

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia

BRUNA CONCHESKI DE MOURA

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE PROBIÓTICOS SOBRE A  
PERMEABILIDADE INTESTINAL ATRAVÉS DOS NÍVEIS SÉRICOS DE  
CLAUDINA-3 EM PACIENTES COM ESTEATO-HEPATITE NÃO ALCOÓLICA.**

**Porto Alegre, 2021**

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia

BRUNA CONCHESKI DE MOURA

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE PROBIÓTICOS SOBRE A PERMEABILIDADE  
INTESTINAL ATRAVÉS DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CLAUDINA-3 EM PACIENTES  
COM ESTEATO-HEPATITE NÃO ALCOÓLICA.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia.

Orientadora: Profa. Valesca Dall'Alba

**Porto Alegre, 2021**

de Moura, Bruna

Efeito da suplementação de probióticos sobre a permeabilidade intestinal através dos níveis séricos de Claudina-3 em pacientes com Esteato-hepatite não alcoólica / Bruna de Moura. -- 2021.

68 f.

Orientadora: Valesca Dall'Alba.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Probióticos. 2. Claudina-3. 3. Permeabilidade intestinal. 4. NASH. I. Dall'Alba, Valesca, orient.  
II. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Minha gratidão transcende qualquer outro sentimento neste momento. Agradeço inicialmente à Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) por cederem seus espaços com excelência no ensino e pesquisa. Agradeço a todos os pacientes que aceitaram participar de forma voluntária do estudo por acreditarem no poder científico e social da nossa pesquisa; a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) pelo financiamento que possibilitou a realização deste trabalho.

Agradeço, especialmente, a minha orientadora Valesca Dall'Alba pela oportunidade em participar de um grupo de pesquisa tão capacitado. Agradeço por todos os conhecimentos desenvolvidos, pela disposição, dedicação e compreensão prestada sempre que necessário. És inspiradora. Aproveito para agradecer a todos os colegas do grupo de pesquisa pela amizade e companheirismo ao decorrer deste trabalho.

Agradeço a banca examinadora pela disponibilidade em ler e contribuição com seus conhecimentos e impressões.

Por fim, agradeço quem esteve incansavelmente ao meu lado, minha filha, meu marido, minha mãe e meu irmão. Sem vocês, certamente, essa realização não seria completa. Obrigada pelo apoio, compreensão e amor dedicado constantemente, desde sempre. A minha força e determinação vem de vocês.

A gratidão transforma o que temos em suficiente.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	5
LISTA DE ABREVIATURAS .....	9
1. INTRODUÇÃO .....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA .....	12
3. JUSTIFICATIVA .....	22
4. QUESTÃO DE PESQUISA .....	23
5. HIPÓTESE .....	24
6. OBJETIVOS .....	25
REFERÊNCIAS .....	26
7. ARTIGO ORIGINAL .....	34
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	58
9. PERSPECTIVAS FUTURAS .....	59
ANEXOS .....	60
APENDICE .....	67

## RESUMO

Parece existir associação clínica entre o aumento de permeabilidade intestinal (PI) e complicações de doenças metabólicas, incluindo esteato hepatite não-alcoólica (EHNA). Marcadores indiretos da PI vem sendo explorados nas últimas décadas para a detecção de um ambiente com alterações de permeabilidade. Claudina-3 (CLD-3) em conjunto com outras proteínas do complexo juncional formam as *Tight junctions* (TJ), junções que ligam o espaço paracelular da barreira intestinal. Sabe-se que a disbiose intestinal contribui na ruptura das TJ, implicando em maiores concentrações séricas de CLD-3 e, portanto, aumento de PI. O intestino mais permeável permite promoção de uma inflamação de baixo grau crônica pelo aumento da passagem de subprodutos intestinais ao fígado, via circulação portal. O percurso envolvido nesta relação, ainda é obscuro. O aumento na prevalência da EHNA previsto para as próximas décadas reforça a necessidade de estudos que identifiquem novos alvos terapêuticos para melhor manejo da doença.

Os probióticos podem conferir benefícios à microbiota intestinal, fortalecendo a barreira intestinal. A suplementação tem como objetivo proporcionar maior resistência contra patógenos, através da diversidade de micróbios, a fim de evitar um ambiente fragilizado pela disbiose. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da suplementação de probióticos sobre o marcador indireto de permeabilidade intestinal CLD-3 sérica em pacientes com EHNA.

Este ensaio clínico duplo-cego randomizado inclui 46 pacientes adultos com esteato hepatite não-alcoólica diagnosticado por meio de biópsia hepática NAS  $\geq 4$  de acordo com *NASH Clinical Research Network NAFLD activity score* (NAS), em tratamento ambulatorial nos serviços de Gastroenterologia e Nutrição e Dietética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil. Os pacientes foram distribuídos em dois grupos, intervenção e placebo. A

intervenção consistiu em um período de 24 semanas por meio de suplementação com 2g diárias de mix de probióticos (composto por *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* e *Bifidobacterium lactis*,  $1 \times 10^9$ UFC em cada cepa). Foram avaliadas as alterações nos seguintes parâmetros: dados dietéticos a partir de recordatório alimentar de 3 dias, dados antropométricos com aferição de peso, altura e circunferência da cintura, dados laboratoriais e de CLD-3 através de coleta de sangue. Para análise dos dados utilizamos o método de Equações de Estimativas Generalizadas para comparações entre o grupo probiótico e grupo placebo. O nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ .

Quarenta e quatro pacientes com idade média de 51 anos concluíram o ensaio. Destes, 27 eram do sexo masculino, 87% dos participantes apresentavam estágios iniciais de fibrose, classificados em F0 ou F1. Os níveis basais de CLD-3 entre os grupos eram similares no início do estudo, entretanto, ao final das 24 semanas, houve redução nos níveis séricos de CLD-3 no grupo Probiótico ( $14,7 \pm 5,97$ ng/mL para  $6,1 \pm 1,6$  ng/mL) e no Placebo ( $16,7 \pm 6,02$  para  $6 \pm 1,95$  ng/mL), ambos com  $p < 0,01$ , entretanto, sem diferença entre grupos. Quanto à dieta, houve redução no consumo de calorias totais, carboidratos, proteínas e gorduras ao longo do estudo ( $p < 0,05$ ), sem diferença entre grupos. Ao longo das 24 semanas não se verificou alterações de peso e circunferência de cintura como medidas antropométricas.

CLD-3 reduziu de forma significativa nos pacientes com esteato hepatite não-alcoólica durante o período de intervenção. No entanto, não se observou alteração pelo efeito da suplementação com probióticos. Estudos com maior tempo de acompanhamento serão necessários para validar CLD-3 como marcador de permeabilidade intestinal.

**Palavras-chave:** Claudina-3, NASH, Permeabilidade Intestinal, Probióticos.

## ABSTRACT

There seems to be a clinical association between increased intestinal permeability (IP) and complications from metabolic diseases, including non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Indirect IP markers have been explored in recent decades to detect an environment with permeability alterations. Claudin-3 (CLD-3) and other junctional complex proteins form the Tight Junctions (TJ), which connect the paracellular space of the intestinal barrier. The intestinal dysbiosis contributes to TJ rupture, implying higher serum concentrations of CLD-3 and, therefore, an increase in IP. The more permeable intestine promotes a chronic low-grade inflammation by increasing the passage of intestinal by-products to the liver via the portal circulation. The path involved in this relationship is still unclear. The increasing prevalence of NASH predicted for the next decades reinforces the need for studies to identify new therapeutic targets for better disease management.

Probiotics can provide benefits to the intestinal microbiota, strengthening the intestinal barrier. Supplementation aims to provide more excellent resistance against pathogens through the diversity of microbes to avoid an environment weakened by dysbiosis. Thus, the present work aimed to evaluate the effect of probiotic supplementation on the indirect marker of serum intestinal permeability CLD-3 in patients with NASH.

This double-blind, randomized clinical trial includes 46 adult patients with non-alcoholic steatohepatitis diagnosed by liver biopsy  $\text{NASH} \geq 4$ , according to the NASH Clinical Research Network NAFLD activity score (NAS), under outpatient treatment in the Gastroenterology and Nutrition services and Dietetics at the Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Brazil. Patients were divided into two groups: intervention and placebo. The intervention consisted of 24 weeks of 2g daily probiotic mix supplementation (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, and *Bifidobacterium lactis*,



1x10<sup>9</sup> CFU in each strain). The study evaluated changes in the following parameters: dietary data from a 3-day dietary recall, anthropometric data with weight measurement, height and waist circumference, laboratory data, and CLD-3 through blood collection. We used the Generalized Estimating Equations method for comparisons between the probiotic group and the placebo group for data analysis.

Forty-four patients with a mean age of 51 years completed the trial. Of these, 27 were male. Eighty-seven percent of participants had early stages of fibrosis, classified as F0 or F1. Baseline levels of CLD-3 between groups were similar at baseline. However, at the end of 24 weeks, there was a reduction in serum CLD-3 levels in the Probiotic group (14,7 + 5,97ng/mL to 6,1 + 1,6 ng/mL) and in the Placebo group (16,7 + 6,02 to 6 + 1,95 ng/mL), both with p<0.01. No change was observed due to the effect of supplementation with probiotics. As for the diet, there was a reduction in the consumption of total calories, carbohydrates, proteins, and fats throughout the study (p<0.05), with no difference between groups. Over the 24 weeks, there were no changes in weight or waist circumference.

Studies with longer follow-up are necessary to validate CLD-3 as a marker of intestinal permeability. CLD-3 significantly reduced in patients with NASH during the intervention period. However, no change was observed due to the effect of supplementation with probiotics.

**Keywords:** Claudin-3, NASH, Intestinal permeability, Probiotics

## LISTA DE ABREVIATURAS

CHC – Carcinoma hepatocelular

CK-18 – Citoqueratina 18

CLD-3 – Claudina-3

DHGNA – Doença hepática gordurosa não alcoólica

EHNA – Esteato-hepatite não alcoólica

EndoCAb – Anticorpo do núcleo de endotoxina circulante

FABP – *Fatty Acid Binding Protein*

IMC – Índice de massa corporal

LPS – Lipopolissacarídeo

mRNA – RNA mensageiro

NAS – *NAFLD active score*

NASH – *Nonalcoholic steatohepatitis*

PI – Permeabilidade intestinal

PLAB – Placebo

PROB – Probiótico

TJ – *Tight junctions*

TLR – *Toll-like*

TLR4 – *Toll-like 4 receptor*

UAMP – Unidade de Análise Moleculares e de Proteínas

## 1. INTRODUÇÃO

A doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) é a manifestação mais comum das doenças hepáticas crônicas, suas complicações variam em um espectro de um acúmulo de gordura hepática classificado como esteatose até EHNA, sua forma progressiva, com lesão nos hepatócitos e inflamação associada<sup>1</sup>. Em torno de 20 a 30 % dos pacientes com DHGNA evoluem para EHNA, podendo desenvolver cirrose e complicações associadas, como carcinoma hepatocelular (CHC).<sup>2</sup> Estudos indicam o aumento de incidência e prevalência de DHGNA e EHNA nos próximos anos.<sup>3</sup>

O percurso subjacente que associa a progressão de DHGNA à EHNA com o aumento de PI e vazamento de seus metabólitos através da comunicação entre o intestino e o fígado não está elucidado, embora já venha sendo documentada evidências entre esta relação por determinados estudos.<sup>4,5,6,7,8</sup> Tal relação inclui interações celulares e moleculares, onde dieta, estilo de vida e carga genética são os principais moduladores.<sup>9,10</sup>

