoriais estão disponíveis para detectar batimentos cardíacos. Os dispositivos de eletrocardiograma oferecem a maneira mais precisa de medir a VFC, seja usando apenas o ponto fiducial do complexo QRS ou, melhor ainda, utilizando todo o complexo do eletrocardiograma processado por algoritmos de computador. Embora os aparelhos de eletrocardiograma ambulatoriais de múltiplas derivações tenham servido como padrão, vários dispositivos alternativos são mais convenientes e práticos para medir os parâmetros da VFC e sua validade continua sendo estudada (SINGH et al., 2018).

3 ABORDAGEM METODOLÓGICA

3.1 DESENHO DO ESTUDO

Foi realizado estudo epidemiológico, quantitativo, transversal, de caráter analítico e exploratório, vinculado a um protocolo de estudo original intitulado como: “Avaliação De Eficácia Da Intervenção Com Probióticos No Tratamento Da Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica”. No estudo original, após avaliação inicial dos participantes estes seriam submetidos à intervenção terapêutica com probióticos ou placebo e submetidos a posterior reavaliação. Para o desenvolvimento do estudo atual, analisaram-se apenas os indivíduos antes da intervenção terapêutica (Figura 4).

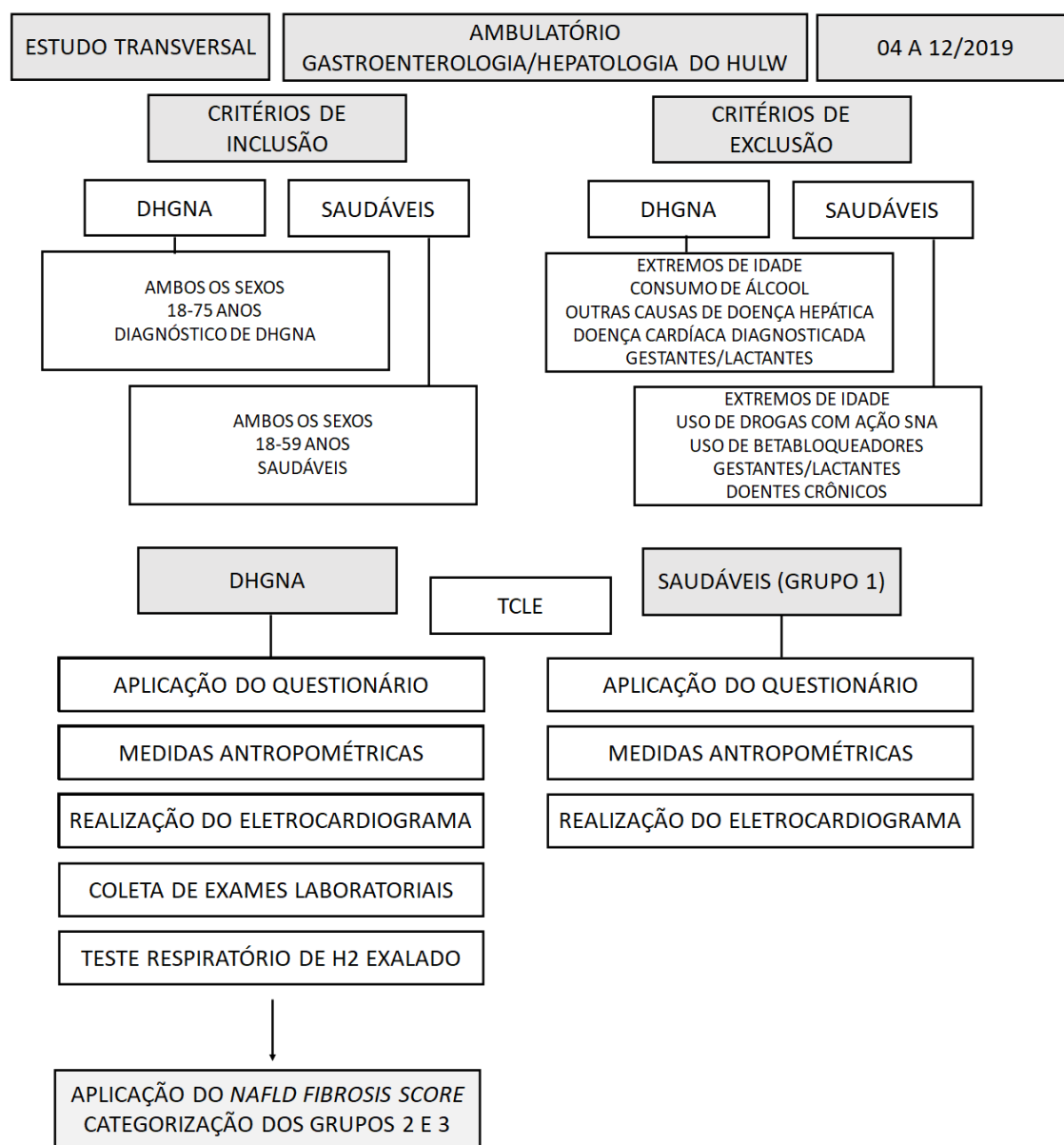


Figura 4: Fluxograma de seleção de participantes para a pesquisa e instrumentos para coleta de dados

3.2 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de ética em Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW) da Universidade Federal da Paraíba (referência 03871618.0.0000.5183) e todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com a resolução 466/2012 do Conselho nacional da Saúde/Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. Todos os participantes deram seu consentimento para inclusão antes de participarem do estudo (APÊNDICE A).

3.3 LOCAL DO ESTUDO

Foi realizado no Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW), localizado na cidade de João Pessoa no estado da Paraíba envolvendo indivíduos atendidos no ambulatório de Gastroenterologia/Hepatologia.

3.4 POPULAÇÃO DO ESTUDO

O presente estudo foi conduzido com portadores de Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica, recrutados por livre demanda no período de abril/2019 a dezembro/2019, atendidos no serviço de Gastroenterologia/Hepatologia do Hospital Universitário Lauro Wanderley – UFPB.

Foram incluídos na pesquisa os indivíduos maiores de 18 e menores de 75 anos de ambos os sexos, com diagnóstico de Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica e indivíduos entre 18 e 59 anos saudáveis.

Os participantes foram alocados em três grupos: **Grupo 1:** 30 controles saudáveis - indivíduos saudáveis, sem evidências de doença hepática, cardíaca ou metabólica; **Grupo 2:** 17 indivíduos portadores de doença hepática gordurosa não alcoólica com um ponto de corte menor que -1,455 no escore *NAFLD fibrosis score (NFS)* e **Grupo 3:** 31 pacientes portadores de doença hepática gordurosa não alcoólica com um ponto de corte maior que -1,455 no escore *NAFLD fibrosis score (NFS)*.

3.5 CRITÉRIOS E PROCEDIMENTOS PARA SELEÇÃO DO ESTUDO

Os indivíduos recrutados foram esclarecidos de forma acessível e objetiva sobre o tema do estudo, com posterior assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A), ilustrando-se a não obrigatoriedade de participação.

Para compor o grupo controle (Grupo 1) foi incluída uma amostra aleatória de indivíduos saudáveis, com idades entre 18 e 59 anos, sendo excluídos indivíduos portadores de doenças crônicas não transmissíveis, além de indivíduos em uso de drogas com ação no sistema nervoso central ou betabloqueadores, portadores de marcapasso cardíaco ou com variações anatômicas, lesão torácica ou qualquer outra condição que impedisse o correto posicionamento do cinto elástico ou dos eletrodos de ECG. O grupo controle foi recrutado com uma faixa etária inferior ao grupo com DHGNA na tentativa de minimizar o efeito da idade nas medidas da variabilidade da frequência cardíaca.

Os critérios de inclusão adotados para os grupos 2 e 3 foram: Indivíduos maiores de 18 e menores de 75 anos de ambos os sexos portadores de Doença Hepática Gordurosa Não Alcolica diagnosticados por exames de imagem (Ultrassonografia abdominal, Tomografia abdominal ou Ressonância Magnética abdominal) ou biópsia hepática e na ausência de causas secundárias de infiltração gordurosa hepática.

Os critérios de exclusão para todos os grupos consistiram em: Indivíduos menores de 18 anos ou maiores de 75 anos, portadores de Doença Hepática de outras etiologias tais como: hepatites virais crônicas (Vírus da hepatite B, D ou C), Hepatite Auto-imune, portadores de Hemocromatose, doença de Wilson ou deficiência de Alfa1-antitripsina; portadores de Doença Hepática Gordurosa secundária ao consumo significativo de álcool ou uso prolongado de medicação esteatogênica, gestantes e lactantes, pacientes com conhecido comprometimento da função ou ritmo cardíaco (transplantados cardíacos, usuários de marcapasso cardíaco ou presença de arritmia cardíaca).

3.6 PROCEDIMENTOS E INSTRUMENTOS PARA COLETA DE DADOS

Os pacientes dos grupos 2 e 3 foram recrutados por livre demanda ambulatorial. Nesse primeiro contato os pacientes foram informados sobre o teor da pesquisa e receberam as orientações básicas sobre os procedimentos que seriam adotados e tiveram suas avaliações agendadas. No segundo encontro, já na data previamente agendada, após a assinatura do TCLE, foi aplicado um questionário para coleta de dados clínicos tais como: sexo, data de nascimento, estado civil, escolaridade, prática de atividade física e acompanhamento nutricional, medicações em uso, história de doenças pregressas (Diabetes Melito, Hipertensão Arterial, dislipidemia, etc). Ainda nesse momento foram obtidas as medidas antropométricas (peso, altura, Índice de Massa Corporal e circunferência abdominal), bem como medida de pressão arterial conforme protocolos relatados no

decorrer da metodologia. Em seguida foram realizados coleta de sangue para testes laboratoriais estando o paciente de jejum de 12 horas, teste respiratório com hidrogênio exalado para pesquisa de Supercrescimento Bacteriano de Intestino Delgado e eletrocardiograma de 15 minutos para análise da variabilidade da frequência cardíaca.

Os indivíduos do grupo 1 passaram pelas etapas de contato inicial, entrevista, obtenção de dados de história clínica e dados antropométricos e realização de eletrocardiograma. Esses indivíduos não foram submetidos à testes bioquímicos laboratoriais ou o teste respiratório de hidrogênio exalado com glicose como substrato.

Todos os exames foram coletados pela pesquisadora e por uma enfermeira previamente treinada antes do início da pesquisa.

3.6.1 Avaliação Antropométrica

Foi aplicado um questionário a todos os participantes (APÊNDICE B), a fim de recuperar informações sobre idade, sexo, atividade física, aconselhamento nutricional, doenças prévias, tempo de doença e uso de medicamentos.

Para aferição de peso e altura, inicialmente foi checado se a balança estava calibrada (a agulha do braço e o fiel devem estar na mesma linha horizontal), em seguida a balança era travada e só então o indivíduo era convidado a subir no equipamento. Tomou-se a medida do indivíduo quando este encontrava-se em pé, posicionado de costas para o estadiômetro, sem dobrar os joelhos (KAC; SICHIERI; GIGANTE, 2007). Os participantes do estudo foram orientados a retirar os calçados, chapéus, bonés e as mulheres para que estivessem com os cabelos soltos, evitando o aumento incorreto da altura.

Para a mensuração do peso, foi utilizada uma balança mecânica *Welmy®*, modelo 110 CH, com capacidade de até 150 Kg e precisão de 100 g. Para o registro da altura (cm) foi mensurada com um estadiômetro já acoplado a balança.

A circunferência da cintura (cm) foi medida no nível do ponto médio entre a margem inferior da última costela e a crista ilíaca medida horizontalmente usando uma fita inelástica (TRAN et al., 2018).

