DIEGO CARDOSO BAIMA

**Avaliação da microbiota intestinal
em pacientes com DRGE erosiva e em
controles saudáveis assintomáticos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção de título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Professor Doutor Tomas Navarro
Rodriguez

São Paulo

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Baima, Diego Cardoso

Avaliação da microbiota intestinal em pacientes
com DRGE erosiva e em controles saudáveis
assintomáticos / Diego Cardoso Baima. -- São Paulo,
2020.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências em Gastroenterologia.
Orientador: Tomas Navarro Rodriguez.

Descritores: 1.Refluxo gastroesofágico
2.Microbiota intestinal 3.Metagenômica 4.Disbiose
5.Faecalibacterium 6.Clostridiaceae

USP/FM/DBD-177/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Janedson e Joyce, pelo apoio incondicional aos meus projetos pessoais e profissionais.

A meus irmãos e familiares, por sempre me motivarem e alegrarem.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado a vida e a felicidade.

A meus pais, que sempre foram exemplos de amor e cuidado.

A meu orientador Prof. Dr. Tomas Navarro-Rodriguez, que me acolheu, com os braços abertos, desde o início, incentivando em todos os momentos.

Ao Dr. Ricardo Correa Barbuti e Dr. Décio Chinzon, que estiveram sempre disponíveis para ajudar com grande sabedoria profissional, através de sugestões valiosas.

A Christiane Haro, Cláudia Arruda, Rosemeire, com seus zelosos trabalhos no controle de documentos, agendamentos, consultas, exames e palavras amigas. Agradeço por toda a paciência.

À equipe de endoscopia do CDG que abriu as portas, apoiando na realização de exames, sendo fundamental para o projeto.

À equipe do laboratório do Instituto de Medicina Tropical, Prof. Dra. Ester Cerdeira Sabino, Lucas Franco, Roberta Martins, que foram muito solícitos e de fundamental importância para a conclusão do projeto.

Aos meus colegas de pós-graduação, Nayara Salgado Carvalho, Ana Cristina de Sá Teixeira, que estiveram presentes para dar estímulo nessa empreitada.

A Vilma, pela disponibilidade em ajudar em todas as dificuldades e dúvidas na aplicação do projeto.

Aos meus pacientes, que concordaram em participar do trabalho, com grande coração e desejo de ajudar aos demais.

NORMATIZAÇÃO

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Doença do refluxo gastroesofágico	2
1.2 Microbiota gastrointestinal	5
1.3 Disbiose e a DRGE	13
1.3.1 Aumento da pressão intra-abdominal	14
1.3.2 Retardo do esvaziamento gástrico	14
1.4 Identificação da disbiose	16
1.4.1 Metagenômica	17
1.4.2 Medidas de biodiversidade microbiana	19
2 JUSTIFICATIVA	20
3 OBJETIVOS	22
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS	24
4.1 Período do estudo	25
4.2 Desenho do estudo	25
4.3 Sujeitos do estudo	25
4.4 Protocolo do estudo	27
4.5 Exame endoscópico	28
4.6 Aspectos éticos	29
4.7 Metagenômica	30
4.7.1 Sequenciamento automático	30
4.7.2 Amplificação de sequências-alvo	30
4.7.3 Purificação da biblioteca	31
4.7.4 Preparo do pool equimolar das bibliotecas amplificadas	32
4.7.5 PCR em emulsão	32
4.7.5.1 Preparo da solução de amplificação	32

4.7.6	Enriquecimento	33
4.7.6.1	Preparar a solução <i>Melt-Off</i>	33
4.7.6.2	Preenchimento da tira de reação do <i>Enrichment System (ES)</i>	33
4.7.7	Reação de sequenciamento	34
4.7.7.1	Preparo da amostra	34
4.7.7.2	Anelamento do “ <i>Sequencing Primer</i> ”	34
4.7.7.3	Ligação da polimerase	35
4.7.7.4	Carregamento do CHIP	35
4.7.8	Análise dos resultados do sequenciamento.....	35
4.8	Análise estatística.....	37
5	RESULTADOS.....	39
5.1	População do estudo.....	40
5.2	Análise metagenômica da microbiota das amostras fecais	41
5.3	Análise do grupo DRGE vs grupo controle.....	42
5.3.1	Análise da taxa de abundância relativa	46
6	DISCUSSÃO	69
7	CONCLUSÕES	84
8	REFERÊNCIAS.....	86

LISTAS

ABREVIATURAS

DRGE	Doença do refluxo gastroesofágico
EDA	Endoscopia digestiva alta
EEI	Esfíncter esofágico inferior
IBP	Inibidores de bomba de prótons
OTU	<i>Operational taxonomic unit</i> (Unidades Operacionais Taxonômicas)
TGI	Trato gastrointestinal