A integridade do epitélio intestinal e a defesa imune de ambos os órgãos, intestino e fígado, parecem desempenhar um papel importante no equilíbrio deste eixo. Caso contrário, um mecanismo patogênico pode ser criado. A presença de disbiose provoca a ruptura das *tight-junctions* (TJ), junções da barreira intestinal, proporcionando o aumento da PI e uma liberação na via portal de bactérias e subprodutos para o fígado.<sup>11,12</sup> Métodos de avaliação indireta da PI vem sendo explorados nas últimas décadas. CLD-3 em conjunto com outras proteínas do complexo juncional formam as TJ, alterações nas concentrações séricas de CLD-3 sugerem uma disfunção das junções de adesão e aumento de PI,<sup>13,14,15</sup>

Os probióticos podem conferir benefícios à microbiota, fortalecendo a barreira intestinal e a resposta imunológica. A suplementação tem como objetivo proporcionar maior resistência contra patógenos, através da diversidade de micróbios, a fim de evitar um ambiente fragilizado pela disbiose.<sup>16</sup> Sabe-se que em pacientes com doenças imunomediadas e metabólicas há um

predomínio na redução da diversidade bacteriana geral do microbioma intestinal e, por esta razão, a investigação do potencial de probióticos como prováveis agentes preventivos e terapêuticos surgem em ascensão.<sup>17</sup>

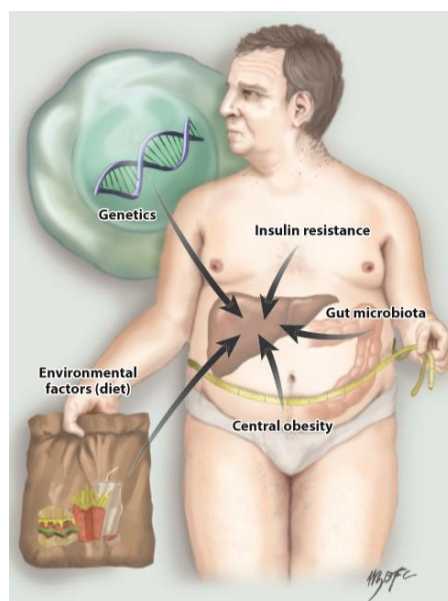
## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A EHNA ou NASH do inglês "nonalcoholic steatohepatitis" é caracterizada pela presença de lesão nos hepatócitos (balonização), necroinflamação e conforme a progressão da doença sinais de fibrose surgem como resposta natural às lesões, podendo evoluir a cirrose e carcinoma hepatocelular.<sup>18,19</sup>

A progressão da DHGNA para EHNA ainda não está bem esclarecida, sabe-se que existem múltiplos fatores envolvidos neste percurso, entre eles, alterações na microbiota, fatores metabólico, inflamatório e genético.<sup>20,21,22,23</sup> A obesidade, resistência à insulina, diabetes e dislipidemia mostram-se frequentemente relacionados com a evolução da doença e as desordens metabólicas, como ilustrado na Figura 1.<sup>24,25,26,2</sup>

**Figura 1.** Esquema representando os fatores que contribuem para a patogênese da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). A DHGNA é uma doença multifatorial; vários fatores, como resistência à insulina, obesidade central, fatores ambientais ou nutricionais e microbiota intestinal, assim como fatores genéticos e epigenéticos, estão ligados à sua patogênese.

Fonte: Arab, Arrese e Trauner, 2018.



O percurso natural da EHNA é marcado por um longo período com ausência de sinais e sintomas, tratando-se de uma doença silenciosa, dificultando o diagnóstico e a estimativa precisa da sua prevalência. Ainda, o método de diagnóstico e a etnia são fatores que aumentam a variabilidade das taxas deste parâmetro. Younossi *et al.*<sup>27</sup>, em uma meta-análise com 8.515.431 pacientes estimou que a prevalência de EHNA na população geral seja entre 1,5% e 6,45%. Este percentual exerce maior impacto quando avaliado em pacientes com DHGNA que tiveram indicação clínica para biópsia hepática, representando uma prevalência global estimada de 59,10% (95% IC, 47,55-69,73). Por outro lado, as estimativas de prevalência entre indivíduos com DHGNA sem indicação de biópsia variaram de 6,67% (IC95%: 2,17-18,73) a 29,85% (IC95%: 22,72-38,12) dependendo da região. Estes *et al.*<sup>28</sup> prevê um aumento de 63% na prevalência de EHNA na população geral entre os anos de 2015 e 2030.

O diagnóstico de EHNA requer a exclusão de causas secundárias e, principalmente, do consumo de álcool diário acima de 30g de etanol para homens e 20g para mulheres, esta informação deve ser fidedigna, já que até o momento não existem testes confiáveis capazes de fazer a distinção entre esteato-hepatite alcoólica e EHNA.<sup>29</sup> A biópsia hepática é considerada padrão ouro para medição de características histopatológicas da EHNA, sendo a ferramenta mais precisa quanto aos critérios diagnósticos, porém é um método invasivo e com custo elevado. O escore de atividade da DHGNA “NAFLD activity score” (NAS) é capaz de quantificar a atividade da doença através da biópsia, um escore  $\geq 4$  está associado à EHNA.<sup>30</sup> Em busca de um marcador não invasivo, os fragmentos da citoqueratina-18 (CK-18) apresentam um nível de precisão razoável no diagnóstico da EHNA, com limitações, pela sua baixa sensibilidade.<sup>31</sup> Até o momento, a existência de métodos não invasivos, sejam eles, clínicos, bioquímicos e de imagem, ainda, proporcionam resultados limitados.<sup>19,21,32</sup>

O epitélio intestinal é um sistema multicamadas complexo composto por uma barreira natural, física e funcional, capaz de separar o lúmen intestinal do ambiente interno, regulando a absorção de substâncias presentes no lúmen, como nutrientes, eletrólitos e água, além de impedir a entrada de patógenos e toxinas que possam ser nocivos a sua integridade.<sup>33,34</sup> A barreira intestinal é formada por componentes mecânicos (muco e camada epitelial), humorais (defensinas e Imunoglobulina A), imunológicos (linfócitos e células imunes inatas), musculares e neurológicos.<sup>35,10</sup>

A interação dos componentes da barreira intestinal permite que a permeabilidade equilibrada seja mantida. Sendo a PI uma característica funcional da barreira, capaz de ser mensurável.<sup>10</sup> As *Tight junctions*, junções de oclusão, e estruturas intercelulares especializadas auxiliam o controle desta barreira, porém, a ruptura destas junções confere aumento da PI, podendo desempenhar um papel importante na patogênese de diversas doenças.

A disbiose da microbiota intestinal está relacionada com disfunção da barreira intestinal, apresentando um aumento de permeabilidade e expondo o fígado a translocação microbiana, podendo induzir uma inflamação de baixo grau.<sup>4,36</sup> O aumento da permeabilidade possibilita a passagem de produtos derivados da microbiota intestinal para a circulação portal, como o lipopolissacarídeo (LPS), que induz a ativação dos receptores *toll-like* (TLR), entre eles TLR-4 hepático, proporcionando maior produção de citocinas pró inflamatórias, estímulo para a cascata inflamatória e favorecendo o desenvolvimento de EHNA, fibrose hepática e CHC.<sup>37,5,38</sup>

A relação do eixo intestino-fígado, em um ambiente com aumento de PI, parece estar associada ao mecanismo patogênico de EHNA. Esta relação já vem sendo documentada por determinados estudos.<sup>4,5,6,7,8</sup>

Um estudo experimental, publicado por Rahman *et al.*<sup>39</sup> avaliou animais com alterações na permeabilidade intestinal alimentados com uma dieta normal ou rica em gorduras saturadas, frutose e colesterol. Os animais com aumento de permeabilidade associado a uma dieta inadequada desenvolveram características histológicas e patológicas de EHNA grave, incluindo esteatose, inflamação lobular, balonamento hepatocelular e fibrose, enquanto camundongos controle alimentados com a mesma dieta desenvolveram apenas esteatose.

Luther *et al.*<sup>7</sup> analisaram as mudanças na permeabilidade intestinal em um modelo de camundongos com EHNA induzido por dieta com deficiência de metionina e colina. Os resultados encontrados sugerem que alterações precoces na fisiologia do fígado também podem afetar a homeostase intestinal. Os pesquisadores mostraram que a lesão hepática é induzida precocemente com a dieta deficiente em metionina e colina, antes de qualquer alteração na permeabilidade intestinal. Eles sugerem que a fase inicial da lesão hepática pode contribuir nas alterações da permeabilidade intestinal.

Diversos fatores podem alterar a permeabilidade intestinal, alterações na microbiota intestinal, camada de muco e danos epiteliais, resultando na translocação do conteúdo luminal para as camadas internas da parede intestinal, são alguns exemplos. Ainda, fatores dietéticos e de estilo de vida, como álcool e a dieta ocidental desenvolvem papel importante no aumento da PI.<sup>10</sup> Contudo, os mecanismos exatos que levam o aumento da permeabilidade e a progressão de EHNA não são claros, sabe-se que em modelos de associação de DHGNA e aumento de permeabilidade existe maior progressão da doença e desenvolvimento de EHNA<sup>40</sup>. Até o momento, estratégias terapêuticas direcionadas à microbiota intestinal parecem ser o melhor caminho na restauração da integridade da barreira intestinal e mostram-se como uma possível estratégia terapêutica em pacientes com EHNA.<sup>20,41</sup>



Probióticos são classificados como micro-organismos vivos, com efeito benéfico ao hospedeiro quando em composição e quantidades suficientes.<sup>42,29</sup> A justificativa para suplementação de probióticos é conferir maior resistência contra patógenos através do aumento da diversidade microbiana e prevenir ou tratar a disbiose. Pacientes com doenças imunomediadas e metabólicas, incluindo DHGNA, frequentemente apresentam uma redução na diversidade bacteriana geral, pelo aumento de bactérias Gram-negativas do microbioma intestinal.<sup>16</sup>

Na última década, houve um aumento importante no número de ensaios clínicos em busca de resultados com a suplementação de probióticos em pacientes com complicações hepáticas. Contudo, ainda, nos deparamos com resultados conflitantes e limitações nas evidências atuais.<sup>43</sup>

Ferolla *et al.*<sup>6</sup>, em seu ensaio clínico randomizado com 50 participantes diagnosticados com EHNA por biópsia demonstrou efeitos positivos a partir da suplementação de probióticos e prebióticos em comparação ao grupo controle, como redução de esteatose, peso e circunferência da cintura. Porém a intervenção de 3 meses não foi capaz de influenciar em alterações de permeabilidade intestinal pelo teste de excreção urinária de lactulose / manitol e endotoxemia por níveis séricos de LPS.

O ensaio clínico randomizado em pacientes com cirrose compensada de Macnaughtan *et al.*<sup>44</sup> não observou alterações na endotoxemia e PI após seis meses de suplementação com probiótico *Lactobacillus casei* Shirota quando comparados ao grupo placebo. O grupo avaliou endotoxina por concentração sérica de LPS e PI pela relação de lactulose / ramnose na urina. Um desenho semelhante a este foi aplicado por Horvath *et. al.*<sup>45</sup>, os pesquisadores avaliaram a suplementação com mix de probióticos em pacientes com cirrose compensada e seu impacto na PI através do teste lactulose / ramnose na urina; zonulina e calprotectina nas fezes e diamina

oxidase no soro. A endotoxina foi avaliada por concentração sérica de LPS. O grupo não encontrou influência significativa na PI e endotoxemia pela suplementação.

Alterações na microbiota intestinal e níveis aumentados de LPS e TLR4 foram encontrados por Xue L *et al.*<sup>46</sup> na DHGNA em um modelo experimental com comundongos. Neste estudo, o grupo de animais que recebeu suplementação de probióticos apresentou maior diversidade da flora avaliada por impressão digital por *polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis* (PCR-DGGE) nas fezes dos animais e maior integridade da barreira intestinal avaliado por microscopia eletrônica. A melhora da estrutura hepática se deu por redução do grau de atividade inflamatória no tecido hepático avaliado por histologia e níveis séricos de enzima hepática, a endotoxemia por redução de LPS e TLR4. Sugerindo que a terapia com probióticos pode retardar a progressão da DHGNA.