3.6.2 Avaliação Bioquímica

Amostras de sangue foram coletadas por enfermeira habilitada, apenas para os indivíduos dos grupos 2 e 3, com jejum de 12 horas, sem exercício extenuante 24 horas antes e sem ingestão de bebida alcoólica 72 horas prévia à coleta e encaminhadas para

análise no laboratório de estudos de treinamento físico aplicado ao desempenho e saúde (LEFTADS) da UFPB. As concentrações de glicose, creatinina e triglicerídeos foram determinadas por método enzimático automatizado; *high density lipoprotein cholesterol* (HDL-c), *low density lipoprotein cholesterol* (LDL-c) e colesterol total, por método colorimétrico direto; aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e gamaglutamil transferase por método cinético colorimétrico; ferritina pelo ensaio imunoturbidimétrico; albumina por ensaio de ponto final. O hemograma e a hemoglobina glicada foram realizados em laboratório particular pelos seguintes métodos, respectivamente: determinação eletrônica em aparelho Pentra 120 ABX e *high-performance liquid chromatography* (HPLC).

3.6.3 Avaliação do Supercrescimento Bacteriano de Intestino Delgado

Antes do teste respiratório, o paciente foi orientado a fazer jejum de 12 horas e não consumir leite ou derivados nas 48 horas que antecederam o exame, também não devendo ter se submetido à colonoscopia ou uso de probióticos/antibióticos nos 30 dias anteriores ao exame. Cada indivíduo foi admitido na sala do exame e, depois de checado o cumprimento das condições de preparo, o teste era iniciado e o paciente soprava vagarosamente em um aparelho portátil que mede a concentração inicial (basal) de hidrogênio. Depois foi ofertada glicose anidra 50g diluída em 250ml de água potável e amostras adicionais do ar expirado no aparelho foram analisadas e medido o hidrogênio a cada 30 minutos por duas horas. Quando está presente o Supercrescimento Bacteriano do Intestino Delgado, a ingestão de glicose resulta em picos de produção de hidrogênio durante o teste causados pela fermentação bacteriana intestinal e determinando elevações maiores que 20ppm acima do valor basal aferido. Após decorridas duas horas da ingestão da Glicose Anidra, o teste era encerrado e o paciente liberado. Os pacientes eram questionados sobre o surgimento de possíveis efeitos adversos ou sintomas desencadeados pela ingestão do carboidrato.

3.6.4 Avaliação eletrocardiográfica e variabilidade da frequência cardíaca

O eletrocardiograma (ECG) foi ajustado para uma taxa de amostragem de 1 KHz, faixa de 2 milivolts usando um filtro digital de 50 Hz (passa-baixo). Todos os dados foram exportados e analisados pela pesquisadora, utilizando o software LabChart 8. As gravações de ECG foram processadas por software (módulo de análise de ECG para LabChart Pro;

ADInstruments) para detecção automática das ondas R e cálculo batimento por batimento do intervalo RR. Para a detecção de ECG, 80 ms foram utilizados para determinar a largura típica do QRS e para as ondas R com pelo menos 300 ms de distância. Para análise de ECG, foram utilizados 240 ms para o PR máximo e 240 ms para o máximo.

As medidas de VFC foram obtidas com o paciente em jejum, de repouso em decúbito dorsal, em um ambiente climatizado sem ruído excessivo, sempre pela manhã (entre 8:00 e 10:00). Um registro curto de 15 minutos foi realizado com os participantes sendo instruídos a permanecerem em silêncio e a respirar normalmente.

O eletrocardiógrafo utilizado foi um componente do aparelho ADInstruments® PowerLab® modelo 26T-LTS com a configuração de 5 eletrodos através do software de aquisição de dados LabChart (ADInstruments®, Bella Vista, NSW, Austrália). Após um período de estabilização inicial de 5 minutos, a gravação era realizada durante um período de 10 minutos.

Utilizamos o método linear para avaliação dos índices da VFC, tanto no domínio de tempo como no domínio de frequência, além de medidas não lineares. No domínio de tempo foram avaliados os índices estáticos SSDN, rMSSD, pNN50 e no domínio de frequência, alta frequência, baixa frequência e a relação baixa frequência / alta frequência. Quanto ao método não linear utilizamos o Poincaré plot avaliando as mediadas: SD1, SD2 e a relação SD1/SD2.

3.7 ANÁLISE DE DADOS

Os valores foram relatados como média (intervalo de confiança de 95%) ou % (n). AST, ALT, GGT, ferritina, o APRI e FIB4 foram transformados em log para normalizar os dados e apresentados como médias geométricas e intervalo de confiança. A variável idade foi analisada pelo teste ANOVA one-way, após o pós-teste de Tukey. A pressão arterial, parâmetros bioquímicos, análise de ECG e medidas de VFC foram analisados usando ANCOVA de uma via com correção para idade e sexo. Os dados categóricos foram analisados por teste qui-quadrado. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$. ANCOVA e qui-quadrado foram realizados com o programa SPSS 20.0 (IBM Corporation, Armonk, NY) e as demais análises estatísticas foram realizadas com o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA).

4 RESULTADOS

O presente trabalho foi desenvolvido no período de abril a dezembro de 2019 envolvendo indivíduos atendidos no ambulatório de Gastroenterologia/Hepatologia do Hospital Universitário Lauro Wanderley. O estudo teve por objetivos avaliar os parâmetros cardiometabólicos e presença de supercrescimento bacteriano de intestino delgado em indivíduos portadores de doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), bem como sua correlação com o grau de severidade da doença estimado por escore de fibrose (*NAFLD fibrosis score* - NFS).

Dentre os principais achados evidenciamos que os componentes de baixa frequência (LF) e a relação LF/HF na análise de variabilidade da frequência cardíaca foram menores em indivíduos com DHGNA e elevado risco de fibrose avançada estimada pelo NFS quando comparados ao grupo com menor risco de fibrose avançada.

Observou-se ainda uma prevalência de supercrescimento bacteriano de intestino delgado de 8,33% entre indivíduos com doença hepática gordurosa não alcoólica, resultado este bem inferior aos relatados em estudos de outras nacionalidades e ligeiramente maior que o encontrado naquele que parece ser o único estudo brasileiro conduzido com população semelhante. Entretanto a presença de SIBO, bem como os parâmetros metabólicos, não demonstraram relação com o grau de fibrose estimada pelo NFS.

O estudo nos permitiu concluir que a DHGNA se associa com disfunção cardíaca autonômica sendo evidenciado maior prejuízo em correlação com maior grau de fibrose hepática avançada estimada por um perfil de biomarcadores não-invasivos.

Nossos dados permitiram a confecção de um artigo intitulado “Association of worsening of nonalcoholic fatty liver disease with cardiometabolic function and intestinal bacterial overgrowth: a cross-sectional study” e apresentado no Apêndice C. Tal artigo foi submetido e formalmente aceito para publicação pela periódico Plos One, ISSN: 1932-6203, Qualis A1, Fator de impacto: 2.740.

REFERÊNCIAS

- AL-MUZAFAR, H. M.; AMIN, K. A. Probiotic mixture improves fatty liver disease by virtue of its action on lipid profiles, leptin, and inflammatory biomarkers. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 43, 13 dez. 2017.
- ALLER, R. et al. Documento de consenso. Manejo de la enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHGNA). Guía de práctica clínica. **Gastroenterología y Hepatología**, v. 41, n. 5, p. 328–349, 2018.
- ANGULO, P. et al. ORIGINAL ARTICLES The NAFLD Fibrosis Score: A Noninvasive System That Identifies Liver Fibrosis in Patients with NAFLD. **Hepatology**, v. 45, n. 4, p. 846–854, 2007.
- ANSTEE, Q. M. et al. Risk of cardiomyopathy and cardiac arrhythmias in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 15, n. 7, p. 425–439, 2018.
- AUGUSTYN, M.; GRYS, I.; KUKLA, M. Small intestinal bacterial overgrowth and nonalcoholic fatty liver disease. **Clinical and Experimental Hepatology**, v. 5, n. 1, p. 1–10, 2019.
- BALLESTRI, S. et al. Risk of cardiovascular, cardiac and arrhythmic complications in patients with non-alcoholic fatty liver disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 7, p. 1724–1745, 2014.
- BALMORI, M. A. et al. Diagnostic Utility of Carbohydrate Breath Tests for SIBO , Fructose , and Lactose Intolerance. **Digestive Diseases and Sciences**, v. XX, n. XX, p. <https://doi.org/10.1007/s10620-019-05889-9>, 2019.
- BARBARA, G. et al. The Intestinal Microenvironment and Functional Gastrointestinal Disorders. **Gastroenterology**, v. 150, n. 6, p. 1305–1318, 2016.
- BEDOSSA, P.; POYNARD, T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. **Hepatology**, v. 24, n. 2, p. 289–93, 1996.
- BELEI, O. et al. The relationship between non-alcoholic fatty liver disease and small intestinal bacterial overgrowth among overweight and obese children and adolescents. **Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism**, v. 30, n. 11, p. 1161–1168, 2017.
- BORRELLI, A. et al. Role of gut microbiota and oxidative stress in the progression of non-alcoholic fatty liver disease to hepatocarcinoma : Current and innovative therapeutic approaches. **Redox Biology**, v. 15, p. 467–479, 2018.
- BOURSIER, J. et al. New sequential combinations of non-invasive fibrosis tests provide an accurate diagnosis of advanced fibrosis in NAFLD. **Journal of Hepatology**, v. 71, n. 2, p. 389–396, 2019.
- BOUTARI, C.; PERAKAKIS, N.; MANTZOROS, C. S. Association of adipokines with development and progression of nonalcoholic fatty liver disease. **Endocrinology and Metabolism**, v. 33, n. 1, p. 33–43, 2018.

BRIAL, F. et al. Implication of gut microbiota metabolites in cardiovascular and metabolic diseases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, n. 0123456789, 2018.

CARR, R. M.; ORANU, A. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathophysiology and Management. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 45, n. 4, p. 639–652, 2016.

CASTERA, L. Non-invasive tests for liver fibrosis in NAFLD : Creating pathways between primary healthcare and liver clinics. **Liver International**, v. 40, n. S1, p. 77–81, 2020.

CHALASANI, N. et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. **Gastroenterology**, v. 142, n. 7, p. 1592–1609, 2012.

CHALASANI, N. et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. **Hepatology**, v. 67, n. 1, p. 328–357, 2018.

COBBINA, E.; AKHLAGHI, F. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) – pathogenesis, classification, and effect on drug metabolizing enzymes and transporters. **Drug Metabolism Reviews**, v. 49, n. 2, p. 197–211, 3 abr. 2017.

CRUZ, J. F. et al. Prevalência e alterações ecográficas compatíveis com esteatose hepática em pacientes encaminhados para exame de ultrassonografia abdominal em Aracaju , SE. **Radiol Bras.**, v. 49, n. 1, p. 1–5, 2016.

DEGERTEKIN, M. Deterioration of Heart Rate Recovery Index in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). **Medical Science Monitor**, v. 20, p. 1539–1543, 2014.

EL-ZAYADI, A.-R. Hepatic steatosis: A benign disease or a silent killer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 26, p. 4120, 2008.

ERNST, G. Hidden Signals—The History and Methods of Heart Rate Variability. **Frontiers in Public Health**, v. 5, n. October, p. 1–12, 2017.

ESLAM, M.; VALENTI, L.; ROMEO, S. Genetics and epigenetics of NAFLD and NASH: Clinical impact. **Journal of Hepatology**, v. 68, n. 2, p. 268–279, 2018.

ESTES, C. et al. Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016–2030. **Journal of Hepatology**, v. 69, n. 4, p. 896–904, 2018.

FEROLLA, S. M. et al. Beneficial Effect of Synbiotic Supplementation on Hepatic Steatosis and Anthropometric Parameters , But Not on Gut Permeability in a Population with Nonalcoholic Steatohepatitis. **Nutrients**, v. 8, n. 7, p. 1–20, 2016.

FERRAIOLI, G.; MONTEIRO, L. B. S. Ultrasound-based techniques for the diagnosis of liver steatosis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 25, n. 40, p. 6053–6062, 2019.

FITRIAKUSUMAH, Y. et al. The role of Small Intestinal Bacterial Overgrowth (SIBO)

in Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) patients evaluated using Controlled Attenuation Parameter (CAP) Transient Elastography (TE): a tertiary referral center experience. **BMC Gastroenterology**, v. 19, n. 43, p. 1–7, 2019.