FIGURAS

Figura 1 -	Microbiota intestinal na fisiologia do hospedeiro	6
Figura 2 -	Fluxograma dos participantes incluídos no estudo	29
Figura 3 -	Curva de rarefação demonstrando o número estimado de Unidades Operacionais Taxonômicas (OTU, <i>operational taxonomic unit</i>) no grupo controle e no grupo da DRGE, em função do esforço de sequenciamento gerado através do <i>software</i> QIIME™ (<i>Quantitative Insights Into Microbial Ecology</i>)	42
Figura 4 -	Gráficos <i>boxplot</i> com índices de Shannon, de Simpson, da estimativa de riqueza de <i>Chao1</i> e número de espécies observadas, não sendo observada diferença estatisticamente significativa, na alfa-diversidade, entre os dois grupos	43
Figura 5 -	A – valor de p (ANOSIM)=0,870; B - valor de p (ANOSIM)=0,430. Unifrac. Análise da comunidade bacteriana, nas amostras, pelo método de análise das coordenadas principais (PCoA) não ponderada (A) e ponderada (B) nos grupos caso e controle	45
Figura 6 -	Abundância relativa e classificação taxonômica de Bacteria, em nível de filo, em amostras fecais obtidas de pacientes do grupo controle e da DRGE.....	48
Figura 7 -	Abundância relativa e classificação taxonômica de Bacteria, em nível de classe, em amostras fecais obtidas de pacientes do grupo controle e da DRGE.....	50
Figura 8 -	Abundância relativa e classificação taxonômica de Bacteria, em nível de ordem, em amostras fecais obtidas de pacientes do grupo controle e da DRGE.....	54

- Figura 9** - Abundância relativa e classificação taxonômica de Bacteria, em nível de família, em amostras fecais obtidas de pacientes do grupo controle e da DRGE..... 60
- Figura 10** - Gráfico *boxplot* com abundância relativa da família *Clostridiaceae* do grupo controle e grupo da DRGE, com diferença estatisticamente significativa (0,3% versus 2,0%, $p = 0,032$)..... 61
- Figura 11** - Abundância relativa e classificação taxonômica, em nível de gênero, em amostras fecais obtidas de pacientes do grupo controle e da DRGE..... 67
- Figura 12** - Gráfico *boxplot* com abundância relativa do gênero *Faecalibacterium* do grupo controle e grupo da DRGE, com diferença estatisticamente significativa (10,5% versus 4,5%, $p = 0,045$)..... 68

TABELAS

Tabela 1 - Dados sociodemográficos	40
Tabela 2 - Alfa-diversidade medida através dos índices de Shannon, de Simpson, da estimativa de riqueza de <i>Chao1</i> e número de espécies observadas	43
Tabela 3 - Estatísticas descritivas do <i>filo</i> considerando mediana e percentis 25 e 75 para casos e controle e nível descritivo da estatística baseado no teste de Mann-Whitney.....	47
Tabela 4 - Estatísticas descritivas de <i>classe</i> considerando mediana e percentis 25 e 75 para casos e controle e nível descritivo da estatística baseado no teste de Mann-Whitney.....	49
Tabela 5 - Estatísticas descritivas de <i>ordem</i> considerando mediana e percentis 25 e 75 para casos e controle e nível descritivo da estatística baseado no teste de Mann-Whitney.....	51
Tabela 6 - Estatísticas descritivas de <i>família</i> considerando mediana e percentis 25 e 75 para casos e controle e nível descritivo da estatística baseado no teste de Mann-Whitney.....	55
Tabela 7 - Estatísticas descritivas de <i>gênero</i> considerando mediana e percentis 25 e 75 para casos e controle e nível descritivo da estatística baseado no teste de Mann-Whitney.....	62

RESUMO

Baima DC. *Avaliação da microbiota intestinal em pacientes com DRGE erosiva e em controles saudáveis assintomáticos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