Xiao *et al.*<sup>47</sup>, sustentam a suplementação de probióticos em pacientes com DHGNA. O grupo apresentou uma revisão sistemática com 28 ensaios clínicos, totalizando 1555 pacientes, com tempo de intervenção de 4 a 28 semanas. A terapia com probióticos teve resultados positivos na redução de índice de massa corporal (IMC), marcadores de função hepática como alanina aminotransferase, aspartato transaminase, gama-glutamil transpeptidase; insulina e colesterol total, entretanto sem alteração em componentes da estrutura hepática.

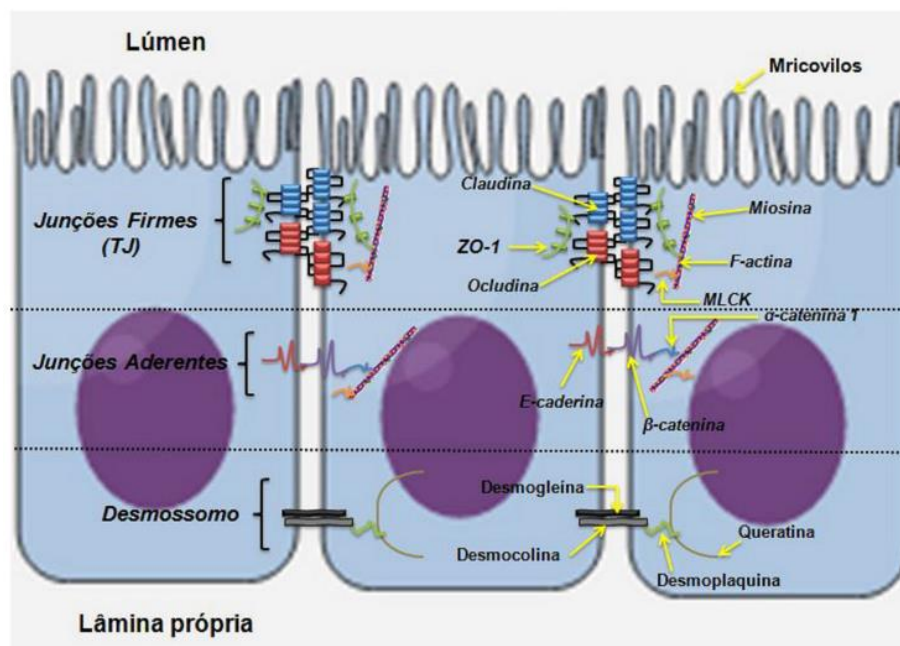
A disbiose nas diferentes hepatopatias vem sendo relatada por diversos estudos. A sugestão terapêutica baseada na modulação da microbiota intestinal, assim como a suplementação com probióticos ganham destaque nos últimos anos. Porém, ainda sem sustentação científica consolidada, visto que a maioria dos estudos com resultados que fomentam tal conduta são em modelos animais.<sup>48</sup>

Atualmente, existem diversos métodos de avaliação da permeabilidade e integridade intestinal. Para escolha da técnica a ser utilizada é necessário considerar a amostra em estudo, por exemplo, medições *in vitro* ou *in vivo*; modelo humano ou animal; marcadores moleculares como íons, carboidratos, macromoléculas e antígenos, produtos bacterianos e bactérias; e o material coletado para análise das moléculas marcadoras como sangue periférico, sangue da veia porta, urina, fezes e tecido.<sup>49</sup> No Quadro 1 são descritos alguns exemplos de métodos de avaliação.

Quadro 1: Métodos de avaliação de permeabilidade intestinal

<b>MÉTODO DE AVALIAÇÃO DA PI</b>	<b>MEDIÇÃO</b>
Câmaras de Ussing	Tecido intestinal
Muco do cólon	Biópsia intestinal
Teste de respiração	Cromatografia gasosa/ espectroscopia de massa
Claudina-3	Plasma, soro ou urina
Anticorpo do núcleo de endotoxina circulante – <i>EndoCAb</i>	Soro
Lactulose / Manitol	Urina
Produção de butirato	Fezes
Teste de hemolisina	Fezes

As claudinas são uma família de proteínas transmembranares. Até o momento, foram identificadas 23 tipos de claudinas humanas, em conjunto com outras proteínas do complexo juncional, elas formam as TJ que selam o espaço paracelular, regulando o fluxo de íons de água e pequenas moléculas, ilustrado na Figura 2. As claudinas compõem a maior parte da complexa estrutura das TJ e são consideradas componentes chave, exercendo papel fundamental na função da barreira intestinal.<sup>50,51</sup>



**Figura 2.** Ilustração das proteínas transmembranares que medeiam às adesões celulares e vedam os espaços paracelulares. Esta interação é necessária para a manutenção da integridade estrutural da função de barreira do epitélio intestinal.

Fonte: Rodrigues FA, Medeiros PH, Prata M, Lima AA, 2016.

As claudinas constituem barreira paracelular e poros, desempenhando ação fundamental na característica da permeabilidade das células epiteliais. Apresentam pequeno tamanho, 23,3 unidade de massa atômica (kDa), com expressão intestinal endógena abundante e localização paracelular. No intestino, a CLD-3 atua como uma proteína TJ formadora de barreira, diminuindo a permeabilidade paracelular.<sup>52,53,54</sup> Desta forma, analisar CLD-3 como marcador da disfunção de integridade da barreira paracelular torna-se um método de avaliação considerável.<sup>10,55</sup>

A mensuração de CLD-3 pode ocorrer de maneira direta através da avaliação histológica do intestino por biópsia ou tecido animal, e indireta a partir de amostras de sangue ou urina. Apesar da determinação direta ser o método ideal de avaliação, com alta especificidade, trata-se de uma técnica invasiva na avaliação *in vivo*. A interpretação dos resultados encontrados na análise direta de CLD-3 é inversamente proporcional a PI, ou seja, hipoteticamente, quanto maior a expressão de CLD-3 no tecido avaliado, menor será a PI. Modelos de mensuração

indireta da PI, permitem menor desconforto ao paciente e vem sendo amplamente utilizados em ensaios clínicos, porém com limitação dos dados pela prática adotada.<sup>10</sup> No método de avaliação indireto de CLD-3 a interpretação dos resultados é equivalente a PI, ou seja, em um ambiente com maiores níveis de CLD-3 séricos, por exemplo, sugere-se uma maior permeabilidade intestinal, conforme demonstrado no Quadro 2.

Quadro 2: Métodos de mensuração da permeabilidade intestinal através do marcador CLD-3.

<b>MODELO MENSURAÇÃO</b>	<b>MÉTODO DE AVALIAÇÃO</b>	<b>MATERIAL ANALISADO</b>	<b>INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS</b>
<b>DIRETO</b>	Histológico		Inversamente proporcional: ↑ expressão sérica de CLD-3 ↓ PI
<b>INDIRETO</b>	Material biológico - sangue e urina		Diretamente proporcional: ↓ concentração de CLD-3 ↓ PI

CLD-3, Claudina-3; PI, permeabilidade intestinal

Typpo *et al.*<sup>56</sup>, avaliaram a variação da PI no pós-operatório de crianças com cardiopatia congênita através da proteína *fatty acid binding protein* (FABP), citrulina e CLD-3 plasmático, o teste de permeabilidade duplo ao açúcar analisado pela urina com administração de lactulose / manitol também foi utilizado para demonstrar a função da barreira intestinal. Os pesquisadores encontraram valores de CLD-3 correlacionados com as repetidas relações lactulose/manitol aplicadas pelo grupo ao longo do tempo ( $p < 0,001$ ). Ainda, o marcador, associou-se com a

duração de administração de antibióticos, refletindo efeitos negativos sobre a função da barreira intestinal. Na população estudada, CLD-3 foi confirmada como um teste de avaliação de integridade da barreira intestinal. Yeh *et al.*<sup>57</sup> também utilizaram CLD-3 como biomarcador de PI para avaliação da resposta gastrointestinal à exercícios intensos em pacientes saudáveis expostos à ambientes quentes e frios e encontraram valores representativos da PI após a intervenção realizada.

Em outro estudo, em ambiente experimental com ratos e clínico, pesquisadores encontraram uma forte relação entre a perda da junção estreita intestinal por coloração imuno-histoquímica no tecido intestinal dos animais e por biópsia intestinal dos pacientes no âmbito clínico com os níveis urinários de CLD-3 para ambas linhas de estudo, humanos e animais. Sugerindo que a mensuração da CLD-3 urinária pode ser usada como marcador não invasivo para a perda da junção intestinal.<sup>58</sup>

Ademais, um estudo experimental com camundongos mimetizando um modelo humano de crianças prematuras mostrou que a suplementação de bactérias probióticas induziu a maturação da expressão de CLD-3 intestinal, melhorando a função de barreira intestinal. Os pesquisadores sugerem que a barreira intestinal, regulada pela expressão da proteína TJ, pode ser influenciada pela microbiota intestinal, a partir dos resultados obtidos do tratamento com *Lactobacillus rhamnosus GG*. Os resultados mostraram uma indução dupla da expressão de RNA mensageiro (mRNA) CLD-3 e aumento da sua expressão por microscopia de imunofluorescência.<sup>59</sup>

Até o momento não há um consenso sobre um teste que avalie PI de forma menos invasiva que a análise tecidual, por biópsia. Até onde sabemos, este é o primeiro trabalho que avalia os níveis séricos de CLD-3 em pacientes com EHNA.

### **3. JUSTIFICATIVA**

Evidências clínicas e experimentais sugerem o importante papel da hiperpermeabilidade intestinal nas alterações inflamatórias de várias doenças, entre elas EHNA, embora até o momento não haja consenso sobre a relação de causa e efeito entre a permeabilidade intestinal aumentada e EHNA. Se por um lado a doença hepática pode induzir o aumento da permeabilidade intestinal, por outro, a permeabilidade aumentada também poderia contribuir para o desenvolvimento/agravamento da EHNA, uma vez que os produtos tóxicos que passam pela barreira prejudicada atingem o fígado através da circulação entero-hepática.

O aumento na prevalência de pacientes com EHNA nas próximas décadas reforça a necessidade de estudos que identifiquem novos alvos terapêuticos para melhor manejo da doença. Em modelos experimentais, a suplementação com probióticos tem sido efetiva como agente hepatoprotetor, entretanto os mecanismos de ação envolvidos ainda não foram elucidados por completo. Intervenções direcionadas para a recuperação da microbiota intestinal saudável, por meio do uso de probióticos, podem ser uma alternativa adjuvante de manejo da EHNA.

#### **4. QUESTÃO DE PESQUISA**

A suplementação de probióticos por 24 semanas tem efeito sobre a permeabilidade intestinal através dos níveis circulantes CLD-3 em pacientes com EHNA?



## **5. HIPÓTESE**

**Hipótese nula:** A suplementação de probióticos por 24 semanas não é capaz de alterar níveis circulantes de CLD-3 em pacientes com EHNA.

**Hipótese verdadeira:** A suplementação de probióticos por 24 semanas é capaz de alterar níveis circulantes de CLD-3 em pacientes com EHNA.