GABRIELLI, M. et al. Diagnosis of small intestinal bacterial overgrowth in the clinical practice. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 17, n. Suppl 2, p. 30–35, 2013.

GASBARRINI, A.; CORAZZA, G. R.; GASBARRINI, G. Methodology and indications of H₂ -breath testing in gastrointestinal diseases : the Rome Consensus Conference. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 29, n. s1, p. 1–49, 2009.

GHOSHAL, U. C. How to Interpret Hydrogen Breath Tests. **Journal of Neurogastroenterology and Motility**, v. 17, n. 3, p. 312–317, 2011.

GHOSHAL, U. C. et al. Low-grade small intestinal bacterial overgrowth is common in patients with non-alcoholic steatohepatitis on quantitative jejunal aspirate culture. **Indian Journal of Gastroenterology**, v. 36, n. 5, p. 390–399, 2017.

GRABHERR, F. et al. Gut Dysfunction and Non-alcoholic Fatty Liver Disease. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, p. 1–9, 2019.

HAISSMAN, J. M. et al. Microbiota-dependent metabolite and cardiovascular disease marker trimethylamine- N -oxide (TMAO) is associated with monocyte activation but not platelet function in untreated HIV infection. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 445, p. 1–8, 2017.

HOUGHTON, D. et al. The degree of hepatic steatosis associates with impaired cardiac and autonomic function and autonomic function. **Journal of Hepatology**, v. 70, n. 6, p. 1203–1213, 2019.

IMAJO, K. et al. Magnetic Resonance Imaging More Accurately Classifies Steatosis and Fibrosis in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease Than Transient Elastography. **Gastroenterology**, v. 150, n. 3, p. 626–637, 2016.

JACOBS, C. et al. Alimentary Pharmacology and Therapeutics Dysmotility and proton pump inhibitor use are independent risk factors for small intestinal bacterial and / or fungal overgrowth. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 37, n. 11, p. 1103–1111, 2013.

JAIS, A.; BRÜNING, J. C. Hypothalamic inflammation in obesity and metabolic disease. v. 127, n. 1, 2017.

KHAN, A. A.; LIP, G. Y. H.; SHANTSILA, A. Heart rate variability in atrial fibrillation : The balance between sympathetic and parasympathetic nervous system. **Eur J Clin Invest**, v. 49, n. 11, p. 1–8, 2019.

KUMAR, M. S. et al. Cardiovascular Autonomic Dysfunction in Patients of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **International Journal of Hepatology**, v. 2016, 2016.

KUPČOVÁ, V. Overview of the Pathogenesis , Genetic , and Non-Invasive Clinical , Biochemical , and Scoring Methods in the Assessment of NAFLD. **International Journal**

of Environmental Research and Public Health, v. 16, n. 3570, 2019.

LIU, Y. C. et al. Influence of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease on Autonomic Changes Evaluated by the Time Domain, Frequency Domain, and Symbolic Dynamics of Heart Rate Variability. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1–6, 2013.

LO, W.-K.; CHAN, W. W. Proton Pump Inhibitor Use and the Risk of Small Intestinal Bacterial Overgrowth: A Meta-analysis. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 5, p. 483–490, 2013.

LOSURDO, G. et al. Breath Tests for the Non-invasive Diagnosis of Small Intestinal Bacterial Overgrowth: A Systematic Review With Meta-analysis. **Journal of Neurogastroenterology and Motility**, v. XX, n. XX, p. <https://doi.org/10.5056/jnm19113>, 2019.

LUDWIG J et al. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 55, n. 7, p. 434–438, 1980.

MASLENNIKOV, R.; PAVLOV, C.; IVASHKIN, V. Small intestinal bacterial overgrowth in cirrhosis : systematic review and meta-analysis. **Hepatology International**, v. 12, n. 6, p. 567–576, 2018.

MIELE, L. et al. Increased Intestinal Permeability and Tight Junction Alterations in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Hepatology**, v. 49, p. 1877–1887, 2009.

MIZUNO, K.; UENO, Y. Autonomic Nervous System and the Liver. **Hepatology Research**, v. 47, n. 2, p. 160–165, 2017.

MOTAMED, N. et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and 10-year risk of cardiovascular diseases. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, v. 41, n. 1, p. 31–38, 2017.

MOUZAKI, M. et al. Intestinal Microbiota in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Hepatology**, v. 58, p. 120–127, 2013.

NÍ CHONCHUBHAIR, H. M. et al. Pancreatology The prevalence of small intestinal bacterial overgrowth in non-surgical patients with chronic pancreatitis and pancreatic exocrine insufficiency (PEI). **Pancreatology**, v. 18, n. 4, p. 379–385, 2018.

NOVERR, M. C.; HUFFNAGLE, G. B. Does the microbiota regulate immune responses outside the gut? **Trends in Microbiology**, v. 12, n. 12, p. 562–568, 2004.

OFOSU, A. Non-alcoholic fatty liver disease: controlling an emerging epidemic, challenges, and future directions. **Annals of Gastroenterology**, p. 288–295, 2018.

ÖNNERHAG, K. et al. Non-invasive fibrosis scoring systems can predict future metabolic complications and overall mortality in non-alcoholic fatty liver disease. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 54, n. 3, p. 328–334, 2019.

PANDYARAJAN, V. et al. Screening for Nonalcoholic Fatty Liver Disease in the Primary Care Clinic. **Gastroenterology & Hepatology**, v. 15, n. 7, p. 357–365, 2019.

PAPPACHAN, J. M. et al. Non-alcoholic Fatty Liver Disease: A Clinical Update. **Journal of Clinical and Translational Hepatology**, v. 5, n. 4, p. 384–393, 2017.

PATIL, R.; SOOD, G. K. Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk. **World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology**, v. 8, n. 2, p. 51, 2017.

PIMENTEL, M. et al. ACG Clinical Guideline : Small Intestinal Bacterial Overgrowth. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 115, n. 2, p. 165–178, 2020.

RAMAN, M. et al. Obese Humans With Nonalcoholic Fatty Liver Disease
CONCLUSIONS : **YJCGH**, v. 11, n. 7, p. 868–875.e3, 2013.

RAO, S. S. C.; BHAGATWALA, J. Small Intestinal Bacterial Overgrowth : Clinical Features and Therapeutic Management. **Clinical and Translational Gastroenterology**, v. 10, n. 10, p. 1–14, 2019.

RAY, G.; AGARWALA, T. ORIGINAL A study of metabolic parameters in non diabetic patients with non alcoholic fatty liver disease – importance of dyslipidemia. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 56, n. 3, p. 270–275, 2019.

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

ROCCARINA, D. et al. The Role of Methane in Intestinal Diseases. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 105, n. 6, p. 1250–1256, 2010.

SABATÉ, J. et al. High Prevalence of Small Intestinal Bacterial Overgrowth in Patients with Morbid Obesity : A Contributor to Severe Hepatic Steatosis. **Obesity Surgery**, v. 18, n. 4, p. 371–377, 2008.

SABATH, E.; BÁEZ-RUIZ, A.; BUIJS, R. M. Non-alcoholic fatty liver disease as a consequence of autonomic imbalance and circadian desynchronization. **Obesity Reviews**, v. 16, n. 10, p. 871–882, 2015.

SALTZMAN, E. T. et al. Intestinal microbiome shifts, dysbiosis, inflammation, and non-alcoholic fatty liver disease. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. JAN, p. 1–11, 2018.

SASSI, R. et al. Advances in heart rate variability signal analysis : joint position statement by the e-Cardiology ESC Working Group and the European Heart Rhythm Association co-endorsed by the Asia Pacific Heart Rhythm Society. **EP Europace**, v. 17, n. 9, p. 1341–1353, 2015.

SAYINER, M. et al. Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis in the United States and the Rest of the World. **Clinics in Liver Disease**, v. 20, n. 2, p. 205–214, 2016.

SCHIATTARELLA, G. G. et al. Diagnostics and therapeutic implications of gut microbiota alterations in cardiometabolic diseases. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 25, n. 4, p. 110–112, ago. 2018.

SHAFFER, F.; GINSBERG, J. P. An Overview of Heart Rate Variability Metrics and

Norms. **Frontiers in Public Health**, v. 5, n. September, p. 1–17, 2017.

SHAH, A. et al. Systematic review and meta - analysis : the prevalence of small intestinal bacterial overgrowth in inflammatory bowel disease. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 49, n. 6, p. 624–635, 2019.

SIMRÉN, M.; STOTZER, P.-O. Use and abuse of hydrogen breath tests. **Gut**, v. 55, n. 3, p. 297–303, 2006.

SINGH, N. et al. Heart Rate Variability : An Old Metric with New Meaning in the Era of using mHealth Technologies for Health and Exercise Training Guidance . Part One : Physiology and Methods Clinical Reviews : Clinical Arrhythmias. **Arrhythmia & Electrophysiology Review**, v. 7, n. 3, p. 193–198, 2018.

SUN, W. et al. Association between non-alcoholic fatty liver disease and autonomic dysfunction in a Chinese population. **Qjm**, v. 108, n. 8, p. 617–624, 2015.

SUNG, K. et al. Natural course of fatty liver in 36,195 South Korean adults. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 9062, 2019.

TANG, W. H. W.; KITAI, T.; HAZEN, S. L. Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease. **Circulation Research**, v. 120, n. 7, p. 1183–1196, 2018.

TRAN, N. T. T. et al. The importance of waist circumference and body mass index in cross-sectional relationships with risk of cardiovascular disease in Vietnam. **PLoS ONE**, v. 13, n. 05, p. 1–13, 2018.

VANDERLEI, L. C. M. et al. Noções básicas de variabilidade da frequência cardíaca e sua aplicabilidade clínica. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, v. 24, n. 2, p. 205–217, 2009.

VESPASIANI-GENTILUCCI, U.; GALLO, P.; PICARDI, A. The role of intestinal microbiota in the pathogenesis of NAFLD: Starting points for intervention. **Archives of Medical Science**, v. 14, n. 3, p. 701–706, 2018.

WANG, X.; XIA, J.; JIANG, C. Role of gut microbiota in the development of non-alcoholic fatty liver. **Liver Research**, v. 3, n. 1, p. 25–30, 2019.

WIGG, A. J. et al. The role of small intestinal bacterial overgrowth , intestinal permeability , endotoxaemia , and tumour necrosis factor in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. **Gut**, v. 48, n. 2, p. 206–211, 2001.

WIJARNPREECHA, K. et al. Obesity and Risk of Small Intestine Bacterial Overgrowth : A Systematic Review and Meta - Analysis. **Digestive Diseases and Sciences**, 2019.

WÓJCIK-CICHY, K.; KOŚLIŃSKA-BERKAN, E.; PIEKARSKA, A. The influence of NAFLD on the risk of atherosclerosis and cardiovascular diseases. **Clinical and Experimental Hepatology**, v. 4, n. 1, p. 1–6, 2018.

YAKOOB, J. et al. Small Intestinal Bacterial Overgrowth and Lactose Intolerance Contribute to Irritable Bowel Syndrome Symptomatology in Pakistan. **The Saudi Journal of Gastroenterology**, v. 17, n. 6, p. 371–375, 2011.

YANG, S. et al. Gut Microbiota-Dependent Marker TMAO in Promoting Cardiovascular Disease : Inflammation Mechanism , Clinical Prognostic , and Potential as a Therapeutic Target. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. 1360, p. 1–14, 2019.

YONEDA, M. et al. Serum Ferritin Is a Clinical Biomarker in Japanese Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) Independent of HFE Gene Mutation. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 55, n. 3, p. 808–814, 2010.

YOUNOSSI, Z. et al. Global burden of NAFLD and NASH: Trends, predictions, risk factors and prevention. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 15, n. 1, p. 11–20, 2018.

ZHANG, X. et al. New insight into inter-organ crosstalk contributing to the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Protein and Cell**, v. 9, n. 2, p. 164–177, 2018.