Introdução: A doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) é uma das enfermidades mais comuns na prática clínica e possui fisiopatologia multifatorial. Disbiose da microbiota intestinal pode ter influência em mecanismos envolvidos nesta doença, como mudanças nos padrões motores gastrointestinais, elevação da pressão intra-abdominal e aumento da frequência de relaxamentos transitórios do esfíncter esofágico inferior. Contudo, a avaliação da microbiota intestinal, neste contexto, ainda é pouco documentada. Este estudo avaliou a microbiota bacteriana intestinal, em indivíduos com doença do refluxo gastroesofágico erosiva e em indivíduos saudáveis, utilizando técnicas de metagenômica. **Métodos:** Estudo incluiu amostras fecais de 22 adultos, com idades entre 18 e 60 anos: 11 com esofagite erosiva (oito homens e três mulheres) e 11 controles saudáveis (dez homens e uma mulher). Os pacientes foram orientados a coletar e armazenar o material fecal em tubo contendo solução de guanidina. O DNA da microbiota foi extraído das amostras de fezes e amplificação por PCR foi realizada usando iniciadores para a região V4 do gene 16S rRNA. Os *amplicons* foram seqüenciados usando a plataforma Ion PGM Torrent e os dados foram analisados usando o software QIIME™ versão 1.8 (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*). Análise de estatística foi realizada se utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney e o teste ANOSIM, método não paramétrico baseado em matriz de distância. **Resultados:** Os índices de alfa-diversidade e beta-diversidade foram semelhantes entre os dois grupos, sem diferença estatisticamente significativa. Não houve diferença estatisticamente significativa no nível de filo, classe e ordem. Entretanto, observou-se diferença estatisticamente significativa na abundância da família *Clostridiaceae* (0,3% versus 2,0%, $p = 0,032$) e no gênero *Faecaliumbacterium* (10,5% versus 4,5%, $p = 0,045$) entre controles saudáveis e pacientes com DRGE erosiva, respectivamente. **Conclusões:** Os achados sugerem que menor abundância do gênero *Faecaliumbacterium* e maior abundância da família *Clostridiaceae*, nos pacientes com DRGE, podem influenciar na fisiopatologia desta doença.

Descritores: Doença do refluxo gastroesofágico; Microbiota intestinal; Metagenômica; *Faecalibacterium*; *Clostridiaceae*

ABSTRACT

Baima DC. *Assessment of the intestinal microbiota in patients with erosive gastroesophageal reflux disease and in asymptomatic healthy controls* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2020.

Background: The pathophysiology of Gastroesophageal Reflux Disease (GERD) involves several mechanisms. Intestinal dysbiosis may influence factors involved in the pathophysiology of Gastroesophageal Reflux Disease, such as changes in gastrointestinal motor patterns and increased intraabdominal pressure due to increased fermentation of non-digestible carbohydrates. However, few studies have focused on assessment of gut microbiome in the GERD. In this study, we investigated intestinal microbiomes, in individuals with Gastroesophageal Reflux Disease and healthy individuals, using metagenomic techniques. **Methods:** We performed a study comprising fecal samples of 22 adults, aged 18-60 years: 11 with erosive esophagitis (eight male and three female) and 11 healthy controls (ten male and one female). Patients were instructed to collect and store fecal material in a tube containing guanidine solution. Microbiome DNA was extracted from stool samples, and PCR amplification was performed using primers for the V4 region of the 16S rRNA gene. The amplicons were sequenced using the Ion PGM Torrent platform, and data were analyzed using QIIME™ software version 1.8 (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*). Statistical analysis was performed using the non-parametric Mann-Whitney test and the ANOSIM test, a nonparametric method based on distance matrix. **Results:** There was no statistically difference in alpha-diversity and beta-diversity between the two groups. There was no statistically significant difference at the phylum level. However, a statistically significant difference was observed in the abundance of the family *Clostridiaceae* (0,3% versus 2,0%, $p=0,032$) and of the genus *Faecaliumbacterium* (10,5% versus 4,5%, $p=0.045$) between healthy controls and individuals with erosive GERD. **Conclusion:** Our findings suggest that lower abundance of the genus *Faecalibacterium* and greater abundance of the *Clostridiaceae* family in patients with GERD may influence the pathophysiology of this disease.

Descriptors: Gastroesophageal reflux disease; Intestinal microbiota; Metagenomic; *Faecalibacterium*; *Clostridiaceae*.

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença do Refluxo Gastroesofágico

A doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) é condição comum, com sua prevalência podendo alcançar de 10 a 20% no mundo ocidental, com espectro de sintomas que podem ser esofágicos (pirose, regurgitação, odinofagia, disfagia, dor torácica não-cardíaca) ou extraesofágicos (tosse crônica, pigarro, rouquidão, aftas, erosões dentárias). Na ausência de sintomas de alarme, os sintomas considerados típicos (pirose e regurgitação) podem permitir que se faça diagnóstico presuntivo em torno de 40% dos casos ^(1, 2). Em determinadas situações, são necessários outros exames para confirmar o diagnóstico, como a Endoscopia Digestiva Alta (EDA) e/ou a pHmetria de 24 horas, bem como para avaliar as complicações ou etiologias alternativas para os sintomas, sendo suas complicações esofagite erosiva, estenose péptica, esôfago de Barrett, adenocarcinoma esofágico e alterações pulmonares ^(1, 3).

A exposição ácida ao epitélio esofágico foi estabelecida como principal desencadeador de pirose na DRGE. Instilação intra-esofágica de soluções, com o aumento do pH, foi realizada em estudo em que todos os pacientes apresentaram dor com soluções de pH 1,0 e 1,5, 80% tiveram dor com soluções de pH 2,0 e 50% tiveram dor com soluções de pH 2,5 a 6,0 ⁽⁴⁾.