## **6. OBJETIVO**

Avaliar o efeito da suplementação com mix de probióticos por 24 semanas sobre o marcador não invasivo de permeabilidade intestinal Claudina-3, antes e após intervenção em pacientes com EHNA.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Paik JM, Golabi P, Younossi Yet al. Changes in the global burden of chronic liver diseases from 2012 to 2017: the growing impact of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 2020;72:1605–1616.
2. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*, 2018; 67(1): 328-357.
3. Kanwal F, Shubrook JH, Younossi Z, Natarajan Y, Bugianesi E, Rinella ME, Harrison SA, Mantzoros C, Pfothenauer K, Klein S, Eckel RH, Kruger D, El-Serag H, Cusi K. Preparing for the NASH Epidemic: A Call to Action. *Diabetes Care*, 2021: dci210020.
4. Fukui H. Increased Intestinal Permeability and Decreased Barrier Function: Does It Really Influence the Risk of Inflammation? *Inflammatory Intestinal Diseases*, 2016; 1(3): 135-145.
5. Poeta M, Pierri L, Vajro P. Gut–Liver Axis Derangement in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. Pacifico L, ed. *Children*, 2017; 4(8): 66.
6. Ferolla S, Couto C, Costa-Silva L, et al. Beneficial Effect of Synbiotic Supplementation on Hepatic Steatosis and Anthropometric Parameters, But Not on Gut Permeability in a Population with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Nutrients*, 2016; 8(7): 397.
7. Luther J, Garber J, Khalili H, et al. Hepatic Injury in Nonalcoholic Steatohepatitis Contributes to Altered Intestinal Permeability. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 2015; 1(2): 222-232.

8. Miele L, Valenza V, La Torre G, Montalto M, Cammarota G, Ricci R, Mascianà R, Forgione A, Gabrieli M, Perotti G. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 2009; 49: 1877–1887.
9. Tripathi, A., Debelius, J., Brenner, D.A. et al. The gut–liver axis and the intersection with the microbiome. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2018; 15:397–411.
10. Bischoff S, Barbara G, Buurman W, et al. Intestinal permeability--a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol*, 2014; 14: 189.
11. Albillos A, de Gottardi A, Rescigno M. The gut-liver axis in liver disease: Pathophysiological basis for therapy. *Journal of Hepatology*, 2020;72(3):558-577.
12. Chopyk DM, Grakoui A. Contribution of the Intestinal Microbiome and Gut Barrier to Hepatic Disorders. *Gastroenterology*, 2020; 159 (3): 849-863.
13. Balda MS, Matter K. Tight junctions as regulators of tissue remodelling. *Current Opinion in Cell Biology*. 2016; 42: 94-101.
14. Garcia-Hernandez V, Quiros M, Nusrat A. Intestinal epithelial claudins: expression and regulation in homeostasis and inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2017; 1397: 66-79.
15. Assunção R, Alvito P, Kleiveland CR, Lea TE. Characterization of in vitro effects of patulin on intestinal epithelial and immune cells. *Toxicology Letters*. 2016; 250-251: 47-56.
16. Hrnčir T, Hrnčířová L, Kverka M, et al. Gut Microbiota and NAFLD: Pathogenetic Mechanisms, Microbiota Signatures, and Therapeutic Interventions. *Microorganisms*, 2021;9(5):957.

17. Bischoff S. Microbiota and aging. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 2016;19(1):26–30.
18. Oliveira A, Silva F, Dall’Alba V. Dietoterapia nas doenças gastrointestinais do adulto. 1ª. ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2016.
19. EASL-EASD-EASO. Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*, 2016; 64(6): 1388-402.
20. Arab J, Arrese M, Trauner M. Recent Insights into the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 2018; 13: 321-350.
21. Rinella M. Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica Uma Revisão Sistemática. *JAMA*, 2015; 313(22): 2263-2273.
22. Dai X, Wang B. Role of Gut Barrier Function in the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology Research and Practice*, 2015: 287348.
23. Takaki A, Kawai D; Yamamoto K. Multiple Hits, including oxidative stress, as pathogenesis and treatment target in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *International Journal Molecular Sciences*, 2013; 14(10): 20704-728.
24. Puchakayala BK, Verma S, Kanwar P, J Hart, Sanivarapu RR, SR Mohanty. Histopathological differences utilizing the nonalcoholic fatty liver disease activity score criteria in diabetic (type 2 diabetes mellitus) and non-diabetic patients with nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Hepatology*, 2015; 7(25): 2610-2618.

25. Lomonaco R, Bril F, Portillo-Sanchez P, *et al.* Metabolic Impact of Nonalcoholic Steatohepatitis in Obese Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, 2016; 39(4): 632-8.
26. Cotrim H, Parise E, Figueiredo-Mendes C, Galizzi-Filho J, Porta G, Oliveira C. Nonalcoholic fatty liver disease brazilian society of hepatology consensus. *Arquivos de Gastroenterologia*, 2016; 53(2): 118-22.
27. Younossi Z, Koenig A, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*, 2016; 64:73-84.
28. Estes C, Razavi H, R Loomba, Younossi Z, Sanyal AJ. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology*, 2018; 67(1): 123-133.
29. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines. Nonalcoholic Fatty Liver disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 2012; 30.
30. Dumitrascu D, Neuman M. Non-alcoholic fatty liver disease: an update on diagnosis. *Clujul Medical*, 2018; 91(2): 147-150.
31. Cusi K, Chang Z, Harrison S, Lomonaco R, Bril F, Orsak B, *et al.* Limited value of plasma cytokeratin-18 as a biomarker for NASH and fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*, 2014; 60: 167–174.
32. Machado M, Cortez-Pinto H. Non-invasive diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease. A critical appraisal. *Journal of Hepatology*, 2013; 58: 1007–1019.

33. Oliveira A, Hammes T. Microbiota e barreira intestinal: implicações para obesidade. *Clinical & Biomedical Research*, 2016; 36(4): 222-229.
34. Scaldaferri F, Pizzoferrato M, Gerardi V, Lopetuso L, Gasbarrini A. The gut barrier: new acquisitions and therapeutic approaches. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 2012; 46(Suppl): 12–17.
35. König J, Wells J, Cani PD, *et al.* Human Intestinal Barrier Function in Health and Disease. *Clinical and Translational Gastroenterology*, 2016; 7(10): 196.
36. Bluemel S, Williams B, Knight R, Schnabl B. Precision medicine in alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease via modulating the gut microbiota. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2016; 311(6): 1018-1036.
37. Thuy S, Ladurner R, Volynets V, *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease in humans is associated with increased plasma endotoxin and plasminogen activator inhibitor 1 concentrations and with fructose intake. *The Journal of Nutrition*, 2008; 138: 1452–1455.
38. Roh Y-S, Seki E. Toll-Like Receptors in Alcoholic Liver Disease, Non-Alcoholic Steatohepatitis and Carcinogenesis. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 2013; 28(01): 38-42.
39. Rahman K, Desai C, Iyer S, *et al.* Loss of Junctional Adhesion Molecule A Promotes Severe Steatohepatitis in Mice on a Diet High in Saturated Fat, Fructose, and Cholesterol. *Gastroenterology*, 2016; 151(4): 733-746.

40. Chu H, Duan Y, Yang L, Schnabl B. Small metabolites, possible big changes: a microbiota-centered view of non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*, 2019; 68(2):359-370.
41. Abdou R, Zhu L, Baker R, Baker S. Gut Microbiota of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Digestive Diseases and Sciences*, 2016; 61(5): 1268–1281.
42. Plaza-Diaz J., Ruiz-Ojeda FJ, Gil-Campos M., Gil A. Mechanisms of Action of Probiotics. *Advances in Nutrition*, 2019; 10 : 49 – 66.
43. Sharpton S.R., Maraj B., Harding-Theobald E., Vittinghoff E., Terrault N.A. Gut microbiome–targeted therapies in nonalcoholic fatty liver disease: A systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2019; 110:139–149.
44. Macnaughtan J, Figorilli F, García-López E, et al. A Double-Blind, Randomized Placebo-Controlled Trial of Probiotic *Lactobacillus casei* Shirota in Stable Cirrhotic Patients. *Nutrients*, 2020; 12(6):1651.
45. Horvath A, Leber B, Schmerboeck B, et al. Randomised clinical trial: the effects of a multispecies probiotic vs. placebo on innate immune function, bacterial translocation and gut permeability in patients with cirrhosis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2016; 44(9):926-935.
46. Xue L, He J, Gao N, et al. Probiotics may delay the progression of nonalcoholic fatty liver disease by restoring the gut microbiota structure and improving intestinal endotoxemia. *Scientific Reports*, 2017; 7: 45176.



47. Xiao MW, Lin SX, Shen ZH, Luo WW, Wang XY. Systematic Review with Meta-Analysis: The Effects of Probiotics in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology Research and Practice*, 2019; 2019:1484598.
48. Chen J, Vitetta L. Gut Microbiota Metabolites in NAFLD Pathogenesis and Therapeutic Implications. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020; 21 (15): 5214.
49. Oriá R, Brito G. Sistema Digestório: Integração Básico-Clínica. 1ª. ed. São Paulo: Blucher, 2016.
50. Balda MS, Matter K. Tight junctions as regulators of tissue remodelling. *Current Opinion in Cell Biology*, 2016; 42: 94-101.
51. RODRIGUES, Francisco Adelvane de Paulo; MEDEIROS, Pedro Henrique Quintela Soares de; PRATA, Mara de Moura Gondim; LIMA, Aldo Ângelo Moreira; "Fisiologia da Barreira Epitelial Intestinal", p. 441 -478. In: Sistema Digestório: Integração Básico-Clínica. São Paulo: Blucher, 2016.
52. Findley M, Koval M. Regulation and roles for claudin-family tight junction proteins. *IUBMB life*, 2009; 61(4): 431-437.
53. Günzel D, Yu ASL. Claudins and the Modulation of Tight Junction Permeability. *Physiological Reviews*, 2013; 93(2): 525-569.
54. Günzel D, Fromm M. Claudins and Other Tight Junction Proteins. *Comprehensive Physiology*, 2012; 2: 1819-1852.

55. Bücker R, Schumann M, Amasheh S, Schulzke J-D. Claudins in intestinal function and disease. In: Yu ASL editor. Current topics in membranes. Bulington (MA): *Academic Press*, 2010. 195–227.
56. Typpo K, Larmonier C, Deschenes J, Redford D, Kiela P, Ghishan F. Clinical Characteristics Associated with Post-Operative Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction in Children with Congenital Heart Disease. *Pediatric critical care medicine : a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies*, 2015; 16(1): 37-44.
57. Yeh Y, Lei L, Lim C. Gastrointestinal response and endotoxemia during intense exercise in hot and cool environments. *European Journal of Applied Physiology*, 2013; 113(6): 1575-1583.
58. Thuijls G, Derikx J, de Haan J, Grootjans J, de Bruin A, Masclee A, Heineman E, Buurman W. Urine-based detection of intestinal tight junction loss. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 2010; 44(1): 14-19.
59. Patel R, Myers L, Kurundkar A, Maheshwari A, Nusrat A, Lin P. Probiotic Bacteria Induce Maturation of Intestinal Claudin 3 Expression and Barrier Function. *The American Journal of Pathology*, 2012; 180(2): 626-635.

## 7. ARTIGO ORIGINAL

**Título:** Effect of probiotic supplementation on intestinal permeability through serum levels of Claudin-3 in patients with non-alcoholic steatohepatitis.

**Periódico:** A ser submetido ao periódico *Nutrition Journal* (Fator de impacto 4.008, QUALIS A2).

**Effect of probiotic supplementation on intestinal permeability through serum levels of Claudin-3 in patients with non-alcoholic steatohepatitis.**

**Authors:** Bruna Concheski de Moura<sup>1</sup>, Amanda Souza Silva-Sperb<sup>1</sup>, Helena Abadie Moraes<sup>1</sup>, Larisse Longo<sup>1,2</sup>, Carolina Uribe-Cruz<sup>1,2,3</sup>, Matheus Truccolo Michalczuk<sup>1,3</sup>, Themis Reverbel da Silveira<sup>2</sup>, Carlos Thadeu Schmidt Cerski<sup>1,4</sup>, Mário Reis Álvares-da-Silva<sup>1,2,3</sup>, Valesca Dall'Alba<sup>1,2,5</sup>.