ZHOU, J. et al. Noninvasive evaluation of nonalcoholic fatty liver disease: Current evidence and practice. **World Journal of Gastroenterology**, v. 25, n. 11, p. 1307–1326, 2019.

ZHU, L. et al. Characterization of Gut Microbiomes in Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) Patients: A Connection Between Endogenous Alcohol and NASH. **Hepatology**, v. 57, p. 601–609, 2013.

APÊNDICES

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

INTERVENÇÃO COM PROBIÓTICOS NO TRATAMENTO DA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA: UM ESTUDO CLÍNICO, RANDOMIZADO, DUPLOCEGO E PLACEBO CONTROLADO

Pesquisadora: Marília Marques Pereira Lira

Orientador: José Luíz de Brito Alves / Coorientador: José Eymard Moraes de Medeiros Filho

Estamos convidando você para participar desta pesquisa que será realizada no Hospital Universitário Lauro Wanderley com pessoas adultas que tenham Esteatose Hepática.

O objetivo principal desse estudo é avaliar os batimentos do seu coração, alterações do fígado, níveis de glicose (açúcar), colesterol, triglicerídeos, inflamação no sangue e a flora intestinal antes e após o uso de Probióticos e Resveratrol.

Sabemos que as mudanças na flora intestinal podem acarretar alterações no fígado e coração e assim, acreditamos que o uso de Probióticos (como os lactobacilos, por exemplo) possa trazer benefícios para a sua saúde de pacientes com Esteatose Hepática.

Ao participar deste estudo, você permitirá que a pesquisadora analise os dados coletados por prontuário e consulta médica, realize o teste respiratório de Hidrogênio Exalado (exame para avaliar a flora intestinal), exame eletrocardiográfico (para avaliar os batimentos do seu coração) e realize coleta de sangue e fezes para exames laboratoriais. Esses exames poderão ocasionar algum desconforto pela necessidade de ficar em jejum e devido o tempo gasto para executá-los (exame eletrocardiográfico-15 minutos, teste respiratório – até 2 horas, coleta de sangue-15 minutos).

Os riscos que você corre durante a pesquisa são devidos à punção venosa para coleta de sangue, podendo ocorrer dor, inflamação da veia, extravasamento do sangue e ficar com a pele arroxeadada no local da punção, entretanto esses riscos serão pequenos porque serão realizados por técnico de enfermagem experiente. Os riscos envolvidos com o teste respiratório são relacionados a de ingestão da glicose que pode ocasionar gases, desconforto abdominal ou diarreia. Quaisquer destas complicações, ou outra que porventura surja, será responsabilidade do pesquisador e assistência médica prestada.

Entretanto, com esta pesquisa esperamos trazer benefícios para os pacientes com Esteatose Hepática e apresentar novas opções de tratamento que melhorem tanto o fígado quanto os riscos de doenças do coração. Você não terá nenhum tipo de despesa para participar deste estudo, bem como, nada será pago por sua participação, porém caso necessário, você receberá auxílio transporte e alimentação em qualquer umas das fases da pesquisa. Terá a liberdade de se recusar a participar ou continuar participando da pesquisa sem qualquer prejuízo pessoal. A participação nesta pesquisa não traz complicações legais.

Este estudo obedece aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos, conforme resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde, e não oferece riscos a sua dignidade. Todas as informações coletadas neste trabalho são confidenciais. Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa.

Eu _____ após entendimento dos riscos e benefícios desse estudo, aceito participar de forma livre desta pesquisa.

Consentimento Livre e Esclarecido

Assinatura do participante: _____

Impressão digital em caso de analfabetismo

Telefone: () _____

Endereço:

Qual melhor forma de entrar em contato? Identifique:

Assinatura da pesquisadora: _____

Em caso de dúvidas, entrar em contato com a pesquisadora ou comitê de ética:

- Marília Marques Pereira Lira Telefone: (83) 9.9321.6156

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley, setor ambulatorial da cirurgia bariátrica (térreo)

- Comitê de Ética do Hospital Universitário Lauro Wanderley -Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley-HULW – 2º andar. Cidade Universitária. Bairro: Castelo Branco – João Pessoa - PB. CEP: 58059-900. E-mail: comitedeetica@hulw.ufpb.br Campus I – Fone: 3216.7964

APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO – FICHA DE COLETA DE DADOS

1. DADOS PESSOAIS:

SEXO: FEMININO ()

MASCULINO ()

DATA DE NASCIMENTO:..... / IDADE (ANOS):.....

ESTADO CIVIL: SOLTEIRO () CASADO () OUTROS ()

ESCOLARIDADE:

ENSINO FUNDAMENTAL I: () COMPLETO () INCOMPLETO

ENSINO FUNDAMENTAL II: () COMPLETO () INCOMPLETO

ENSINO MÉDIO: () COMPLETO () INCOMPLETO

ENSINO SUPERIOR: () COMPLETO () INCOMPLETO

NÍVEL SÓCIO-ECONÔMICO - Quantidade de salários mínimos recebidos por mês pela família.....

2. ATIVIDADE FÍSICA (AF) () SIM () NÃO

Se sim;

Qual AF:.....

Quantos dias na semana e qual a duração:.....

3. ACOMPANHAMENTO NUTRICIONAL () SIM () NÃO

4. DOENÇAS PRÉVIAS E TEMPO DE DOENÇA

DIABETES () NÃO () SIM.....

PRÉ-DIABETES () NÃO () SIM

HIPERTENSÃO ARTERIAL () NÃO () SIM

DISLIPIDEMIA () NÃO () SIM

OUTRAS () NÃO () SIM

5. CITAR USO DE MEDICAÇÕES

6. EXAME FÍSICO:

PESO EM KG:

ALTURA EM CM:.....

IMC:

CIRCUNFERÊNCIA ABDOMINAL EM CM:

PRESSÃO ARTERIAL EM mmHg:

7. EXAMES LABORATORIAIS

COLESTEROL TOTAL EM MG/DL

HDL EM MG/DL

LDL EM MG/DL

TRIGLICERÍDEOS EM MG/DL.....

GLICEMIA DE JEJUM EM MG/DL

HEMOGLOBINA GLICADA (%)

URÉIA.....

CREATININA.....
 TGO.....
 TGP.....
 FOSFATASE ALCALINA.....
 GAMA-GT.....
 BILIRRUBINA TOTAL.....
 BILIRRUBINA DIRETA.....
 BILIRRUBINA INDIRETA.....
 FERRITINA.....
 ÍNDICE DE SATURAÇÃO DE TRANSFERRINA.....
 ALBUMINA EM MG/DL.....
 TSH.....
 T4 LIVRE.....
 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

8. TESTE RESPIRATÓRIO PARA SCBID

.....

.....

APÊNDICE C - ARTIGO

Association of worsening of nonalcoholic fatty liver disease with cardiometabolic function and intestinal bacterial overgrowth: a cross-sectional study

Abstract

Background & Aims: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) has been associated with small bowel bacterial overgrowth (SIBO) and cardiometabolic dysfunction. This cross-sectional study aimed to evaluate the cardio-metabolic parameters and SIBO in patients with different degrees of hepatic fibrosis estimated by NAFLD fibrosis score (NFS). **Methods:** Subjects (n=78) were allocated to three groups: Healthy control (n=30), NAFLD with low risk of advanced fibrosis (NAFLD-LRAF, n=17) and NAFLD with a high risk of advanced fibrosis (NAFLD-HRAF, n=31). Anthropometrics, blood pressure, electrocardiogram and heart rate variability (HRV) were evaluated. Only the NAFLD-LRAF and NAFLD-HRAF groups were submitted to blood biochemical analysis and glucose hydrogen breath tests. **Results:** The NAFLD-HRAF group had higher age and body mass index when compared to the control and NAFLD-LRAF groups. The prevalence of SIBO in the NAFLD group was 8.33%. The low frequency/high-frequency ratio (LF/HF ratio) was augmented in NAFLD-LRAF ($p < 0.05$) when compared with control group. NAFLD-HRAF group had a wide QRS complex ($p < 0.05$) and reduced LF/HF ratio ($p < 0.05$) compared to the control and NAFLD-LRAF groups. Serum levels of albumin and platelets were more reduced in the NAFLD-HRAF subjects ($p < 0.05$) than in the NAFLD-LRAF. **Conclusions:** NAFLD impairs cardiac autonomic function. Greater impairment was found in subjects with a worse degree of hepatic fibrosis estimated by NFS. Hypoalbuminemia and thrombocytopenia were higher in subjects with a worse degree of hepatic fibrosis, whereas prevalence of SIBO positive was similar between the groups.

Key words: Non-alcoholic fatty liver disease; autonomic function; cardio metabolic variables; small bowel bacterial overgrowth.

Introduction

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) represents a spectrum of liver diseases characterized mainly by macro-vesicular steatosis that occurs in the absence of alcoholic consumption. The hepatic histology of patients with NAFLD varies from isolated hepatic steatosis to fatty liver with hepatocellular damage, inflammation and tissue fibrosis [1].

The prevalence of NAFLD and non-alcoholic steatohepatitis (NASH) are on the increase [2]. The progression of liver diseases has been described as an important cause for the development of liver fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma [3,4], becoming the main indication for liver transplantation in the next two decades [5].

The pathophysiology of NAFLD is multifactorial and has been suggested to include an altered gut microbiota composition. Gut microbes are an endogenous source of ethanol, which may be delivered to the liver in a continuous fashion and promote steatosis and liver injury [6]. Some studies have reinforced the concept that small intestinal bacterial overgrowth (SIBO) plays an important role in the pathogenesis of NAFLD through endotoxin of bacteria and a tumor necrosis factor (TNF) as effective mediators [7,8].

NAFLD also exacerbates insulin resistance, dyslipidemia and causes the release of pro-inflammatory, profibrogenic and vasoactive mediators that can promote the development of cardiac complications, autonomic dysfunction as well as in the development and persistence of atrial fibrillation and other arrhythmias [9,10]. Furthermore, autonomic neuropathy can be associated with slowed motility, particularly in the stomach and proximal small intestine that promotes a propensity for small intestinal bacterial overgrowth (SIBO) which, in turn, can promote bacterial translocation and drive inflammation.

Heart rate variability (HRV) analysis is widely used to characterize the functions of the autonomic nervous system (ANS) [11] and has been proposed as a useful tool in identifying patients at risk for sudden cardiac death [10]. In fatty liver disease, cardiac and autonomic impairments appear to be dependent on the level of liver fat, metabolic dysfunction, inflammation and fibrosis staging, and, to a lesser extent, alcohol intake[12].

Despite previous studies showing that patients with NAFLD display impaired cardio-metabolic function and gut dysbiosis, it has not yet been demonstrated, to our understanding, whether the worsening of NAFLD accentuates cardio-metabolic dysfunction and gut dysbiosis. In this study, we evaluated the cardio-metabolic parameters and small intestinal bacterial overgrowth in patients with different degrees of

hepatic fibrosis estimated by a noninvasive biomarker panel. We hypothesized that cardiac autonomic dysfunction, metabolic impairment, and small intestinal bacterial overgrowth are more prevalent in patients with NAFLD with a high risk of advanced fibrosis.

Methods

Ethical aspects

This cross-sectional study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. The protocol of the original study entitled “Evaluation of effectiveness of intervention with probiotics in treatment of non-alcoholic fatty liver disease” was submitted and approved by the Research Ethics Committee of the Lauro Wanderley University Hospital, Federal University of Paraiba (Reference number 03871618.0.0000.5183) and all procedures were conducted in agreement with Resolution 466/2012 of the National Health Council and the International Declaration of Helsinki. All participants provided written informed consent.

Subjects

Thirty healthy subjects and 48 patients aged 18-75 years, both genders, with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (defined by imaging or histology, and lack of secondary causes of hepatic fat accumulation) and belonging to the Gastroenterology/Hepatology outpatient clinic of Lauro Wanderley University Hospital between April and November 2019 were included. All participants underwent assessment of their autonomic functions and anthropometry profile. Only patients with NAFLD underwent blood biochemistry and hydrogen breath tests.