A fisiopatologia da DRGE é multifatorial e depende da barreira antirrefluxo (esfíncter esofágico inferior e diafragma crural íntegros), da adequada depuração esofágica (ação da gravidade, peristalse e salivação), da resistência da mucosa esofágica e do esvaziamento e pressão intragástricos ⁽⁵⁾. Os mecanismos fisiopatológicos mais importantes são o aumento da frequência de relaxamentos transitórios do esfíncter esofágico inferior (EEI), hipotonia do EEI, elevação da pressão intra-abdominal e a hérnia de hiato ⁽⁶⁾.

Outros fatores podem influenciar na sintomatologia, como o volume do material refluído para o esôfago, visto que o aumento do mesmo pode ser importante por elevar a quantidade total de substâncias prejudiciais altamente concentradas, quer pela exposição prolongada da mucosa distal devido ao clareamento mais lento, quer pela extensão para as áreas mais proximais. Além disso, o volume por si só pode ser relevante devido à distensão do esôfago ⁽⁷⁾.

A terapêutica da DRGE pode envolver medidas comportamentais, terapia farmacológica e terapêutica cirúrgica. Os objetivos do tratamento são alívio dos sintomas, cicatrização das lesões e prevenção de recidivas e complicações. É importante que o paciente saiba que ele é portador de uma doença crônica que exigirá mudanças nos hábitos alimentares e comportamentais ⁽⁸⁾.

O tratamento farmacológico envolve a supressão de ácido que pode ser conseguido com antiácidos, antagonistas dos receptores de histamina ou inibidores da bomba de prótons (IBP). As drogas com maior eficácia são os

inibidores de bomba de prótons (IBP) devido à sua maior capacidade inibitória da produção ácida (omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, rabeprazol, esomeprazol e dexlansoprazol) ^(9, 10).

O tempo ideal da terapêutica da DRGE é de 4 a 8 semanas, podendo se estender até 12 semanas. Doses habituais de IBP são suficientes para cicatrizar cerca de 80% a 99% dos pacientes. As esofagites erosivas recidivam em 80% a 90% dos pacientes dentro de seis meses do término do tratamento, devendo-se então ser considerado tratamento de manutenção nestes pacientes ⁽¹¹⁾.

A intervenção cirúrgica fica reservada para casos específicos depois de passar por avaliação pré-operatória adequada. As indicações principais são para pacientes que não respondem satisfatoriamente ao tratamento clínico, inclusive aqueles com manifestações atípicas cujo refluxo foi devidamente comprovado; pacientes dos quais é exigido tratamento de manutenção com IBP, especialmente aqueles com menos de 40 anos de idade; casos em que não é possível a continuidade do tratamento de manutenção, por exemplo, a impossibilidade de arcar financeiramente com os custos do tratamento clínico a longo prazo. Outras possíveis indicações cirúrgicas são hérnias de hiato volumosas e hipotonia do esfíncter inferior do esôfago ^(2, 3).

Existem várias causas que devem ser consideradas como responsáveis pela resposta inadequada aos IBP. A baixa adesão e o momento indevido de ingestão dos mesmos devem sempre ser excluídos antes de uma nova avaliação desta população de doentes ^(11, 12). A não-

adesão às modificações de estilo de vida também pode dificultar a resposta ao tratamento. Os possíveis mecanismos para DRGE refratária incluem refluxo fracamente ácido, refluxo duodenogastroesofágico, refluxo biliar, hipersensibilidade visceral, esvaziamento gástrico retardado, comorbidade psicológica e distúrbios funcionais concomitantes. Redução da biodisponibilidade do IBP, metabolização rápida do IBP e o *Helicobacter pylori* têm impacto limitado na DRGE refratária. Esofagite induzida por pílula e Síndrome de Zollinger-Ellison geralmente não são confundidos com DRGE ⁽¹³⁾.

Há pacientes que apresentam sintomas típicos de refluxo, porém possuem outras patologias, como a gastroparesia, dispepsia funcional, esofagite eosinofílica, acalasia, assim como outras alterações de motilidade do esôfago ⁽¹⁴⁾.

1.2 Microbiota gastrointestinal

Atualmente, a microbiota gastrointestinal humana tornou-se objeto de extensa pesquisa e nosso conhecimento sobre as espécies residentes e sua influência está crescendo rapidamente. O sistema digestório humano abriga comunidade complexa de células microbianas que influenciam a fisiologia humana, atuando na motilidade e na barreira gastrointestinais, no eixo-cérebro-intestino, na função imunitária, alimentação e metabolismo ^(15, 16, 17).