**Affiliation:**

1. Graduate Program in Gastroenterology and Hepatology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.
2. Experimental Laboratory of Hepatology and Gastroenterology, Center for Experimental Research, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.
3. Division of Gastroenterology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.
4. Unit of Surgical Pathology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.
5. Nutrition Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

**Correspondence:**

Bruna Concheski de Moura

Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, n ° 2350 - 2º andar.

CEP 90035-903, Bairro Santana, Porto Alegre, Rio Grande do Sul (RS) - Brasil.

E-mail: bruna.concheski@gmail.com

**Conflict of interest:** The authors declare no competing interests.

**Clinical Trial Registration Number:** ClinicalTrials.gov ID: NCT0346782.

**Ethical approval:** This study was approved by the ethics committee of HCPA Research Ethics Committee, number 19-0289. All patients provided written participation consent before study inclusion.

**Abstract:**

**Introduction:** Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) has been associated with changes in intestinal permeability since, through the enterohepatic circulation, the products pass through the impaired intestinal barrier and reach the liver. Our objective was to evaluate the effect of a probiotic mix supplementation on serum levels of Claudin-3 (CLD-3) as a marker of intestinal permeability in patients with NASH.

**Methods:** This double-blind, randomized clinical trial included adult outpatients with biopsy-proven NAS  $\geq 4$ , according to the *NASH Clinical Research Network NAFLD activity score* (NAS). The patients were divided into two groups, intervention and placebo. The intervention consisted of 24 weeks of supplementation with a daily intake of 2 sachets containing 1g of a probiotic mix (containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* e *Bifidobacterium lactis*,  $1 \times 10^9$  UFC in each strain) or placebo. After the intervention, the study evaluated dietary intake, nutritional status, laboratory data, and CLD-3 using the Generalized Estimating Equations (GEE) method to compare the parameters described above between the probiotic group and the placebo group. The significance level adopted was  $p < 0.05$ .

**Results:** Forty-four patients with a mean age of 51 years completed the trial. Of these, 27 were male. Eighty-seven percent of participants had early stages of fibrosis, classified as F0 or F1. Baseline levels of CLD-3 between groups were similar at baseline. However, at the end of 24 weeks, there was a reduction in serum CLD-3 levels in the Probiotic (14,7 ng/mL to 6,1 ng/mL) and Placebo groups (16,7 ng/mL to 6 ng/mL), both with  $p < 0,01$ . No change was observed due to the effect of supplementation with probiotics. As for the diet, there was a reduction in the consumption of total calories, carbohydrates, proteins, and fats throughout the study ( $p < 0,05$ ), with no difference between groups. Over the 24 weeks, there were no changes in weight or waist circumference.

**Discussion:** CLD-3 significantly reduced in patients with NASH during the intervention period. However, no change was observed due to the effect of supplementation with probiotics.

**Keywords:** Claudin-3, NASH, Intestinal permeability, Probiotics

## **Introduction**

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common manifestation of chronic liver diseases, with non-alcoholic steatohepatitis (NASH) being its progressive form, characterized by the presence of damage to hepatocytes, necroinflammation, and according to the evolution of the disease, signs of fibrosis appear as a natural response to lesions.<sup>1,2</sup> Studies indicate a significant increase in the prevalence of NASH between the years 2015 and 2030.<sup>3</sup> The underlying pathway in which NASH progression occurs is not yet clear, several factors seem to be related to this pathogenesis<sup>1</sup>.

Claudin-3 (CLD-3) is a transmembrane protein subunit with other junctional complex proteins, forming the Tight Junctions (TJ) that seal the paracellular space. Intestinal dysbiosis involves the rupture of TJ, junctions of the intestinal barrier, increasing intestinal permeability (IP).<sup>4,5</sup> Elevated serum concentrations of CLD -3, therefore, indicate adhesion junction dysfunction and an increase of IP.<sup>6,7,8</sup> A more permeable intestine allows the passage of bacteria and by-products via the portal circulation to the liver, such as lipopolysaccharide (LPS) responsible for inducing the activation of toll-like receptors (TLR), including TLR-4 hepatic. Through this mechanism, the production of pro-inflammatory cytokines begins, an ideal environment for activating an inflammatory cascade, a necessary subsidy for the development of NASH .<sup>9,10,11,12</sup> The intestine-liver axis relationship seems to play an important role in the development of NASH. Certain studies explore this relationship.<sup>13,14,9,15,16,17,18</sup>

The exact pathway that allows the increased permeability and NAFLD progression is not clear yet. However, there seems to be a clinical connection in this relationship with more significant disease progression and development of NASH.<sup>19</sup> Therapeutic strategies aimed at modulating the gut microbiota with an effect on the preservation or restoration of the integrity of the intestinal barrier in patients with NASH can bring benefits for their treatment.

Thus, supplementation with probiotics could benefit the intestinal microbiota, providing more excellent resistance against pathogens through the diversity of microbes to avoid an environment weakened by dysbiosis.<sup>20</sup> Patients with metabolic diseases are more likely to reduce bacterial diversity growth of the intestinal microbiome. For this reason, the investigation of probiotics' potential as feasible preventive and therapeutic agents is on the rise.<sup>21</sup> Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of probiotic mix supplementation on serum levels of CLD -3 as a marker of intestinal permeability in patients with NASH.

## **Methods**

Study of single-center, randomized, double-blind, placebo-controlled that included adult patients with NASH treated at an outpatient clinic of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil This study is part of a larger study aimed at evaluating the effects of probiotic supplementation about the structure of the liver in patients on NASH. The trial protocol and study design have been previously described PROBILIVER clinical trial.<sup>22</sup> The study was registered in the Clinical Trials Registry (ClinicalTrials.gov ID: NCT0346782) and conducted in accordance with the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki.

Were included adults over 18 years of age, diagnosed with NASH by liver biopsy, according to the NASH Clinical Research Network NAFLD activity score (NAS). Patients with  $NAS \geq 4$  were included, regardless of fibrosis, in absence of any secondary cause for steatosis based on the American Association for the Study of Liver Diseases, including the history of alcohol use with daily consumption above 30g of ethanol for men and 20g for women, hemochromatosis or Wilson disease, history of using the hepatotoxic drugs as methotrexate, amiodarone, tamoxifen, corticosteroids, valproate and antiviral drugs, patients with human immunodeficiency virus, hepatitis B virus or hepatitis C virus infection, pregnancy, liver



transplantation, cirrhosis, in nutritional monitoring or consumption of supplements and foods containing probiotics, use of immunosuppressant; antibiotic in the previous 6 months prior to trial, and with any other chronic inflammatory diseases were excluded

### **Intervention**

The study allocated the eligible patients through a randomization list made by the WINPEPI version 11.5 program and divided them into probiotics (PROB) and Placebo (PLAC) groups. The PROB group received supplementation of probiotic mix, each sachet consisted of *Lactobacillus acidophilus* ( $1 \times 10^9$ UFC) + *Lactobacillus rhamnosus* ( $1 \times 10^9$ UFC) + *Lactobacillus paracasei* ( $1 \times 10^9$ UFC) + *Bifidobacterium lactis* ( $1 \times 10^9$ UFC), The patients allocated to the PLAC group received sachets with physical and organoleptic characteristics identical to the PROB group, however containing polydextrose/maltodextrin as the placebo. Patients were instructed to ingest two sachets daily with room temperature water for a period of 24 weeks. The participants previously received a spreadsheet to control sachet ingestion. Non-compliance more significant than 10% of sachets was considered a loss. Patients and researchers directly involved in the study were unaware of the supplement sachet composition and the allocation of patients to the treatment groups. An outside researcher was not blind. Blinding was only broken after the data analysis was completed.

Throughout the study, patients did not receive nutritional monitoring and were advised not to make any changes in diet, lifestyle habits, or physical activity level. They were also instructed not to use any other type of probiotic or start new medications.

### **Claudin-3**

For evaluating the intestinal permeability marker used, patients should fast for 12 hours to collect blood for Claudin-3 analysis before and after the intervention.

After centrifuging the samples (for 10 minutes at 2500 rpm) to obtain the serum, they were stored in a freezer at -80°C. The analysis of the serum concentration of Claudin-3 was performed using the ELISA technique (MyBioSource, Inc, San Diego, USA). A spectrophotometer evaluated the absorbance at a wavelength of 450 nm (Zenyth 200 rt), and the results were expressed in ng / mL. The evaluation followed the manufacturer's instructions, and the analyses were duplicated.

### **Dietary, alcohol consumption, and physical activity assessment**

Participants had to fill out a three-day Food Record, two days a week in-between, and one day on the weekend, before and after the intervention.<sup>23</sup> All records were reviewed with the patients to describe in detail food composition and portion. The underreport of consumption was identified when the calories (kcal) found in the mean intake calculation were lower than the Basal Metabolism Rate (BMR).<sup>24</sup> Patients with a record containing a difference  $\geq 20\%$  lower than BMR did not participate in the food intake analysis, possibly due to underreporting. BMR assessment for eutrophic, overweight, and obese individuals was based on basal energy expenditure (BEE).<sup>25</sup> The calculation of calories and nutrients from the records was performed using the mean values of the three days of food record by the Nutribase® 2007 (Clinical Nutritional Manager v.7.14; Cybersoft Phoenix, AZ, USA).

Alcohol consumption was assessed by the “Alcohol Use Disorder Identification Test (AUDIT)” questionnaire, consisting of 10 items that score from 0 to 40 points in the parameters of alcohol intake, alcohol dependence, and problems related to alcohol consumption.<sup>26</sup> In the

presence of alcohol consumption, the values were converted into g of ethanol from the following calculation:  $\text{g ethanol} = [(\text{beverage volume in ml} \times \text{alcohol content}) / 100] \times 0,8$  (ethanol density).

Physical activity was assessed using the International Physical Activity Questionnaire – short version, Form (IPAQ) and expressed as the metabolic equivalent of the task (METs) in minutes per week.<sup>27</sup>

### **Anthropometric assessment and body composition**

The anthropometric measures used to assess nutritional status based on the Body Mass Index (BMI) were: patients' body weight (with light clothing, no shoes or accessories) obtained using a Flillizola® anthropometric scale, registered with the approximation of 100g. Height measured by a stadiometer of 0,1 cm precision, patient barefoot in orthostatic position, and waist circumference, measured at the midpoint between the last rib and the iliac crest, using a fiberglass measuring tape.

### **Metabolic Syndrome (MS) Classification**

For the MS diagnosis, the study considered the presence of at least three of the five following criteria: Waist circumference >88cm for women and >102cm for men; Triglycerides  $\geq 150$  mg/dL or under drug treatment; HDL cholesterol < 40 mg/dL for men and < 50 mg/dL for women or under drug treatment for both; Systolic Blood Pressure:  $\geq 130$  mmHg, Diastolic  $\geq 85$  mmHg, or both, or under drug treatment; Blood glucose  $\geq 100$  mg/dL or under drug treatment. The presence of at least three risk factors defines a diagnosis of metabolic syndrome according to the consensus IDF/AHA/NHLBI.<sup>28</sup>

The diabetes mellitus and systemic arterial hypertension diagnosis occurred through the parameters described above or data collection through the patient's electronic medical record associated with drug treatment.

### **Statistical analysis**

Quantitative variables are described as mean and standard deviation or median (25th and 75th percentile). Distribution was evaluated using histogram and QQplot graphs. An independent T-test and Chi-square test were performed to verify the existence of differences between groups at baseline. The Generalized Estimating Equations (GEE) method was used to compare both groups, supplemented with probiotics and placebo, before and after the intervention. The significance level adopted was  $p < 0.05$ . All analyses were performed via PASW Statistics for Windows, version 18.0.<sup>29</sup>

### **Results**

Figure 1 shows the selection and monitoring flowchart of the participants. Of the forty-six patients included in the process, forty-four completed the clinical trial - there was a 4% loss over the intervention-, and forty-four completed the clinical trial.