Exclusion criteria consisted of a history consistent with pregnancy, cardiac transplant, presence of arrhythmias (e.g., ventricular atrial block, atrial fibrillation), cardiac pacemakers, ischemic and non-ischemic cardiomyopathy, important psychiatric diseases, active malignant neoplasms, evidence of other liver disease (autoimmune hepatitis, viral hepatitis, drug-induced liver injury, haemochromatosis, cholestatic liver disease or Wilson’s disease) and history of alcohol consumption.

The participants were divided into three groups: healthy control (n=30), NAFLD with low risk of advanced fibrosis (NAFLD-LRAF, n=17) and NAFLD with a high risk of advanced fibrosis (NAFLD-HRAF, n=31). The degree of hepatic fibrosis was estimated by NAFLD fibrosis score (NFS). Cutoff less than -1,455 was used to classify subjects as low risk of advanced fibrosis (AF); cutoff greater than -1,455 was used to classify subjects as high risk AF.

Clinical and anthropometric measurements

A questionnaire was administered to all participants in order to retrieve information regarding their age, sex, physical activity, nutritional counselling, previous

diseases, time of illness and use of medication. Body weight was measured to the nearest 0.1 kg using an electronic scale; Height was measured to the nearest 0.5 cm using a stadiometer (W200/50 A, Welmy). BMI (kg/m²) was calculated as the weight divided by the square of the height. Waist circumference (cm) was measured at the level of the mid-point between the inferior margin of the last rib and the iliac crest measured horizontally using a constant tension tape with the patient standing.

Blood sample and biochemical analyses

Fasting samples were analyzed for NAFLD-HRAF and NAFLD-LRAF. Blood samples were collected by a qualified nurse, from patients after a 12-hour fast, without strenuous exercise 24 hours before and without drinking alcohol 72 hours prior to collection. Plasma glucose, creatinine and triglycerides levels were determined by an automated enzymatic method; high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c) and total cholesterol, by direct colorimetric method; aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and gamma-glutamyl transferase (GGT) by colorimetric kinetic method; ferritin by the immunoturbidimetric assay; albumin by endpoint assay. Blood count and glycated hemoglobin tests were performed by the following methods, respectively: electronic determination in a Pentra 120 ABX device and high-performance liquid chromatography (HPLC).

Blood pressure, electrocardiogram recording and heart rate variability analysis

All subjects abstained from intense physical activity 24 hours prior to examination. In addition, patients abstained from caffeinated beverage consumption or any stimulant drink 36 hours prior to blood pressure (BP) and electrocardiogram (ECG) recording. No alcohol intake was permitted 72 hours prior to the observations. The BP was measured in seated subjects after 3 mins of rest, with a Welch Allyn sphygmomanometer with appropriate arm circumference cuff. Lastly, patients were asked to fast overnight for 12 hours before the ECG.

The recordings were performed in the morning (8 AM–11 AM) in a quiet room. After an initial stabilization period of 5 mins, subjects were instructed to remain silent, breathing normally at tidal volume, at rest and in the supine position. Following, ECG measurements were recorded for 10 mins. The ECG model 26T-LTS (ADInstruments®, Bella Vista, NSW, Australia) was used and recordings were made with the 5-electrode

configuration through LabChart® data acquisition software (ADInstruments®, Bella Vista, NSW, Australia).

ECG was set to a sampling rate of 1 kHz, range of 2 millivolts using a digital filter of 50 Hz (low pass). All data were exported and blindly analyzed by an independent trained researcher using LabChart 8 software. ECG recordings were processed by computer software (ECG analysis module for LabChart Pro; ADInstruments) for automatic detection of the R waves and beat-by-beat calculation of RR interval. For detection of ECG, 80 ms was used to determine typical QRS width and for R waves at least 300 ms apart.

For ECG analysis, 240 ms was used for the maximum PR and 240 ms for maximum RT. The heart rate (HR) and the following measures of HRV analysis were determined; 1) time-domain parameters: average R-R interval, standard deviation between the duration of RR intervals (SDRR), the square root of the mean of the sum of the squares of the successive differences between adjacent normal-to-normal beats (RMSSD), and the number of pairs of successive normal-to-normal beat intervals that differed by 50 ms (pRR50); 2) frequency-domain parameters: low frequency (LF) band (from 0.04 to 0.15 Hz) and high frequency (HF) band (from 0.15 to 0.40 Hz) and the LF/HF ratio, the power of each spectral component was calculated in normalized units (un); 3) Nonlinear parameters (SD1 and SD2). Poincaré scatters plots were constructed and investigated as a nonlinear tool, including the transverse axes (SD1, an indicator of parasympathetic activity) and the longitudinal axes (SD2 a function of sympathetic and vagal activity) [13].

Hydrogen breath test assessment

Subjects in NAFLD-LRAF and NAFLD-HRAF, after fasting for 8-12 hours, underwent a glucose hydrogen breath test (GHBT) shortly after the ECG recording. This breath testing had been preceded by recommendations that the patients avoid the use of antibiotics for 4 weeks and avoid promotility agents and laxatives for at least 1 week, and avoid fermentable foods (e.g., complex carbohydrates) for a day before the breath test. In addition, during the breath test, patients were asked to avoid smoking and minimize physical exertion[14]. Subjects exhaled twice into a standardized apparatus at baseline, the mean value was taken as the basal breath hydrogen. A standardized glucose solution (50g of glucose/200ml of water) was then ingested and a repeat of the breath samples were then collected every 30 minutes for 120 minutes, with attention paid to minimization

of variability. Breath samples were analyzed immediately for H₂ using a Gastrolyzer – Gastro + (Bedfont Scientific Ltd, Maidstone, UK). Breath tests were interpreted as positive for SIBO when fasting breath hydrogen concentration was ≥ 20 ppm or the hydrogen measured had a rise > 20 ppm above the baseline value[7].

Statistical analysis

Values are reported as mean (95% confidence interval) or % (n). AST, ALT, GGT and ferritin were log-transformed to normalize the data and presented as geometric means and confidence intervals. The variable age was analyzed using the one-way ANOVA test, then followed by the Tukey post-test. BP, biochemical parameters, ECG analysis and HRV measures were analyzed using one-way ANCOVA with correction for age and gender. Categorical data were analyzed by chi-square. The Pearson correlation coefficient (r) was used to explore the relationship between the clinical, anthropometric, NFS and laboratory variables obtained with the HRV parameters. The correlations obtained were classified as poor ($r \leq 0.20$), weak (0.21–0.40), moderate (0.41–0.60), good (0.61–0.80), and excellent (0.81–1.00). Statistical analyses were performed using SPSS 20.0 (IBM Corporation, Armonk, NY). Differences were considered significant when $p \leq 0.05$.

Results

General characteristics

Among the 78 study participants, the mean age was ($\pm$ SD) 41.03 ± 14.72 years; 52.56% were women. Anthropometrical and clinical characteristics of participants are presented in **Table 1**. The age, weight and BMI of participants in the NAFLD-HRAF group were significantly higher than in the other two groups. No differences were observed in the proportion of diabetes, dyslipidemia and hypertension, and drug treatment among the groups.

Clinical assessments

Table 2 shows the blood pressure, biochemistry and glucose hydrogen breath test data between groups. Systolic blood pressure was similar among the three groups, however, diastolic blood pressure was higher in the NAFLD - LRAF group when compared with the control group ($p=0.010$).

Platelet, GGT and albumin serum levels were significantly lower in the NAFLD – HRAF compared to NAFLD – LRAF group. No differences were found in leukocytes, lipid profile, fasting glucose, AST, ALT, ferritin, serum creatinine and SIBO prevalence (**Table 2**).

Assessment of ECG measures and heart rate variability

Electrocardiogram analysis and HRV in the time domain, frequency domain and nonlinear measurements are reported in **Table 3**. The ECG analyses revealed a wide QRS interval in patients with NAFLD when compared with the control group ($p=0.007$), despite values still less than 120ms. Heart rate, P duration, RR, PR, QTc and JT intervals were similar among all three groups (**Table 3**).

Analyzing HRV in the time domain, SDRR, RMSSD and pRR50 were similar among the groups (**Table 3**). In frequency domain, HF oscillations was higher in the NAFLD-HRAF than in the NAFLD-LRAF ($p = 0.048$) and the LF/HF ratio was lower in the NAFLD-HRAF than in subjects with NAFLD-LRAF ($p = 0.020$). Lastly, the non-linear measures SD1 and SD2 were similar among groups (**Table 3**).

We correlated clinical parameters, anthropometric measures, NFS, HR, BP and laboratory parameters with measurements of HRV in the time domain, frequency and nonlinear measurements (**Table 4**). Age and BMI of subjects correlated positively with NFS and SBP and negatively with SDRR, RMSSD, pRR50 and SD2 (**Table 4**). There

was a negative correlation between SBP and DBP SDRR, RMSSD, pRR50 and SD1, while HR did not correlate with HRV measures (**Table 4**). In the evaluation of the metabolic profile, triglycerides serum levels correlated positively with SBP and DBP, but did not correlate with any other parameter of HRV (**Table 4**). There was a negative correlation between fasting glucose and HbA1c with LF oscillation; and AST serum levels correlated negatively with SDRR, RMSSD and SD1 (**Table 4**).

Discussion

In the present study, we observed that patients with NAFLD presented impairment in cardiac autonomic function when compared to healthy subjects and the greater impairment was seen in patients with a higher risk of advanced fibrosis as estimated by NFS. Given the high prevalence of NAFLD and its correlation with an increased risk of cardiovascular disease [15,16], an early cardiometabolic screen may be useful for prognostic and prevention of cardiometabolic complications for these patients.

Autonomic dysfunction has been related in NAFLD patients [17,18]. Here, we found that subjects with NAFLD and high risk of advanced fibrosis had a lower LF/HF ratio than NAFLD patients with low risk of advanced fibrosis. These findings suggest that the worsening of the NAFLD could accentuate the cardiac autonomic dysfunction of these patients.

Similarly, a recent study demonstrated that a fibrosis staging may also be an important key for estimating the degree of cardiac and autonomic dysfunction in NAFLD patients [12]. Other studies found the stage of liver fibrosis and steatosis in NAFLD to be related to the incidence of cardiovascular diseases [19], but there are few reports regarding the influence of the degree of fibrosis in autonomic functions based on HRV parameters.

In the time domain, SDRR, RMSSD and pRR50 indices; and non-linear parameters (SD1 and SD2) were similar among groups. However, an earlier study found a low HRV in the time domain in subjects with NAFLD and diabetes [20]. This suggests that the occurrence of diabetes in NAFLD subjects worsens autonomic dysfunction. An early study demonstrated that SD2 less than 25.5 ms and SDRR less than 20.4 ms may be used as significant predictors of mortality in cirrhotic patients [21]. Using these cutoffs, we can suggest that patients recruited in this cross-sectional study exhibited low risk of mortality.

Besides autonomic dysfunction and structural cardiac abnormalities, NAFLD is also associated with electrophysiological disorders of the heart [9,22]. QTc and QRS prolongation has been reported in patients with NAFLD [23,24]. The prolongation of these intervals is known to be arrhythmogenic and a predictor of cardiac mortality [25,26]. In our sample, we noticed higher significant values of QRS interval between individuals with steatosis when compared to the control group, despite values less than 120ms.

Low-grade systemic inflammation plays an important role in the impairment of cardiac function [27,28] and contributes to the progression of NASH [18]. The underlying

mechanisms include expanded adipose tissue commonly observed in abdominal obesity and type 2 diabetes, lipotoxicity, oxidative stress and altered gut microbiota influenced by genetic and epigenetic variations [9].

Cardiovascular risk factors, such as obesity and diabetes, are associated with autonomic dysfunction and worsen the HRV parameters in NAFLD subjects [20,29]. In addition, other factors, such as gender and age, can influence on HRV [30]. Here, we found that age was positively correlated with SBP and negatively correlated with measures of SDRR, RMSSD, pRR50, LF and SD2. Thus, the results were corrected by the age and gender.