A complexidade e variabilidade das populações microbianas vêm se tornando cada vez mais evidente nos últimos anos. A variabilidade pode

estar relacionada com a influência de inúmeros fatores, incluindo tipo de dieta, clima e genética do hospedeiro. Também varia quantitativamente, qualitativamente e metabolicamente em função das localizações ao longo do TGI. A composição e atividade podem variar também de acordo com as épocas de desenvolvimento e eventos da vida, incluindo a puberdade, o ciclo ovariano, gravidez e menopausa, entre outros. Diferentes tipos de dieta, tabagismo, sedentarismo, condições sanitárias, viagens, uso de antimicrobianos, entre outros, têm impacto na composição microbiana (Figura 1).

Fonte: (com permissão de *Mayo Clinic Health System*)

Figura 1 - Microbiota intestinal na fisiologia do hospedeiro

A microbiota é classificada, taxonomicamente, de acordo com a nomenclatura biológica tradicional (reino-filo-classe-ordem-família-gênero-espécie) ⁽¹⁸⁾. O número, tipos e funções variam ao longo do trato gastrointestinal. O projeto "*The Human Microbiome Project*" fez descobertas recentes mostrando que milhares de diferentes microrganismos podem estar presentes no trato gastrointestinal (TGI), podendo haver alta variação na composição dessa população entre indivíduos. Apesar desta taxa de variação, a abundância de muitos dos genes microbianos para atividades metabólicas básicas ou de manutenção são bastante semelhantes entre os indivíduos. A massa microbiana contribui significativamente para o volume fecal, que por sua vez é importante determinante da saúde do intestino ^(19, 20).

O corpo humano é habitado por grande número de bactérias, arqueas, vírus e eucariontes unicelulares. A microbiota coloniza virtualmente toda a superfície do corpo humano que está exposto ao meio ambiente externo, estando presente em nossa pele, nos tratos genito-urinário, gastrointestinal e respiratório, entre outros ⁽²¹⁾. O TGI é rico em moléculas que podem ser utilizados como nutrientes, tornando-se local preferido para a colonização. A maior parte da microbiota intestinal é composta de bactérias anaeróbias estritas, que excedem as aeróbias na proporção de 100:1 até 1000:1 ⁽²²⁾. A estimativa do número de espécies de bactérias presentes no intestino humano varia amplamente entre diferentes estudos, mas tem sido geralmente aceito que estão presentes de 500 a 1.000 espécies ⁽²³⁾. No entanto, análise envolvendo múltiplos indivíduos sugeriu que a microbiota

intestinal humana é composta por mais de 35.000 espécies de bactérias e mais de 50 filos bacterianos já descritos até o momento, sendo os mais prevalentes: *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacterias*, *Fusobactérias* e *Cianobactérias* ^(22, 23). A distribuição da microbiota intestinal não é homogênea e sua composição microbiana varia entre estes locais ⁽²⁴⁾. Frank et al. compararam amostras de biópsia do intestino delgado e do cólon a partir de indivíduos saudáveis. As amostras de intestino delgado mostraram maior prevalência das classes de bacilos dos *Firmicutes* e *Actinobacterias*. Por outro lado, *Bacteroides* e a família *Lachnospiraceae*, dos *Firmicutes*, eram mais prevalentes em amostras do cólon ⁽²⁵⁾.

A colonização bacteriana intestinal começa quando o feto está no segmento inferior do útero ⁽²⁶⁾. De fato, a presença de microrganismos, na placenta ou no líquido amniótico, sugere colonização fetal primária ⁽²⁷⁾. Após a passagem através do canal de parto, os lactentes são expostos a população microbiana complexa, com a microbiota intestinal sendo estabelecida após o nascimento. A prova de que o contato imediato com microrganismos durante o parto pode afetar o desenvolvimento da microbiota intestinal vem do fato de que a microbiota intestinal de lactentes e a microflora vaginal de suas mães mostrarem-se semelhantes. Além disso, bebês nascidos através de cesariana têm diferentes composições microbianas em comparação com bebês de parto normal ^(28–30).

Logo após o estabelecimento inicial da microbiota intestinal, e durante os primeiros três anos de vida, a composição microbiana intestinal é

relativamente simples e varia amplamente entre indivíduos diferentes e, também, ao longo do tempo. No entanto, após o terceiro ano de vida, a microbiota intestinal de crianças começa a se assemelhar ao de adulto jovem, quando então se estabiliza ^(31, 32, 33).

De fato, após o nascimento, ocorre importante mudança da microbiota intestinal com a amamentação, resultando em domínio do gênero *Bifidobacterium*. Outra transição ocorre no período do desmame, com a introdução de alimentos sólidos, juntamente com a amamentação, resultando no estabelecimento de uma microbiota mais semelhante à de adultos, dominada pelos filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes*. Essas mudanças continuam até os três anos de idade e, posteriormente, é estabelecida uma microbiota intestinal estável, formada principalmente pelos gêneros *Bacteroides*, *Prevotella*, *Ruminococcus* e *Faecalibacterium* ^(32, 34, 35, 36).