Participants had a mean age of 51 years and a BMI between 23,72 – 45,03 kg/m<sup>2</sup>. Table 1 shows clinical, demographic characteristics, and baseline serum Claudin-3 concentration. Compliance for supplement consumption was 98,51% in the PROB group and 99,10% in the PLAC group ( $p = 0,525$ ). Six patients in the PLAC group and four in the PROB group took antibiotics during the study ( $p = 0,091$ ). One patient in the intervention group was considered non-adherent, with a sachet ingestion rate of 81.5%. Patients reported no adverse complications. The groups did not differ significantly at baseline.

Table 2 shows the intervention results, time effect, and between-group comparisons for CLD-3, diet, physical activity, and body composition. CLD-3 significantly reduced in both groups ( $p < 0,001$ ) compared to basal values, illustrated in Figure 2. No effect of the PROB group concerning PLAC was identified ( $p = 0,26$ ). The same results occurred for the total intake of calories, carbohydrates, fats, and proteins, which decreased significantly after 24 weeks. However, no changes were observed due to the effect of probiotic supplementation. After the intervention, both groups BMI values and physical activity levels did not differ significantly from baseline.

## **Discussion**

In this study, we evaluated the serum level of Claudin-3 as a marker of intestinal permeability in patients with NASH before and after supplementation with 2g/day of a probiotic mix for 24 weeks. CLD-3 in patients with NASH reduced significantly during the intervention period. However, no change was observed due to the effect of probiotic supplementation.

Currently, studies that use CLD-3 as a IP marker analyze values found in various comorbidities in contrast to healthy patients since, to date, there are no cutoff values for categorizing CLD-3. In our trial, we presented results of serum CLD-3 in patients diagnosed with pre-intervention NASH ( $15,7 \pm 6,02$  ng/mL). Whang et al.<sup>30</sup> demonstrated serum CLD-3 values in several liver diseases (44,6; 76,2 ng/mL) for the compensated and decompensated cirrhosis group, respectively, and 4,8 ng/mL for the healthy control group. It is evident that with the severity of the disease, the circulating serum levels of CLD-3 increase. Yeh et al.<sup>31</sup> used CLD-3 as a biomarker of intestinal permeability to assess the gastrointestinal response to intense exercise in hot and cold environments in healthy participants and found a baseline value of 6,6 ng/mL in the assessed public.

Metabolic diseases are often associated with dysbiosis, increasing permeability, thus permitting more microbial pathogens to flow into the circulation.<sup>32</sup> A more permeable bowel appears to be involved in the pathogenesis of NASH, as demonstrated in clinical and experimental trials<sup>13,14,9,15,16,17,18</sup>. It is a fact that the presence of metabolic diseases impairs IP, and there is a clinical relationship in the progression of NASH. Our sample has characteristics that can help elucidate such a relationship due to its patients profile, with a high prevalence of metabolic syndrom, systemic arterial hypertension, diabetes mellitus, and obesity. As far as we know, clinical studies evaluating probiotic supplementation and intestinal permeability in NASH patients are scarce, and the mechanisms are not precisely understood. Knowledge about the precursor to intestinal barrier dysfunction and what prevents or restores it is yet limited.<sup>33</sup>

Our findings lead us to believe that a probiotic mix supplementation could not alter serum levels of CLD-3 and indirectly intestinal permeability in the sample evaluated. We found no significant difference in CLD-3 reduction with probiotic supplementation compared to the PLAC group. Other clinical trials in humans have also reported a lack of effects of probiotic supplementation or symbiotics on intestinal permeability measured with other IP markers. Ferolla et al.<sup>16</sup> evaluated, through urinary excretion of lactulose/mannitol, the IP of patients with NASH after supplementation with symbiotics for three months, without identifying any effect on the intervention. Macnaughtan et al.<sup>34</sup> analyzed the IP of patients with compensated cirrhosis from the lactulose/rhamnose test before and after the intervention with the probiotic *Lactobacillus casei* Shirota for six months, with no change in the period evaluated. The clinical trial by Horvath et al.<sup>35</sup>, with probiotic supplementation for six months, did not identify any influence on the IP of patients with cirrhosis based on the lactulose-mannitol tests; serum diamine oxidase; zonulin, and fecal calprotectin. In contrast to these results, animal studies show positive results with the probiotic supplementation in the restoration of IP in models of liver disease. Despite the limitations regarding the expectation of performing the same effect in

humans, the method allows controlling the variables, enabling the reduction of subjectivity in data measurement. The study by Bruch-Bertani et al.<sup>36</sup> reported the effects of supplementation with the probiotic *rhamnosus* GG in an experimental model of alcoholic liver disease through gene expression of intestinal markers *cldn-c*, *cldn15a*, *cldn15b*, and *JAM f11r* in zebrafish. After intervention with probiotics, the group identified higher gene expression of the markers, reflecting in lower IP.

The measurement of CLD-3 can occur directly through the histological evaluation of the intestine and indirectly through blood or urine samples. Although direct determination is the ideal evaluation method, with high specificity, it is an invasive technique that offers a disadvantage in the *in vivo* evaluation. The interpretation of the results found in the direct analysis of CLD-3 is inversely proportional to IP; hypothetically, the greater the expression of CLD-3 in the tissue evaluated, the lower the IP. Unlike indirect valuation. Models of indirect measurement of IP are less uncomfortable for the patient and usual in clinical trials.<sup>37</sup>

The mechanism by which follow-up during the intervention time reduced CLD-3 is not precise. The PROB and PLAC groups were not under nutritional monitoring. To assess the probiotic effect, they were told not to change their lifestyle during the trial period, such as changes in eating habits, physical activity, and drug treatment. However, there was a reduction in total calories in both groups, carbohydrates, proteins, and fats consumption over the intervention period. The influence of diet on intestinal permeability needs further investigation. So far, the results are controversial. For twelve months, Damms-Machado et al.<sup>38</sup> applied a multidisciplinary weight loss program involving dietary modifications in obese patients, with or without hepatic steatosis. Lifestyle modification and weight reduction provided beneficial effects on the IP analyzed through fecal zonulin and oral lactulose and mannitol test. Biolato et al.<sup>39</sup> submitted NAFLD patients to a standard Mediterranean or hypocaloric diet for 16 weeks in conflict with these findings. It revealed a reduction in visceral obesity, weight and serum

transaminase profile. However, there was no significant effect on intestinal permeability. Pendyala et al.<sup>40</sup> demonstrated a significant increase in plasma levels of endotoxin, with an intervention model through the offer of a Western-style diet in healthy patients for one month. A control diet reducing endotoxemia demonstrated inversely proportional results. However, knowledge about the extent to which these dietary modifications are beneficial is still limited, and the specific mechanisms involved are unclear.

We reinforce essential aspects of our study, such as its design (a randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial), the dose of probiotic, the duration of treatment, and the inclusion of patients with a biopsy-proven NASH diagnosis. As a limitation, we have low severity of NASH patients included. We did not evaluate other subunits of Claudin that could reinforce the results found. CLD-3 is a protein produced by epithelial cells, despite being used as an IP marker in previous studies. In our study, we measured the serum concentration of CLD-3 through the systemic level, not being an isolated and specific exposure of the intestine.

In conclusion, this clinical trial demonstrated baseline values of CLD-3 as a marker of intestinal permeability. Supplementation with a mix of probiotics during the intervention period could not reduce intestinal permeability in patients with NASH. Studies with longer follow-up are necessary to validate CLD-3 as a marker of intestinal permeability.

### **Funding**

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



## **Acknowledgments**

The authors would like to thank the Farmoquímica (FQM), for supplying the probiotic and placebo, Research Incentive Fund of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, CNPq (National Counsel of Technological and Scientific Development) and CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel) for financial support.

## Referências Artigo

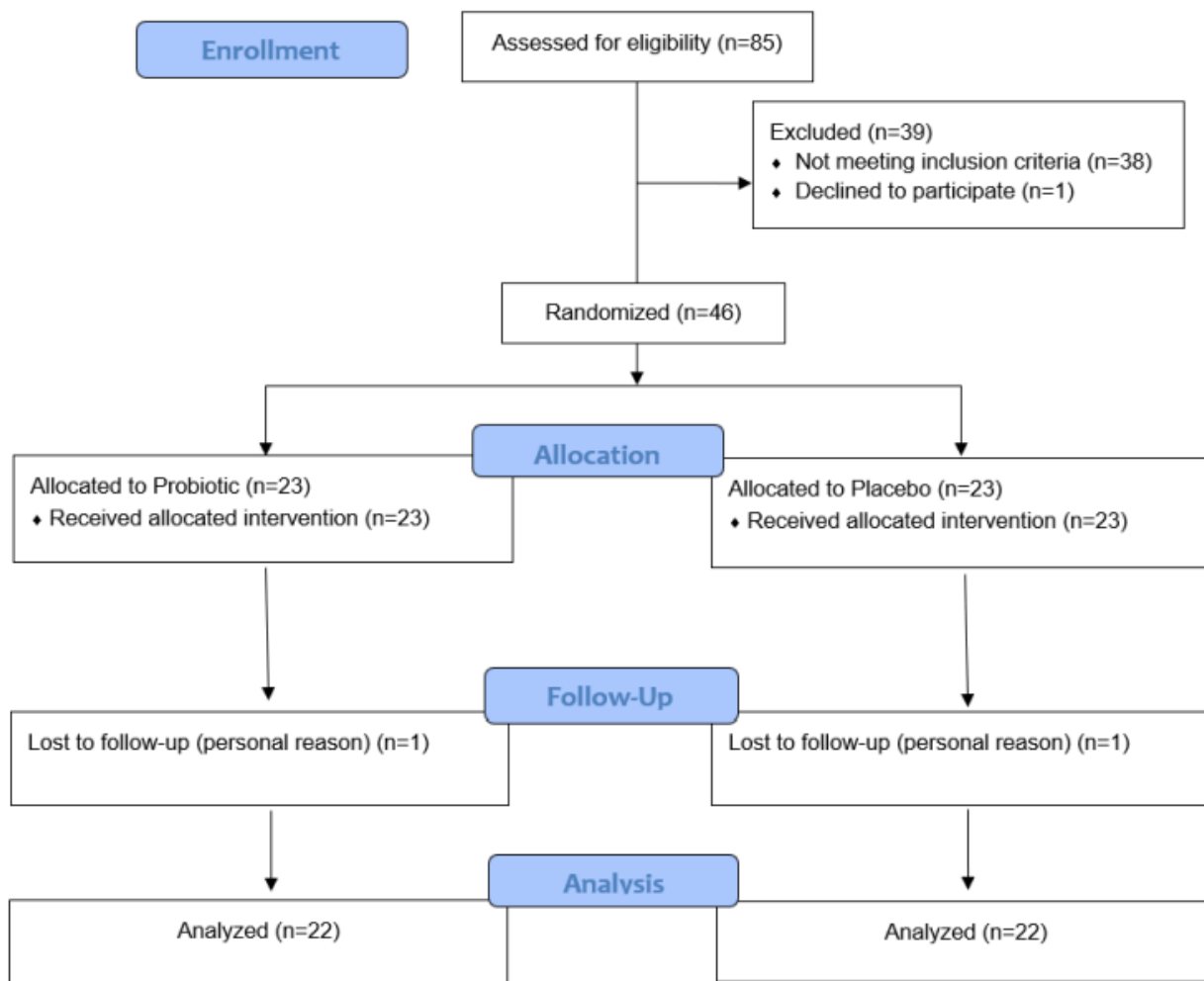
1. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2018;67(1):328–57
2. *EASL-EASD-EASO*. Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*. 2016; 64(6): 1388-402.
3. Estes C, Razavi H, R Loomba, Younossi Z, Sanyal AJ. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology*. 2018; 67(1): 123-133.
4. Albillos A, de Gottardi A, Rescigno M. The gut-liver axis in liver disease: Pathophysiological basis for therapy. *Journal of Hepatology*. 2020; 72(3): 558-577.
5. Chopyk DM, Grakoui A. Contribution of the Intestinal Microbiome and Gut Barrier to Hepatic Disorders. *Gastroenterology*. 2020; 159 (3): 849-863.
6. Balda MS, Matter K. Tight junctions as regulators of tissue remodelling. *Current Opinion in Cell Biology*. 2016; 42: 94-101.
7. Garcia-Hernandez V, Quiros M, Nusrat A. Intestinal epithelial claudins: expression and regulation in homeostasis and inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2017; 1397: 66-79.
8. Assunção R, Alvito P, Kleiveland CR, Lea TE. Characterization of in vitro effects of patulin on intestinal epithelial and immune cells. *Toxicology Letters*. 2016; 250-251: 47-56.