Glucose and Lipid dysmetabolism have been associated with impaired HRV and cardiac autonomic dysfunction in obese and NAFLD subjects [13,20]. However, in the present study, the glucose and lipid serum levels did not correlate expressively with worsening of HRV indices; AST serum levels, however, were negatively correlated with SDRR, RMSSD and SD1. This reveals that HRV indices may be influenced by the various clinical and metabolic conditions.

It has been suggested that patients with NAFLD have an increased gut permeability or gut dysbiosis, which may lead to enhanced leakage of endotoxins (especially, lipopolysaccharide - LPS) from the gut, increased production of proinflammatory cytokines and autonomic disturbance [31-33].

Small intestinal bacterial overgrowth (SIBO) is characterized by an excessive number of bacteria in jejunal contents and a significant association with NAFLD has been reported [34,35]. A greater prevalence of SIBO in NAFLD patients has been reported by many authors [7,33]. In the present study, only four (8.33%) NAFLD subjects were SIBO positive and SIBO prevalence was similar between NAFLD-LRAF and NAFLD-HRAF subjects. Although the prevalence observed it was higher to that reported in another Brazilian study [36], it is notably lower than seem in studies conducted in other countries. For example, 39% SIBO positive was found in NAFLD patients from Iran, 60% SIBO positive was found in Italy and 31.3% SIBO positive was found in Indonesia [7,33].

In most cases of NAFLD, except in patients with associated cirrhosis, liver function markers are normal. Ferritin levels are elevated in more than 20% of these patients [37]. Liver enzyme levels are within the normal range in approximately two-thirds of NAFLD patients [38]. In addition, there is a close association between NAFLD and metabolic risk factors, particularly dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus [39]. In present study, although platelets count, albumin and GGT concentrations were reduced

in NAFLD-HRAF than NAFLD-LRAF subjects, glyco-lipid and hepatic enzymes were similar between groups. Despite this, a negative correlation was found between AST and glycemic variables and HRV indices, demonstrating the importance of the biochemical measurement for evaluate the possibility of cardiovascular complications in NAFLD subjects.

Potential limitations

Our study was conducted with a specific population and generalizability or transportability might not apply. We have used abdominal imaging as a diagnostic method for NAFLD, and NFS as a predictor of fibrosis, because liver biopsies were not available for this study. In addition, we did not use gut aspiration techniques to assess gut dysbiosis, although this is considered the gold standard.

Conclusion

NAFLD impairs cardiac autonomic function and may cause greater impairment in the sympathovagal balance as noted in individuals with a worse degree of hepatic fibrosis estimated by NFS. The presence of SIBO was not associated to the degree of NAFLD in the same way as biochemical metabolic parameters were.

Table 1. Anthropometrical and clinical characteristics of the study population.

VARIABLES	Control (n=30)	NAFLD- LRAF (n=17)	NAFLD - HRAF (n=31)	p-value
Age (years)	27.2 (25.1 – 29.2)	43.1 (38.3 – 47.9) [†]	53.3 (49.1 – 57.5) ^{*#}	<0.001
Weight (kg)	64.9 (61.3 – 68.6)	82.4 (74.3 – 90.5) [†]	93.7 (81.7 – 105.6) [*]	<0.001
BMI (kg/m ²)	23.1 (21.8 – 24.4)	29.3 (26.7 – 31.9) [†]	35.2 (31.4 – 39.0) ^{*#}	<0.001
Waist circumference (cm)	-	103.1 ± 11.4	112.2 ± 18.8	0.076
Gender (M/F)	15/15	9/8	13/18	0.930
Diabetes - % (n)	-	17.6 (3)	25.8 (8)	0.476
Dyslipidemia - % (n)	-	29.4 (5)	38.7 (12)	0.753
Hypertension - % (n)	-	41.1 (7)	51.6 (16)	0.555
Physical activity - % (n)	-	23.5 (4)	54.8 (17)	0.066
Nutritional counseling - % (n)	-	11.8 (2)	35.5 (11)	0.099
Medications				
Antiglycemics				
Biguanides - % (n)	-	17.6 (3)	19.4 (6)	1.000
SGLT-2 inhibitors - % (n)	-	5.88 (1)	6.45 (2)	1.000
Thiazolidinediones - % (n)	-	0 (0)	0 (0)	-
DPP-4 inhibitors	-	0 (0)	0 (0)	-
GLP-1 analogs	-	0 (0)	0 (0)	-
Insulin	-	5.88 (1)	9.68 (3)	1.000
Thiazolidinediones - % (n)	-	0 (0)	0 (0)	-
Antihypertensives				
ARBII - % (n)	-	41.2 (7)	22.6 (7)	0.200
ACE I inhibitors - % (n)	-	-	19.4 (6)	0.076
βBlocker - % (n)	-	11.8 (2)	16.1 (5)	1.000
Calcium blockers - % (n)	-	17.6 (3)	9.68 (3)	0.651
Diuretics - % (n)	-	11.8 (2)	16.1 (5)	1.000
Lipid Lowering				
Statin - % (n)	-	5.88 (1)	29.0 (9)	0.074
Fibrate - % (n)	-	5.88 (1)	0 (0)	-

Data are expressed as mean (95% confidence interval) or % (n).

**P*<0.05 NAFLD - HRAF versus Control group; #*P*<0.05 NAFLD - LRAF versus NAFLD - HRAF group; [†]*P*<0.05 NAFLD - LRAF versus Control group

Table 2. Blood pressure and laboratorial characteristics between groups.

VARIABLES	Control (n=30)	NAFLD- LRAF (n=17)	NAFLD - HRAF (n=31)	p-value
SBP (mmHg)	114 (107 – 121)	124 (117 – 130)	125 (119 – 132)	0.110
DBP (mmHg)	69 (64 – 74)	80 (75– 84) [†]	74 (69 – 79)	0.010
Hemoglobin (g/dl)	-	14.0 (13.4 – 14.7)	14.0 (13.5 – 14.5)	0.924
Leukocytes (10 ⁹ /L)	-	6.47 (5.65 – 7.28)	6.54 (5.91 – 7.16)	0.901
Platelet (10 ⁹ /L)	-	307.6 (273.2 – 342.1)	232.3 (206.1 – 258.3)	0.002
Total cholesterol (mg/dL)	-	200.1 (177.4 – 222.7)	179.9 (163.3 – 196.5)	0.174
HDL-cholesterol (mg/dL)	-	45.4 (38.9 – 52.0)	40.3 (35.5 – 45.2)	0.233
LDL-cholesterol (mg/dL)	-	131.1 (111.4 – 150.9)	126.0 (111.6 – 140.5)	0.688
Triglycerides (mg/dL)	-	165.7 (105.6 – 225.9)	162.6 (118.5 – 206.6)	0.935
Fasting glucose (mg/dL)	-	101.4 (78.9 – 123.9)	101.3 (84.8 – 117.8)	0.991
HbA1c (%)	-	6.38 (5.67 – 7.09)	6.35 (5.79 – 6.90)	0.944
AST (IU/L)*	-	21.3 (15.6 – 28.8)	21.7 (17.3 – 27.1)	0.922
ALT (IU/L) *	-	22.4 (15.3 – 33.1)	18.9 (14.3 – 25.0)	0.486
GGT (IU/L) *	-	69.3 (47.4 – 102.4)	40.4 (30.6 – 53.5)	0.034
Albumin (g/dL)	-	4.32 (4.15 – 4.50)	4.06 (3.94 – 4.19)	0.026
Ferritin (ng/ml)*	-	115.5 (70.1 – 192.4)	134.2 (92.7 – 196.2)	0.644
Serum creatinine (mg/dL)	-	1.13 (0.75 – 1.51)	0.84 (0.56 – 1.13)	0.247
SIBO on GHBT - % (n)	-	11.8 (2)	6.45 (2)	0.607
NFS	-	-2.32 (-3.27 - -1.44)	0.54 (-0.12 – 1.21)	<0.001

Data are expressed as mean (95% confidence interval). One-way ANCOVA adjusted for age and gender.

* Geometric mean

[†]P<0.05 NAFLD - LRAF versus Control group

Table 3. Comparison of ECG analysis and heart rate variability measures between the three groups studied.

VARIABLES	Control (n=30)	NAFLD- LRAF (n=17)	NAFLD - HRAF (n=31)	p-value
<u>ECG analysis</u>				
HR (bpm)	68.9 (64.8 - 73.1)	69.9 (65.5 - 73.3)	68.5 (64.7 - 72.4)	0.945
RR interval (ms)	886 (830 - 943)	874 (820 - 928)	896 (843 - 949)	0.836
PR interval (ms)	158 (144 - 172)	157 (144 - 171)	164 (151 - 178)	0.751
P duration (ms)	86 (70 - 102)	85 (70 - 100)	92 (78 - 107)	0.753
QRS interval (ms)	64 (51 - 77)	92 (79 - 104) [†]	96 (84 - 109)*	0.007
QTc interval (ms)	374 (355 - 392)	384 (367 - 402)	375 (357 - 392)	0.600
JT interval (ms)	281 (258 - 303)	268 (247 - 290)	261 (240 - 282)	0.583
<u>HRV analysis</u>				
SDRR (ms)	51.6 (41.4 - 61.9)	44.3 (34.5 - 54.1)	46.9 (37.2 - 56.5)	0.605
RMSSD (ms)	54.9 (41.9 - 67.8)	40.3 (29.1 - 51.6)	41.6 (30.3 - 52.8)	0.265
PRR50 (ms)	26.8 (17.6 - 36.0)	17.8 (9.7 - 25.8)	20.8 (12.8 - 28.8)	0.358
LF (nu)	41.1 (32.7 - 49.3)	50.9 (42.9 - 58.9)	39.6 (31.5 - 47.8)	0.070
HF (nu)	54.0 (47.2 - 60.8)	46.9 (40.4 - 53.4)	57.5 (50.8 - 64.2) [#]	0.048
LF/HF	0.83 (0.48 - 1.18)	1.39 (1.06 - 1.73) [†]	0.86 (0.52 - 1.20) [#]	0.020
SD1 (ms)	35.3 (26.8 - 43.8)	28.9 (20.8 - 37.0)	30.2 (22.3 - 38.2)	0.579
SD2 (ms)	62.5 (49.6 - 75.5)	54.7 (42.3 - 67.0)	57.9 (45.7 - 70.0)	0.690

Data are expressed as mean (95% confidence interval). Control: health patients without diagnosis of NAFLD; NAFLD-LRAF: patients with NAFLD diagnosis and low risk of advanced fibrosis; NAFLD-HRAF: patients with NAFLD diagnosis and high risk of advanced fibrosis.

NAFLD: nonalcoholic fatty liver disease; HR: heart rate; SDRR: standard deviation of RR; RMSSD: square root of the mean squared differences of successive RR intervals; pRR50: number of pairs of successive normal-to-normal beat intervals that differed by 50 ms; LF nu: normalized unit in the low frequency band; HF nu: normalized unit in the high frequency band; SD: standard deviation of instantaneous RR interval variability.

* $P < 0.05$ NAFLD - HRAF versus Control group; # $P < 0.05$ NAFLD - LRAF versus NAFLD - HRAF group; [†] $P < 0.05$ NAFLD - LRAF versus Control group. One-way ANCOVA adjusted for age and gender.

Table 4. Linear correlation coefficients between heart rate variability measures and clinical, anthropometric, body composition and laboratory variables.