Presume-se que esta colonização inicial esteja envolvida na formação da composição da microbiota intestinal até idade adulta. Além da composição da flora da mãe, muitos outros fatores podem contribuir para a composição microbiana do TGI. Vários estudos têm mostrado que a genética do hospedeiro pode afetar a composição microbiana do intestino. Por exemplo, as proporções dos principais grupos de bactérias no intestino murino são alterados nos ratos geneticamente obesos em comparação com os seus irmãos geneticamente magros. Além disso, os camundongos contendo mutação no principal componente da lipoproteína de alta densidade (apolipoproteína AI) apresenta microbiota alterada. Embora estes estudos sugiram que a genética do hospedeiro pode ter impacto sobre a

flora intestinal, deve-se notar que tais efeitos podem ser indiretos. Os estudos sobre a obesidade também revelaram que a dieta pode afetar a composição microbiana intestinal. O consumo de dieta ocidental típica, que induziu ganho de peso, alterou significativamente a composição microbiana do intestino murino. As manipulações dietéticas que limitaram o ganho de peso foram capazes de reverter os efeitos da obesidade induzida por dieta na microbiota ⁽²¹⁾.

Dados os vários fatores que podem afetar a composição microbiana no intestino humano, é surpreendente que esta composição seja bastante estável ao que concerne aos filos. Os principais grupos que dominam o intestino humano são conservados entre todos os indivíduos, embora as proporções destes grupos possam variar. No entanto, quando gêneros e composição de espécies são analisados, diferenças ocorrem. Dentre os filos, a variação interindividual de composição de espécies é bastante alta. Isto sugere que, embora haja pressão seletiva para a manutenção de determinados grupos microbianos, a redundância funcional entre as diversas populações bacterianas permite variações na sua composição sem prejuízos para o hospedeiro. No entanto, é necessário que esta hipótese seja testada experimentalmente ⁽²¹⁾. Além disso, as comunidades bacterianas, em determinado sítio, são mais semelhantes entre membros da mesma família do que entre indivíduos não aparentados ⁽³⁷⁾, mas são necessários mais estudos para distinguir os efeitos do parentesco genético e de um ambiente inicial compartilhado ⁽³⁸⁾.

O estudo dos metabólitos produzidos pelos microrganismos também é relevante, visto que estes são capazes de produzir vasta gama de produtos, entre eles mais de 25.000 substâncias químicas e 58.000 enzimas. A metabolômica, isto é, o estudo destes metabólitos, é um campo relativamente novo da ciência, em amplo crescimento. As técnicas de análise metabolômica mais utilizadas são espectrometria de massas, ressonância nuclear magnética e espectroscopia. A produção destes metabólitos depende de vários fatores, como disponibilidade de nutrientes e características do meio ambiente luminal, especialmente o pH. Os produtos microbianos podem ser absorvidos, atingir a circulação e outros tecidos, sendo excretados na urina ou por via respiratória. A fermentação de fibras e proteínas por bactérias do intestino grosso resulta em alguns dos produtos mais abundantes e fisiologicamente importantes que são os ácidos graxos de cadeia curta, que agem como principais fontes de energia para os tecidos colorretais e para as próprias bactérias, promovendo a integridade dos tecidos. Estes ácidos graxos de cadeia curta podem alcançar a circulação e ter impacto imunológico e inflamatório em outros órgãos, como o pulmão. No entanto, alguns produtos da fermentação de proteínas, tais como amônia, fenóis e sulfureto de hidrogênio podem ser tóxicos. Há muitos outros produtos que merecem destaque por sua influência na saúde. As bactérias, tais como o *Bifidobacterium*, podem gerar vitaminas (por exemplo, vitamina K, vitamina B12, biotina, ácido fólico, tiamina). O *Bifidobacterium* pode ainda ajudar a prevenir infecções através da produção de acetato. A síntese de ácidos biliares secundários, componentes importantes no transporte e no

turnover dos lipídios nos seres humanos, é mediada por bactérias, incluindo os *Lactobacillus*, o *Bifidobacterium* e os *Bacteroides*. Numerosos lipídeos com atividade biológica são produzidos por bactérias, incluindo os lipopolissacarídeos, componente da parede celular das bactérias gram-negativas. Muitas enzimas produzidas por microrganismos influenciam na digestão e na saúde dos indivíduos. A competição das bactérias por substratos tem influência significativa sobre os produtos que são gerados. O hidrogênio é usado por muitas delas e há variação de sua concentração ao longo do intestino baseada na produção por algumas e no seu uso por outras, incluindo as bactérias metanogênicas e as redutoras de sulfato. A utilização de hidrogênio para produção de metano pelas arqueas metanogênicas pode limitar a produção de acetato por outros microrganismos, o que pode limitar a produção do butirato benéfico ^(20, 39–41).