9. Fukui H. Increased Intestinal Permeability and Decreased Barrier Function: Does It Really Influence the Risk of Inflammation? *Inflammatory Intestinal Diseases*. 2016; 1(3): 135-145.
10. Bluemel S, Williams B, Knight R, Schnabl B. Precision medicine in alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease via modulating the gut microbiota. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2016; 311(6): 1018-1036.
11. Thuy S, Ladurner R, Volynets V, *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease in humans is associated with increased plasma endotoxin and plasminogen activator inhibitor 1 concentrations and with fructose intake. *Journal of Nutrition*. 2008; 138: 1452–1455.
12. Roh Y-S, Seki E. Toll-Like Receptors in Alcoholic Liver Disease, Non-Alcoholic Steatohepatitis and Carcinogenesis. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2013; 28(01): 38-42.
13. Arab J, Arrese M, Trauner M. Recent Insights into the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2018; 13: 321-350.
14. Rinella M. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. *JAMA*. 2015; 313(22): 2263-2273.
15. Poeta M, Pierri L, Vajro P. Gut–Liver Axis Derangement in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Pacifico L, ed. Children*. 2017; 4(8): 66.
16. Ferolla S, Couto C, Costa-Silva L, *et al.* Beneficial Effect of Synbiotic Supplementation on Hepatic Steatosis and Anthropometric Parameters, But Not on

- Gut Permeability in a Population with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Nutrients*. 2016; 8(7): 397.
17. Luther J, Garber J, Khalili H, et al. Hepatic Injury in Nonalcoholic Steatohepatitis Contributes to Altered Intestinal Permeability. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*. 2015; 1(2): 222-232.
  18. Miele L, Valenza V, La Torre G, Montalto M, Cammarota G, Ricci R, Mascianà R, Forgione A, Gabrieli M, Perotti G. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2009; 49: 1877–1887.
  19. Chu H, Duan Y, Yang L, Schnabl B. Small metabolites, possible big changes: a microbiota-centered view of non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*. 2019; 68(2): 359-370.
  20. Hrnčir T, Hrnčířová L, Kverka M, et al. Gut Microbiota and NAFLD: Pathogenetic Mechanisms, Microbiota Signatures, and Therapeutic Interventions. *Microorganisms*. 2021;9(5):957.
  21. Bischoff S. Microbiota and aging. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2016; 19(1):26–30.
  22. Silva-Sperb A, Moraes H, De Moura B, Alves B, Bruch-Bertani J, Azevedo V, et al. Effect of probiotic supplementation in nonalcoholic steatohepatitis patients: PROBILIVER TRIAL protocol. *Trials*. 2019; 20(1):1–8.
  23. Willett W. *Nutritional Epidemiology*. 3rd ed. Oxford University Press, NY; 2013.
  24. Willett W, Stampfer M. Total energy intake: implications for epidemiologic analyses. *American Journal of Epidemiology*. 1986;124(1):17–27.

25. IOM. Dietary Reference Intakes (DRI's) for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids (Macronutrients). The National Academies Press, Washington. 2005.
26. Santos. Et al. Alcohol Use Disorder Identification Test (AUDIT): explorando seus parâmetros psicométricos. *J Bras Psiquiatr.* 2012;61(3):117-23.
27. Craig C, Marshall A, Sjostrom M, Bauman A, Booth M, Ainsworth B, et al. International Physical Activity Questionnaire : 12-Country Reliability and Validity. *Medicine & Science in Sport Exercise.* 2003;35(8):1381–95.
28. Alberti, KGMM. et al., Harmonizing the Metabolic Syndrome: A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation.* 2009;120:1640-1645.
29. SPSS Inc. Released 2009. PASW Statistics for Windows, Version 18.0. Chicago: SPSS Inc
30. Wang Z, Wang A, Gong Z, Biviano I, Liu H, Hu J. Plasma claudin-3 is associated with tumor necrosis factor-alpha-induced intestinal endotoxemia in liver disease. *Clinics and Research Hepatology and Gastroenterology.* 2019; 43(4): 410-416.
31. Yeh Y, Lei L, Lim C. Gastrointestinal response and endotoxemia during intense exercise in hot and cool environments. *CL European Journal of Applied Physiology.* 2013; 113(6): 1575-1583.
32. Assimakopoulos S, Triantos C, Maroulis I, Gogos C. The Role of the Gut Barrier Function in Health and Disease. *Gastroenterology Research.* 2018; 11(4): 261-263.

33. Bischoff SC. Gut health: a new objective in medicine? *BMC Medicine*. 2011; 14: 24.
34. Macnaughtan J, Figorilli F, García-López E, et al. A Double-Blind, Randomized Placebo-Controlled Trial of Probiotic *Lactobacillus casei* Shirota in Stable Cirrhotic Patients. *Nutrients*. 2020;12(6):1651.
35. Horvath A, Leber B, Schmerboeck B, et al. Randomised clinical trial: the effects of a multispecies probiotic vs. placebo on innate immune function, bacterial translocation and gut permeability in patients with cirrhosis. *Alimentary Pharmacol & Therapeutics*. 2016; 44(9): 926-935.
36. Bruch-Bertani J, Uribe-Cruz C, Pasqualotto A, et al. Hepatoprotective Effect of Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG Through the Modulation of Gut Permeability and Inflammasomes in a Model of Alcoholic Liver Disease in Zebrafish, *Journal of the American College of Nutrition*, 39:2, 163-170.
37. Bischoff S, Barbara G, Buurman W, et al. Intestinal permeability--a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterology*. 2014; 14: 189.
38. Damms-Machado A., Louis S., Schnitzer A., et al. Gut permeability is related to body weight, fatty liver disease, and insulin resistance in obese individuals undergoing weight reduction. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2017; 105(1) : 127–135.
39. Biolato M, Manca F, Marrone G, et al. Intestinal permeability after Mediterranean diet and low-fat diet in non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*. 2019; 25(4): 509-520
40. Pendyala S, Walker JM, Holt PR. A high-fat diet is associated with endotoxemia that originates from the gut. *Gastroenterology*. 2012; 142(5): 1100-1101



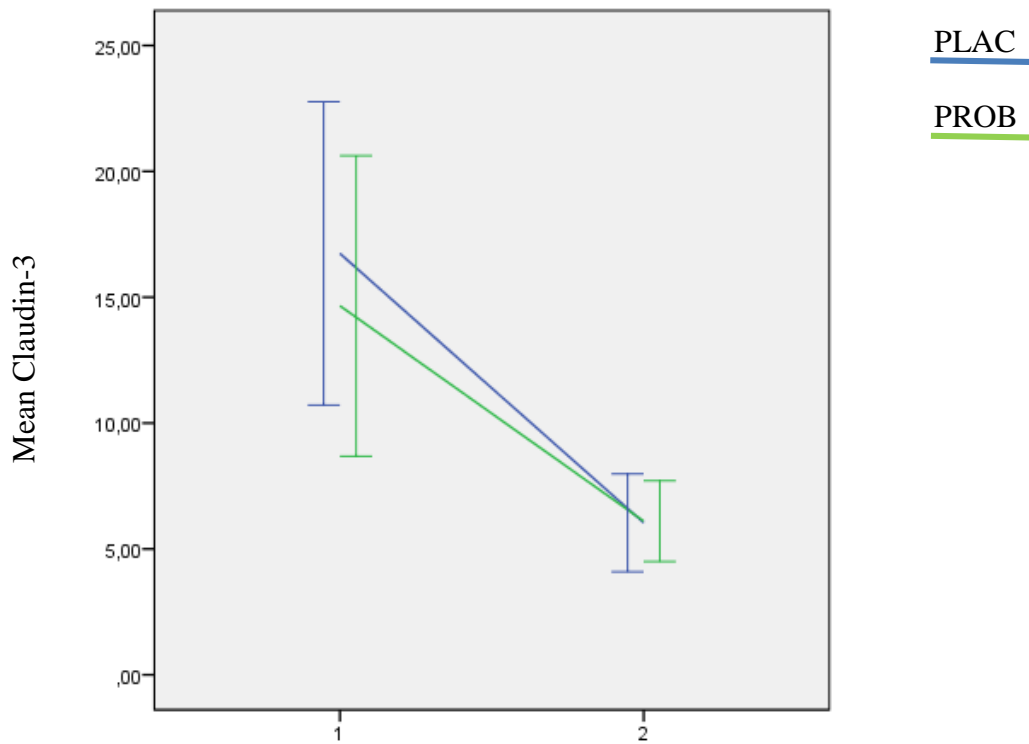
**Figure 1.** CONSORT flow chart detailing participants' recruitment, randomization and allocation.

**Table 1.** Clinical and demographic characteristics and serum Claudin-3 concentration in patients in the placebo and probiotics group at baseline.

	All patients (n=46)	Group PLAC (n=23)	Group PROB (n=23)	P
<b>Age</b>	51,35 ± 11,61	51,74 ± 11,94	50,95 ± 11,53	0,983
<b>Sex (M)</b>	27	12	15	0,369
<b>Degree of fibrosis</b>				
F0	12 (26%)	8 (34,8%)	4 (17,4%)	
F1	28 (61%)	12 (52,2%)	16 (69,6%)	0,376
F2	1 (2%)	0	1 (4,3%)	
F3	5 (11%)	3 (13%)	2 (8,7%)	
<b>BMI (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	32,34 ± 6,05	32,22 ± 5,49	32,46 ± 6,68	0,893
<b>BMI Adult</b>	(n=36)	(n=18)	(n=18)	
Eutrophy	2 (5,5%)	1	1	
Overweight	10 (27,8%)	4	6	
Obese I	14 (38,9%)	7	7	0,938
Obese II	5 (13,9%)	3	2	
Obese III	5 (13,9%)	3	2	
<b>BMI Elderly</b>	(n=10)	(n=5)	(n=5)	
Eutrophy	3 (30%)	2	1	0,490
Overweight	7 (70%)	3	4	
<b>Diabetes Mellitus</b>	22 (47,8%)	13 (56,6%)	9 (39,1%)	0,238
<b>Systemic arterial hypertension</b>	30 (65,2%)	14 (60,9%)	16 (69,6%)	0,536
<b>Metabolic syndrome</b>	35 (76%)	19 (82,6%)	16 (69,6%)	0,300
<b>Claudin-3 (ng/mL)</b>	15,7 ± 6,02	16,74 ± 6,02	14,66 ± 5,97	0,256

M, male; BMI, body mass index.





**Moment 1:** Baseline;  
**Moment 2:** After 24 weeks

Error Bars: +/- 1SD

**Figure 2.** Serum Claudin-3 concentration at baseline and after 24 weeks, PLAC group (Placebo) and PROB group (Intervention).