	NFS	SBP	DBP	HR	SDRR	RMSSD	pRR50	LF	HF	LF/HF	SD1	SD2
Age (years)	0.43*	0.41*	0.14	-0.17	-0.46*	-0.29*	-0.39*	-0.31*	0.13	-0.11	-0.21	-0.51*
BMI (kg/m ²)	0.34*	0.32*	-0.10	0.08	-0.15	-0.23*	-0.21	-0.02	-0.02	0.08	-0.15	-0.13
SBP (mmHg)	0.13	--	0.66*	-0.12	-0.21	-0.16	-0.23*	-0.21	0.10	-0.13	-0.16	-0.22
DBP (mmHg)	-0.16	0.66*	--	-0.06	-0.27*	-0.28*	-0.27	0.03	-0.08	0.03	-0.30*	-0.20
HR (bpm)	0.07	-0.12	-0.06	--	-0.13	-0.18	-0.14	0.01	0.05	0.05	-0.18	-0.08
Hemoglobin (g/dl)	0.03	-0.04	0.37	-0.01	-0.12	-0.24	-0.16	0.12	-0.14	0.12	-0.25	-0.07
Leukocytes (10 ⁹ /L)	-0.02	0.15	-0.12	0.07	0.20	0.14	0.16	-0.19	0.14	-0.10	0.09	0.23
Platelet (10 ⁹ /L)	-0.41*	-0.12	-0.26	0.12	0.12	0.14	0.12	0.05	-0.02	0.10	0.08	0.09
LDL-cholesterol (mg/dL)	-0.10	0.07	-0.10	0.25	0.08	0.09	0.11	-0.11	0.06	-0.06	0.04	0.03
HDL-cholesterol (mg/dL)	-0.20	0.10	-0.28*	0.16	-0.06	0.07	-0.09	-0.02	0.03	0.04	0.12	-0.16
Triglycerides (mg/dL)	-0.04	0.25*	0.35*	-0.07	0.09	0.05	0.10	-0.28	0.26	-0.25	-0.00	0.10
Fasting glucose (mg/dL)	0.20	0.26	0.14	-0.06	-0.25	-0.16	-0.22	-0.29*	0.12	-0.22	-0.13	-0.22
HbA1c (%)	0.14	0.27*	0.08	-0.01	-0.22	-0.17	-0.21	-0.31*	0.16	-0.25	-0.12	-0.19
AST (IU/L)	0.06	-0.02	0.20	0.09	-0.33*	-0.30*	-0.22	-0.02	-0.02	0.06	-0.30*	-0.27
ALT (IU/L)	-0.55*	0.02	0.16	0.11	-0.13	-0.20	-0.20	0.16	-0.20	0.22	-0.13	-0.08
GGT (IU/L)	-0.26	0.23	0.21	-0.00	0.01	0.11	-0.01	-0.24	0.09	-0.09	0.09	-0.02
Albumin (g/dL)	-0.26*	0.11	0.32*	0.22	-0.07	-0.08	-0.05	0.12	-0.15	0.21	-0.04	-0.07
Ferritin (ng/ml)	-0.13	0.16	0.26	0.06	0.07	0.08	0.02	-0.11	0.14	-0.15	0.06	0.11
NFS	--	0.13	-0.16	0.07	-0.06	-0.05	-0.00	-0.29*	0.27	-0.30*	-0.04	-0.04

Note: *p<0.05, Pearson correlation coefficient (R).

Abbreviations: AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; BMI, body mass index; LDL-cholesterol, low density lipoprotein cholesterol; GGT, and gamma-glutamyl transferase; HDL-cholesterol, high density lipoprotein cholesterol; HbA1c, glycated hemoglobin; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; HR (bpm), heart rate; NFS, non-alcoholic fatty liver disease score; SDRR (ms), standard deviation of RR; RMSSD (ms), square root of the mean squared differences of successive RR interval; pRR50 (ms), number of pairs of successive normal-to-normal beat intervals that differed by 50 ms; LF nu, normalized unit in the low frequency band; HF nu, normalized unit in the high frequency band; SD1/SD2- SD, standard deviation of instantaneous RR interval variability.

References

1. El-Zayadi AR (2008) Hepatic steatosis: a benign disease or a silent killer. *World J Gastroenterol* 14: 4120-4126.
2. Al-Muzafar HM, Amin KA (2017) Probiotic mixture improves fatty liver disease by virtue of its action on lipid profiles, leptin, and inflammatory biomarkers. *BMC Complement Altern Med* 17: 43.
3. Byrne CD, Targher G (2015) NAFLD: a multisystem disease. *J Hepatol* 62: S47-64.
4. Estes C, Anstee QM, Arias-Loste MT, Bantel H, Bellentani S, et al. (2018) Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016-2030. *J Hepatol* 69: 896-904.
5. Sayiner M, Koenig A, Henry L, Younossi ZM (2016) Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis in the United States and the Rest of the World. *Clin Liver Dis* 20: 205-214.
6. Raman M, Ahmed I, Gillevet PM, Probert CS, Ratcliffe NM, et al. (2013) Fecal microbiome and volatile organic compound metabolome in obese humans with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 11: 868-875 e861-863.
7. Rafiei R, Bemanian M, Rafiei F, Bahrami M, Fooladi L, et al. (2018) Liver disease symptoms in non-alcoholic fatty liver disease and small intestinal bacterial overgrowth. *Rom J Intern Med* 56: 85-89.
8. Paolella G, Mandato C, Pierri L, Poeta M, Di Stasi M, et al. (2014) Gut-liver axis and probiotics: their role in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 20: 15518-15531.
9. Anstee QM, Mantovani A, Tilg H, Targher G (2018) Risk of cardiomyopathy and cardiac arrhythmias in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 15: 425-439.
10. Ballestri S, Lonardo A, Bonapace S, Byrne CD, Loria P, et al. (2014) Risk of cardiovascular, cardiac and arrhythmic complications in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 20: 1724-1745.
11. Sassi R, Cerutti S, Lombardi F, Malik M, Huikuri HV, et al. (2015) Advances in heart rate variability signal analysis: joint position statement by the e-Cardiology ESC Working Group and the European Heart Rhythm Association co-endorsed by the Asia Pacific Heart Rhythm Society. *Europace* 17: 1341-1353.
12. Houghton D, Zalewski P, Hallsworth K, Cassidy S, Thoma C, et al. (2019) The degree of hepatic steatosis associates with impaired cardiac and autonomic function. *J Hepatol* 70: 1203-1213.
13. Carvalho NNC, de Oliveira Junior FA, da Silva G, Baccin Martins VJ, Braga VA, et al. (2019) Impact of arterial hypertension and type 2 diabetes on cardiac autonomic modulation in obese individuals with recommendation for bariatric surgery. *Diabetes Metab Syndr Obes* 12: 1503-1511.
14. Pimentel M, Saad RJ, Long MD, Rao SSC (2020) ACG Clinical Guideline: Small Intestinal Bacterial Overgrowth. *Am J Gastroenterol* 115: 165-178.
15. Anstee QM, Targher G, Day CP (2013) Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10: 330-344.
16. Motamed N, Rabiee B, Poustchi H, Dehestani B, Hemasi GR, et al. (2017) Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and 10-year risk of cardiovascular diseases. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 41: 31-38.
17. Sun W, Zhang D, Sun J, Xu B, Sun K, et al. (2015) Association between non-alcoholic fatty liver disease and autonomic dysfunction in a Chinese population. *QJM* 108: 617-624.
18. Sabath E, Baez-Ruiz A, Buijs RM (2015) Non-alcoholic fatty liver disease as a consequence of autonomic imbalance and circadian desynchronization. *Obes Rev* 16: 871-882.
19. Wojcik-Cichy K, Koslinska-Berkan E, Piekarska A (2018) The influence of NAFLD on the risk of atherosclerosis and cardiovascular diseases. *Clin Exp Hepatol* 4: 1-6.

20. Kumar MS, Singh A, Jaryal AK, Ranjan P, Deepak KK, et al. (2016) Cardiovascular Autonomic Dysfunction in Patients of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Hepatol* 2016: 5160754.
21. Bhogal AS, De Rui M, Pavanello D, El-Azizi I, Rowshan S, et al. (2019) Which heart rate variability index is an independent predictor of mortality in cirrhosis? *Dig Liver Dis* 51: 695-702.
22. Ziegler D, Strom A, Kupriyanova Y, Bierwagen A, Bonhof GJ, et al. (2018) Association of Lower Cardiovagal Tone and Baroreflex Sensitivity With Higher Liver Fat Content Early in Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 103: 1130-1138.
23. Mantovani A, Rigolon R, Pichiri I, Bonapace S, Morani G, et al. (2017) Nonalcoholic fatty liver disease is associated with an increased risk of heart block in hospitalized patients with type 2 diabetes mellitus. *PLoS One* 12: e0185459.
24. Targher G, Valbusa F, Bonapace S, Bertolini L, Zenari L, et al. (2014) Association of nonalcoholic fatty liver disease with QTc interval in patients with type 2 diabetes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 24: 663-669.
25. Dhar R, Alsheikh-Ali AA, Estes NA, 3rd, Moss AJ, Zareba W, et al. (2008) Association of prolonged QRS duration with ventricular tachyarrhythmias and sudden cardiac death in the Multicenter Automatic Defibrillator Implantation Trial II (MADIT-II). *Heart Rhythm* 5: 807-813.
26. Gibbs C, Thalamus J, Kristoffersen DT, Svendsen MV, Holla OL, et al. (2019) QT prolongation predicts short-term mortality independent of comorbidity. *Europace* 21: 1254-1260.
27. Patil R, Sood GK (2017) Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk. *World J Gastrointest Pathophysiol* 8: 51-58.
28. VanWagner LB, Wilcox JE, Colangelo LA, Lloyd-Jones DM, Carr JJ, et al. (2015) Association of nonalcoholic fatty liver disease with subclinical myocardial remodeling and dysfunction: A population-based study. *Hepatology* 62: 773-783.
29. Pimenta NM, Santa-Clara H, Cortez-Pinto H, Silva-Nunes J, da Lapa Rosado M, et al. (2014) Body composition and body fat distribution are related to cardiac autonomic control in non-alcoholic fatty liver disease patients. *Eur J Clin Nutr* 68: 241-246.
30. Shaffer F, Ginsberg JP (2017) An Overview of Heart Rate Variability Metrics and Norms. *Front Public Health* 5: 258.
31. Aron-Wisnewsky J, Vigliotti C, Witjes J, Le P, Holleboom AG, et al. (2020) Gut microbiota and human NAFLD: disentangling microbial signatures from metabolic disorders. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*.
32. Tang WH, Kitai T, Hazen SL (2017) Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease. *Circ Res* 120: 1183-1196.
33. Miele L, Valenza V, La Torre G, Montalto M, Cammarota G, et al. (2009) Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 49: 1877-1887.
34. Shah A, Shanahan E, Macdonald GA, Fletcher L, Ghasemi P, et al. (2017) Systematic Review and Meta-Analysis: Prevalence of Small Intestinal Bacterial Overgrowth in Chronic Liver Disease. *Semin Liver Dis* 37: 388-400.
35. Wijarnpreecha K, Lou S, Watthanasuntorn K, Kroner PT, Cheungpasitporn W, et al. (2019) Small intestinal bacterial overgrowth and nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*.
36. Ferolla SM, Couto CA, Costa-Silva L, Armiliato GN, Pereira CA, et al. (2016) Beneficial Effect of Synbiotic Supplementation on Hepatic Steatosis and Anthropometric Parameters, But Not on Gut Permeability in a Population with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Nutrients* 8.
37. Kupcova V, Fedelesova M, Bulas J, Kozmonova P, Turecky L (2019) Overview of the Pathogenesis, Genetic, and Non-Invasive Clinical, Biochemical, and Scoring Methods in the Assessment of NAFLD. *Int J Environ Res Public Health* 16.
38. Mikolasevic I, Lukenda Zanko V, Jakopcic I, Domislovic V, Mijic A, et al. (2020) Prospective evaluation of non-alcoholic fatty liver disease by elastographic methods of liver steatosis

- and fibrosis; controlled attenuation parameter and liver stiffness measurements. *J Diabetes Complications* 34: 107512.
39. Gaggini M, Morelli M, Buzzigoli E, DeFronzo RA, Bugianesi E, et al. (2013) Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its connection with insulin resistance, dyslipidemia, atherosclerosis and coronary heart disease. *Nutrients* 5: 1544-1560.