A produção de gases, como o metano, hidrogênio, sulfureto de hidrogênio e dióxido de carbono, está relacionada com a digestão e a fermentação no TGI. O excesso de produção pode causar problemas gastrointestinais, como distensão e dor abdominal. Porém, os gases também podem servir para fins úteis. Por exemplo, há debate sobre se o sulfureto de hidrogênio pode ser benéfico ou prejudicial à saúde. Existe forte interação entre o sistema imune do hospedeiro e da microbiota, pois ambos produzem compostos que influenciam um ao outro. As bactérias também produzem substâncias que permitem a comunicação entre si ^(20, 41).

Antibióticos podem afetar marcadamente a composição da microbiota em curto prazo, com a maioria das famílias e gêneros de microrganismos

intestinais retornando aos níveis típicos dentro de semanas de exposição^(42–44).

A frequência e consistência das fezes também pode ter impacto na composição do microbioma intestinal⁽⁴⁵⁾. O estresse psíquico pode influenciar na atividade motora gastrointestinal através do eixo intestino-cérebro, podendo alterar os perfis de microbiota intestinal. Este eixo é bidirecional, isto é, as mudanças da microbiota intestinal podem influenciar na atividade do sistema nervoso central^(20, 41).

Considerando esta ampla capacidade da microbiota atuar, qualquer desbalanço deste complexo, tanto qualitativo como quantitativo, pode ter consequências à saúde humana. A disbiose, isto é, o desequilíbrio desta microbiota, pode estar envolvida na patogênese de diversas enfermidades digestivas e extra-digestivas, como síndrome do intestino irritável, doença inflamatória intestinal, doença celíaca, doença diverticular dos cólons, câncer gástrico, obesidade, asma, diabetes mellitus, coronariopatias, atopias, autismo, doenças autoimunes, entre outras^(46, 47, 48).

1.3 Disbiose e a DRGE

Nos últimos anos, questionamentos se levantam acerca da influência das alterações da microbiota gastrointestinal na DRGE. Já existem evidências de que alteração desta microbiota tem importante impacto em variáveis que estão diretamente relacionadas com a fisiopatologia da DRGE,

como no aumento da pressão intra-abdominal e em alterações da motilidade gastrointestinal.

1.3.1 Aumento da pressão intra-abdominal

Disbiose intestinal pode estar relacionada com maior produção de gases no TGI, visto que as bactérias locais têm papel importante na fermentação de carboidratos não-digeríveis no lúmen intestinal. Por volta de 2 a 8 litros de ar podem ser deglutidos e eructados por dia. Aproximadamente 5 a 10 litros de gás carbônico pode ser produzido e liberado no lúmen por reações químicas no intestino delgado. A quantidade calculada de hidrogênio produzido no cólon é de 2,7 a 27 litros por dia, considerando que a taxa de produção de hidrogênio é de 4 litros por 12,5 gramas de carboidratos não-digeríveis ⁽⁴⁹⁾.

A maior produção intraluminal de gases pode levar à elevação da pressão intra-abdominal, com consequente aumento da frequência de relaxamentos transitórios do EEI ^(50–52).

1.3.2 Retardo do esvaziamento gástrico

Alterações de motilidade do tubo digestivo também podem influenciar na DRGE. A prevalência de retardo do esvaziamento gástrico em pacientes com DRGE varia de 6 a 41%. O retardo no esvaziamento leva a maior volume de material refluído, além de poder causar distensão gástrica ⁽⁵³⁾.

Os padrões de motilidade gastrointestinal influenciam na comunidade bacteriana local. Com efeito, é devido à presença dos padrões normais de

motilidade e peristaltismo (como do complexo motor migratório, atuando em conjunto com os efeitos antimicrobianos do ácido gástrico) que diferentes segmentos anatômicos do trato digestivo apresentam composições distintas de microbiota. Por exemplo, em indivíduos saudáveis, estômago e intestino delgado proximal contém menor quantidade de bactérias quando comparados com o cólon. A relação entre a integridade do complexo motor migratório e a ausência de supercrescimento bacteriano no intestino delgado foi, de fato, descrita pela primeira vez no homem por Vantrappen et al. ^(54, 55).

Portanto, a motilidade e composição da microbiota estão claramente associadas. A questão, no entanto, é saber quem viria primeiro. A doutrina convencional é que padrões motores influenciam o tamanho, localização e diversidade da microbiota. Assim, vemos a associação clínica entre variedade de desordens motoras e supercrescimento bacteriano intestinal. Foi demonstrado que a microbiota pode influenciar nos padrões motores, não só pelos estudos citados em animais livres de germes, mas também em modelos experimentais da síndrome do intestino curto ⁽⁵⁴⁾.