**Table 2.** Interaction of the intervention, time effect, and comparisons between groups of serum Claudin-3 concentration, food intake, body composition, and physical activity.

	<b>Baseline</b>	<b>After 24 weeks</b>	<b>p.I</b>	<b>p.T</b>	<b>p.G</b>
<b>Claudin-3 (ng / mL)</b>					
PROB	14,66 ± 5,97	6,11 ± 1,61	0,257	0,000	0,260
PLAC	16,74 ± 6,02	6,04 ± 1,95			
<b>Energy intake (kcal/day)*</b>					
PROB	2.244,05 ± 737,64	2.031,13 ± 817,68	0,548	0,003	0,919
PLAC	2.503,26 ± 1056,46	2.159,08 ± 554,20			
<b>Carbohydrates (g/day)*</b>					
PROB	259,83 ± 88,35	221,05 ± 94,30	0,184	0,005	0,701
PLAC	311,70 ± 135,65	249,78 ± 76,67			
<b>Protein (g /day)*</b>					
PROB	108,86 ± 40,69	84,93 ± 25,97	0,421	0,001	0,282
PLAC	109,63 ± 40,21	97,80 ± 25,83			
<b>Fat (g/day)*</b>					
PROB	99,81 ± 44,63	91,05 ± 52,34	0,967	0,032	0,701
PLAC	108,72 ± 61,65	87,62 ± 27,28			
<b>Cholesterol (mg/day)*</b>					
PROB	349,98 ± 154,99	293,90 ± 145,90	0,961	0,025	0,922
PLAC	352,07 ± 158,38	291,30 ± 106,01			
<b>Fibers (g/dia)*</b>					
PROB	20,49 ± 10,62	16,28 ± 7,05	0,133	0,192	0,303
PLAC	22,03 ± 10,59	21,41 ± 6,57			
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>					
PROB	32,46 ± 6,68	31,51 ± 4,25	0,899	0,776	0,870
PLAC	32,22 ± 5,49	32,43 ± 5,75			
<b>IPAQ (mets)</b>					
PROB	937 (300-2118)	773 (596-2712)	0,498	0,942	0,337
PLAC	1060 (299-1914)	934 (579-2810)			

BMI, body mass index; IPAQ, International Physical Activity Questionnaire; p.I, p of the results of the intervention; p.T, p of the follow-up time effect; p.G, p of the between-group comparisons.

\* n = 33.

## **8. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Neste ensaio clínico não foi possível demonstrar redução da permeabilidade intestinal através da redução dos níveis de claudina 3, após suplementação com mix de probióticos por 24 semanas em pacientes com EHNA. Apesar de todos os pacientes serem orientados a não modificarem seu estilo de vida no período do ensaio, como alterações de hábitos alimentares e prática usual de atividade física, ambos os grupos apresentaram redução de calorias totais, consumo de carboidratos, proteína e gordura ao longo do tempo de intervenção. A influência da dieta sobre a permeabilidade intestinal necessita ser mais explorada, o conhecimento sobre como tais modificações alimentares são benéficas à permeabilidade intestinal ainda é limitado e os mecanismos específicos envolvidos não estão claros. Idealmente seria necessário realizar estudos com este mesmo desenho mas por período maior de tempo para validar CLD-3 como marcador de permeabilidade intestinal juntamente com outros marcadores como diferentes subunidades de Claudina, proteínas do complexo juncional, LPS e TLR-4.

## **9. PERSPECTIVAS FUTURAS**

Avaliar mais detalhadamente a associação entre os fatores dietéticos e a permeabilidade intestinal, assim como a avaliação de outros marcadores de PI certamente seria de grande valia para elucidação dos resultados.

Todos os pacientes do estudo tiveram sua microbiota avaliada e as análises para sua interpretação está em andamento. A interação entre microbiota e permeabilidade poderá explicar nossos resultados e entender o quanto a suplementação com probióticos pode ter afetado a composição e diversidade da microbiota intestinal dos pacientes do estudo, especialmente no que tange a permeabilidade intestinal.

Por fim, uma análise individualizada, buscando compreender os mecanismos pelos quais alguns pacientes apresentam uma melhor resposta ao tratamento em detrimento de outros, seria de grande valia para futuramente traçar planos terapêuticos de maior precisão.

## ANEXOS

### Anexo I - REGISTRO ALIMENTAR

NOME: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Quantas pessoas na residência? \_\_\_\_\_ Idades? \_\_\_\_\_

Quantas participam das seguintes refeições:

Almoço: \_\_\_\_\_ Jantar: \_\_\_\_\_ ( ) lanche ( ) refeição

Óleo: 1 garrafa de óleo (900 mL) é suficiente para quantos dias? \_\_\_\_\_

Usa azeite para temperar salada? ( ) não ( ) sim. Quanto? \_\_\_\_\_

O objetivo da realização deste registro alimentar é conhecer suas preferências e hábitos alimentares e sua rotina diária.

Por estes motivos, é muito importante que o inquérito alimentar seja preenchido o mais detalhadamente possível, incluindo todos os alimentos sólidos e líquidos e quantidades ingeridas nos próximos três dias não consecutivos.

- Os líquidos devem ser medidos com xícara ou copo, registrando se grande, médio ou pequeno, ou, se possível, medir com copo graduado (ml).
- Para os alimentos sólidos, utilizar colher de sopa, sobremesa ou chá, ou ainda, concha.
- As frutas devem ser informadas em unidades (pequena, média ou grande), e, da mesma maneira, as bolachas.
- As saladas devem informar os vegetais que a compõem.
- Descrever o tipo de preparação (assado, grelhado, frito, cozido, à vapor, etc.).

Data do retorno: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Local: \_\_\_\_\_

EPA: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

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

Dia da semana: exemplo Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Horário	Alimento	Quantidade consumida
8:00	Leite semi-desnatado	meia xícara (75ml)
	Café sem açúcar	meia xícara (75ml)
	Pão de centeio	2 fatias grandes
	Queijo prato	1 fatia
	Margarina	2 pontas de faca
	Mamão	uma fatia pequena
10:30	Banana prata	uma unidade pequena
12:00	Arroz	4 colheres de sopa
	Feijão	4 colheres de sopa
	Bife de frango	uma unidade pequena
	Cenoura ralada	5 colheres de sopa
	Alface	5 folhas
	Óleo de Oliva	uma colher de chá
16:00	Leite desnatado	um xícara
	Nescafé	uma colher de cafezinho
	Cream Cracker	4 unidades
20:00	Guisado com moranga	três colheres de sopa
	Batata assada	2 médias
	Souflé de espinafre	3 colheres de sopa
	Salada de repolho	uma xícara

### REGISTRO ALIMENTAR- 1º DIA

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

Nome: \_\_\_\_\_

Dia da semana: \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Horário	Alimento	Quantidade consumida

### REGISTRO ALIMENTAR- 2º DIA

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

Nome: \_\_\_\_\_

Dia da semana: \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Horário	Alimento	Quantidade consumida



### REGISTRO ALIMENTAR- 3º DIA

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

Nome: \_\_\_\_\_

Dia da semana: \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Horário	Alimento	Quantidade consumida

## Anexo II - QUESTIONÁRIO INTERNACIONAL DE ATIVIDADE FÍSICA –

### VERSÃO CURTA

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_/\_\_\_\_ IDADE : \_\_\_\_\_ Sexo: F ( ) M ( )

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

Para responder as questões lembre que:  
atividades físicas **VIGOROSAS** são aquelas que precisam de um grande esforço físico e que fazem respirar **MUITO** mais forte que o normal  
atividades físicas **MODERADAS** são aquelas que precisam de algum esforço físico e que fazem respirar **UM POUCO** mais forte que o normal

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

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

dias \_\_\_\_\_ por **SEMANA** ( ) Nenhum

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

horas: \_\_\_\_\_ Minutos: \_\_\_\_\_

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

dias \_\_\_\_\_ por **SEMANA** ( ) Nenhum

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

horas: \_\_\_\_\_ Minutos: \_\_\_\_\_

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

dias \_\_\_\_\_ por **SEMANA**    ( ) Nenhum

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

horas: \_\_\_\_\_ Minutos: \_\_\_\_\_

Estas últimas questões são sobre o tempo que você permanece sentado todo dia, no trabalho, na escola ou faculdade, em casa e durante seu tempo livre. Isto inclui o tempo sentado estudando, sentado enquanto descansa, fazendo lição de casa visitando um amigo, lendo, sentado ou deitado assistindo TV. Não inclua o tempo gasto sentando durante o transporte em ônibus, trem, metrô ou carro.

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

\_\_\_\_\_ horas \_\_\_\_ minutos

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

\_\_\_\_\_ horas \_\_\_\_ minutos

## APÊNDICE

### Apêndice I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do Projeto: AVALIAÇÃO DE CLAUDINA-3 E LIPOPOLISSACARÍDEO COMO MARCADORES DE PERMEABILIDADE INTESTINAL EM PACIENTES COM ESTEATO-HEPATITE NÃO ALCOÓLICA PRÉ E PÓS INTERVENÇÃO COM SUPLEMENTAÇÃO DE PROBIÓTICOS.

Você está sendo convidado a participar desta pesquisa, pois já é participante dos projetos Efeito da Suplementação com Probióticos em Pacientes com Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica: Ensaio Clínico Randomizado (16-0438) e Avaliação de Obesidade Sarcopênica em Pacientes com Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica Pré e Pós Intervenção com Suplementação de Probióticos (17-0406).

O objetivo da presente pesquisa é avaliar em que medida ocorre a passagem de substâncias do intestino para outros tecidos antes e após o uso de probióticos em pacientes com Esteato-hepatite não alcoólica. O intestino de todas as pessoas tem a capacidade de ser permeável, ou seja, de permitir a passagem de substâncias do intestino para demais órgãos do corpo de forma adequada. Em pacientes com Esteato-hepatite não alcoólica (pessoas com gordura no fígado) esta passagem pode estar alterada, o que pode ser modificado pelo uso de probióticos (bactérias benéficas) que você está utilizando na pesquisa que já está participando.

Esta pesquisa está sendo realizada pelo Programa de Pós Graduação de Gastroenterologia e Hepatologia - UFRGS do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você aceitar participar da pesquisa, nós utilizaremos amostras de sangue já coletada e armazenada para analisar duas proteínas que informam o quanto o intestino pode ser permeável. Essas proteínas são chamadas de Claudina-3 e LPS. Portanto, essa pesquisa não inclui nenhum novo procedimento, apenas a autorização para análise de amostras já armazenadas. Além disso, acessaremos resultados de exames já realizados, como colesterol, triglicérides, glicose, insulina, hemograma e função renal. Caso você autorize, estes serão consultados diretamente do seu prontuário.

Não são conhecidos riscos ou desconfortos pela participação na pesquisa, já que se trata de uma avaliação do sangue armazenado, sem necessidade de uma nova coleta. Há uma pequena possibilidade de quebra de confidencialidade, que será minimizada pelos pesquisadores por meio do uso de códigos e não nome dos participantes.

O possível benefício decorrente da participação na pesquisa não é direto a você, mas os resultados da pesquisa poderão melhorar o conhecimento sobre permeabilidade intestinal relacionada ao uso de probióticos e beneficiar futuros pacientes.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição ou na participação nos demais estudos que você já faz parte.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

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

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

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Dra. Valesca Dall’Alba ou com a pesquisadora Bruna Concheski de Moura, pelo telefone (51) 33597313 ou ainda, pessoalmente na zona 15 do HCPA, quartas-feiras das 16-19h ou no Serviço de Nutrição, primeiro andar (3359-8410) ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

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

---

Nome do participante da pesquisa

---

Assinatura

---

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

---

Assinatura

Local e Data: \_\_\_\_\_