ANEXOS



UFPB - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO LAURO
WANDERLEY DA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DE EFICÁCIA DA INTERVENÇÃO COM PROBIÓTICOS NO TRATAMENTO DA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA

Pesquisador: MARILIA MARQUES PEREIRA LIRA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 03871618.0.0000.5183

Instituição Proponente: Hospital Universitário Lauro Wanderley

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.149.662

Apresentação do Projeto:

Trata-se da apresentação da versão_2 do projeto de pesquisa, com respostas às pendências apresentadas no parecer nº 3.069.666 emitido anteriormente pelo CEP/HULW. O projeto de pesquisa apresentado é de Mestrado vinculado ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba da aluna Marília Lira, sob orientação do Prof. Dr. José Luiz de Brito Alves e co-orientação do Prof. Dr. José Eymard Moraes de Medeiros Filho.

Trata-se de um ensaio clínico que tem por objetivo avaliar a influência do uso de probióticos sobre os perfis hepático e cardiometabólico em pacientes portadores de doença hepática gordurosa não alcoólica. Para avaliar tais efeitos, será realizado um ensaio clínico duplo cego randomizado e placebo controlado com indivíduos portadores da doença hepática gordurosa não alcoólica e acompanhados nos ambulatórios de Gastroenterologia e Hepatologia do Hospital Universitário Lauro Wanderley, João Pessoa-PB, no período de março a agosto de 2019. Uma amostra de 80 indivíduos, sendo 40 homens e 40 mulheres serão randomizados igualmente em grupos experimental e controle, e submetidos à análises de perfil lipídico, hepático, marcadores de atividade inflamatória e estresse oxidativo, variabilidade da frequência cardíaca e disbiose antes e após intervenção com combinado de cepas probióticas. Com esse trabalho pretende-se demonstrar novas evidências científicas para o controle da disbiose e dos riscos cardiometabólicos associados à doença hepática gordurosa não alcoólica. A hipótese levantada é de que a

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 58.059-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7964

Fax: (83)3216-7522

E-mail: comitedeetica.hulw2018@gmail.com



UFPB - HOSPITAL UNIVERSITÁRIO LAURO WANDERLEY DA



Continuação do Parecer: 3.149.662

intervenção com probióticos representa uma terapêutica adjuvante eficaz na redução da disbiose intestinal e na melhoria das disfunções metabólicas, hepáticas e autonômicas relatadas em pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica.

Em relação à amostra será não probabilística (por conveniência) e foi calculada pelo programa OpenEpi com nível de significância de 95%, poder beta de 80%, razão de expostos/não expostos 1:1, OR 8,0, resultando no número de 80 indivíduos. Os selecionados para a pesquisa serão randomizados para 20Bi® (40) ou placebo (40) na proporção de 1:1.

A autora relata como critérios de inclusão: indivíduos maiores de 18 e menores de 65 anos de ambos os sexos, portadores de Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica diagnosticados por exames de imagem ou biópsia hepática, na ausência de causas secundárias de infiltração gordurosa hepática, portadores de síndrome metabólica caracterizados pela presença de pelo menos três dos seguintes critérios: obesidade central, hipertensão arterial sistêmica, glicemia de jejum alterada ou diabetes melito diagnosticado, triglicerídeos sérico elevado e HDL colesterol baixo.

Quanto aos critérios de exclusão: indivíduos menores de 18 anos ou maiores de 65 anos, portadores de Doença Hepática de outras etiologias tais como: hepatites virais crônicas (Vírus da hepatite B, D ou C), hepatite auto-imune, portadores de Hemocromatose, doença de Wilson ou deficiência de Alfa1-antitripsina, portadores de Doença Hepática Gordurosa secundária ao consumo significativo de álcool ou uso prolongado de medicação esteatogênica, gestantes e lactantes, transplantes cardíacos, presença de arritmias e marcapassos, medicações que possam interferir na VFC, como betabloqueadores ou outros antiarrítmicos a critério do pesquisador.

Quanto ao procedimento de coleta, o estudo acontecerá em duas etapas (pré e pós intervenção). Na primeira etapa, serão realizados três encontros. Encontro 1 de recrutamento dos pacientes que buscam o serviço por livre demanda e orientações acerca dos procedimentos de coleta dos dados. Encontro 2 será realizada coleta dados da história clínica, dados antropométricos, amostra de sangue em veia periférica para análise bioquímica, coleta de fezes para análise microbiológica fecal e o teste respiratório de hidrogênio exalado para pesquisa de Supercrescimento Bacteriano de Intestino Delgado. Encontro 3 realização do eletrocardiograma para avaliação da variabilidade da frequência cardíaca. Após o término das avaliações iniciais, os participantes receberão gratuitamente as cápsulas de 20Bi® ou cápsulas de placebo (maltodextrina 12g) e serão orientados a ingerir 1x ao dia no horário de uma refeição durante o período de 90 dias. Os pacientes também serão orientados a continuar com seus hábitos de medicações, estilo de vida e dieta durante o curto período da intervenção.

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 58.059-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7964

Fax: (83)3216-7522

E-mail: comitedeetica.hulw2018@gmail.com



Continuação do Parecer: 3.149.662

Na segunda etapa deste estudo, noventa dias após a intervenção, o participante será reavaliado em dois momentos. No primeiro o paciente será novamente avaliado quanto a medidas antropométricas, coleta de sangue, fezes e teste respiratório de hidrogênio exalado e; no segundo momento irá se submeter novamente ao eletrocardiograma para avaliação da VFC conforme relatado anteriormente.

Em relação ao método de análise, os dados de homogeneidade serão checados pelo teste de Bartlett's. A comparação entre os dados do grupo placebo e do grupo intervenção será realizada pelo teste "t" de Student não pareado. Para as análises antes e após intervenção será utilizado o teste de análise de variância two-way (ANOVA) e o pós-teste de Bonferroni. O nível de significância será considerado quando $p < 0.05$. Os dados serão expressos como média $\pm$ epm (erro padrão da média) e análise estatística realizadas no GraphPad Prism5.0 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a influência do uso de probióticos sobre os perfis hepático e cardiometabólico em pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica bem como a análise da disbiose intestinal, marcadores de atividade inflamatória, estresse oxidativo e modificações na composição da microbiota fecal.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Quanto aos inconvenientes e riscos previsíveis relata-se que em relação à coleta de sangue são esperados a necessidade do jejum de 12 horas e o desconforto gerado pela própria punção venosa, como dor local, equimoses, flebites e extravasamento de sangue, respectivamente. A autora refere que esses riscos previsíveis são minimizados com medidas como: 1- técnico de enfermagem bem treinado com ampla experiência em punção venosa, 2- escolha adequada da veia para punção (veia visível, relativamente reta e que não tenha sido realizada punção recentemente, 3 – assepsia prévia, 4- observação após punção, 4- orientação de entrar em contato com o pesquisador, caso ocorra alguma complicação, 5- uso de compressas, como a quente em caso de flebite. Os possíveis efeitos colaterais do teste respiratório do hidrogênio expirado são exatamente os mesmos que se poderia esperar em indivíduos que digerem e absorvem pouco os açúcares e carboidratos, como por exemplo, discreto estufamento ou distensão abdominal, dor local ou diarreia. Os participantes serão orientados a entrar em contato com o pesquisador, caso ocorra algum desses eventos.

Quanto aos benefícios relata-se que esse trabalho pretende demonstrar novas evidências científicas para o controle dos riscos cardiometabólicos associados à Doença Hepática Gordurosa

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 58.059-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7964

Fax: (83)3216-7522

E-mail: comitedeetica.hulw2018@gmail.com



Continuação do Parecer: 3.149.662

Não Alcoólica a partir da suplementação de Probióticos tendo em vista a escassez de dados frente à este tipo de suplementação na população em estudo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto de pesquisa apresenta relevância e traz importantes contribuições para a ciência e para a sociedade, apresentando adequação dos aspectos éticos.

Quanto aos aspectos metodológicos, os objetivos do estudo estão descritos de forma clara, assim como os instrumento de coleta específicos que serão utilizados.

Em relação à população do estudo, o quantitativo de 80 participantes foi justificado bem a forma como serão recrutados.

A análise de dados proposta encontra-se adequada ao tipo de estudo proposto.

O TCLE apresentado encontra-se bem escrito, com linguagem clara e acessível, e dentro dos padrões exigidos pela Resolução 466/12.

Por fim, explicita de forma adequada o binômio riscos-benefícios, deixando claro o compromisso exigido do pesquisador no tratamento adequado dos riscos e dos dados coletados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentou todos os termos obrigatórios. Todos os documentos de inclusão obrigatória na presente versão do protocolo de pesquisa foram apresentados, conforme recomendações contidas na Resolução CNS nº 466/2012 do MS.

Recomendações:

Recomenda-se que a pesquisadora responsável e demais colaboradores, mantenham a metodologia proposta e aprovada pelo CEP-HULW.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Considerando que a pesquisadora atendeu adequadamente às recomendações feitas por este Colegiado em parecer anterior a este, e que o estudo apresenta viabilidade ética e metodológica, estando em consonância com as diretrizes contidas na Resolução 466/2012, do CNS/MS, somos favoráveis ao desenvolvimento da investigação.

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 58.059-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7964

Fax: (83)3216-7522

E-mail: comitedeetica.hulw2018@gmail.com



UFPB - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO LAURO
WANDERLEY DA



Continuação do Parecer: 3.149.662

Considerações Finais a critério do CEP:

Ratificamos o parecer de APROVAÇÃO do protocolo de pesquisa, emitido pelo Colegiado do CEP/HULW, em reunião ordinária realizada em 12 de fevereiro de 2019.

OBSERVAÇÕES IMPORTANTES PARA O(S) PESQUISADORES

. O participante da pesquisa e/ou seu responsável legal deverá receber uma via do TCLE na íntegra, com assinatura do pesquisador responsável e do participante e/ou responsável legal. Se o TCLE contiver mais de uma folha, todas devem ser rubricadas e com aposição de assinatura na última folha. O pesquisador deverá manter em sua guarda uma via do TCLE assinado pelo participante por cinco anos.

. O pesquisador deverá desenvolver a pesquisa conforme delineamento aprovado no protocolo de pesquisa e só descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade, pelo CEP que o aprovou, aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.

Lembramos que é de responsabilidade do pesquisador assegurar que o local onde a pesquisa será realizada ofereça condições plenas de funcionamento garantindo assim a segurança e o bem-estar dos participantes da pesquisa e de quaisquer outros envolvidos.

Eventuais modificações ao protocolo devem ser apresentadas por meio de EMENDA ao CEP/HULW de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

O pesquisador deverá apresentar o Relatório PARCIAL E/OU FINAL ao CEP/HULW, por meio de NOTIFICAÇÃO online via Plataforma Brasil, para APRECIÇÃO e OBTENÇÃO da Certidão Definitiva por este CEP. Informamos que qualquer alteração no projeto, dificuldades, assim como os eventos adversos deverão ser comunicados a este Comitê de Ética em Pesquisa através do Pesquisador responsável uma vez que, após aprovação da pesquisa o CEP-HULW torna-se co-responsável.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1257989.pdf	04/02/2019 08:50:26		Aceito
Outros	carta_resposta_cep_pdf.pdf	30/01/2019 10:19:24	MARILIA MARQUES PEREIRA LIRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_pesquisa_plataforma_brasil.docx	29/01/2019 16:25:31	MARILIA MARQUES PEREIRA LIRA	Aceito

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 58.059-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7964

Fax: (83)3216-7522

E-mail: comitedeetica.hulw2018@gmail.com



UFPB - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO LAURO
WANDERLEY DA



Continuação do Parecer: 3.149.662

Outros	certidao_colegiado_ppgcn.pdf	03/12/2018 14:55:25	MARILIA MARQUES PEREIRA LIRA	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_PB.pdf	03/12/2018 14:54:40	MARILIA MARQUES PEREIRA LIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.docx	03/12/2018 11:03:36	MARILIA MARQUES PEREIRA LIRA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JOAO PESSOA, 15 de Fevereiro de 2019

Assinado por:
MARIA ELIANE MOREIRA FREIRE
(Coordenador(a))

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 58.059-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7964

Fax: (83)3216-7522

E-mail: comitedeetica.hulw2018@gmail.com