Sendo assim, é plausível considerar que a disbiose intestinal, com suas consequências na atividade motora do TGI, tem influência nos mecanismos fisiopatológicos da DRGE. A descrição taxonômica mais detalhada da microbiota envolvido nesse contexto, com identificação através de métodos independentes de cultivo, é campo em pleno crescimento.

1.4 Identificação da Disbiose

Existem diversas formas descritas de identificação da microbiota gastrointestinal. As formas mais comuns são cultura do aspirado ou biópsia do intestino delgado, os testes respiratórios de hidrogênio e/ou metano expirados, a cromatografia gás-líquida do aspirado jejunal e o teste expirado de ácidos biliares ⁽⁵⁶⁾.

O Aspirado Jejunal é considerado exame padrão-ouro, mas não é comumente utilizado na prática devido às suas limitações, como: baixa disponibilidade de equipamentos, ser invasivo, alto custo, possível contaminação pela flora orofaríngea e distribuição irregular das bactérias que pode levar a resultados falso-negativos. Soma-se a isso o fato de que importante proporção de bactérias não serem cultiváveis pelos métodos usualmente disponíveis.

O método mais utilizado, por sua maior praticidade e disponibilidade, é o teste respiratório de hidrogênio expirado, utilizando glicose ou lactulose como substrato. Porém, esse método possui limitações, como as reduzidas sensibilidade e especificidade. Na detecção de supercrescimento bacteriano, a sensibilidade e especificidade deste teste, utilizando a lactulose como substrato, têm sido relatadas como sendo de apenas 68% e 44%, respectivamente. Para o teste utilizando a glicose, os valores estão em torno de 62% e 83% ⁽⁵⁷⁾.

Considerando as limitações destes métodos, novas formas de avaliação da microbiota estão sendo propostas e utilizadas, como identificação da microbiota através da Metagenômica.

1.4.1 Metagenômica

A cultura de organismos anaeróbios requer técnica microbiológica complexa, sendo que proporção desconhecida de bactérias não é cultivável pelos métodos atualmente disponíveis. Através de técnicas de cultivo puro, os microrganismos podem ser estudados individualmente. Entretanto essa abordagem limita a avaliação taxonômica e filogenética. Além disso, prejudica a estimativa da diversidade microbiana da biosfera, pois apenas pequena parcela dos microrganismos (em torno de 1%) é cultivável em laboratório pelas técnicas padrões de cultivo ⁽⁵⁸⁾. Sendo assim, boa parte da biodiversidade microbiana é perdida quando métodos de cultivo são usados. Para tentar resolver tal problema, pode ser utilizada a Metagenômica, que é a análise genômica da comunidade de microrganismos de determinado ambiente por técnicas independentes de cultivo. Essa abordagem consiste na extração de DNA diretamente do ambiente e construção de biblioteca metagenômica com este genoma misto. A metagenômica usa o sequenciamento de regiões gênicas conservadas para possibilitar a identificação taxonômica em uma amostra natural ^(59, 60).

O alvo mais utilizado é o gene 16S RNA ribossomal (rRNA), sendo muito usado em estudos de microbiologia ambiental para classificação taxonômica e de análises filogenéticas de microrganismos ⁽⁶¹⁾. Este gene

está presente em todas as *Bacterea* e *Archea*, contendo regiões altamente conservadas, para o desenho de amplificadores, e regiões hipervariáveis que permitem a identificação de características filogenéticas dos microrganismos, as quais são divididas entre V1 e V9 ^(62–66).

Em geral, a região mais utilizada é a V4, pois foi considerada a melhor região para estudos filogenéticos, além de representar fielmente o perfil taxonômico das comunidades microbianas, quando comparada à identificação utilizando a sequência completa do gene 16S ^(67, 68).

Para a análise genética das amostras, são utilizadas plataformas de sequenciamento genético. A primeira plataforma de sequenciamento de nova geração desenvolvida foi a 454 da empresa *F. Hoffmann–La Roche* GA. Esta plataforma foi utilizada no Projeto do Genoma Humano do *National Institutes of Health* (NIH) ^(69, 70). Posteriormente, surgiram as Plataforma da Illumina e do IonTorrent, sendo utilizadas em estudos de caracterização do microbioma em vários tipos de amostras naturais, como fezes, escarro, secreção vaginal, subgengival, muco intestinal, entre outros ^(71–74).

Após o sequenciamento, os dados gerados devem ser organizados e analisados. Para esta análise, o QIIME™ (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) é um software muito popular, pois é de fácil entendimento e por permitir que o usuário importe dados brutos das sequências, facilitando a análise das medidas de diversidade das amostras estudadas ⁽⁷⁵⁾.

1.4.2 Medidas de Biodiversidade Microbiana

Nos estudos de microbiota intestinal, para determinar a biodiversidade de uma amostra coletada, é preciso considerar não apenas o número de táxons presentes na amostra, mas também a abundância relativa de cada táxon, isto é, a proporção em que cada uma está presente. Sendo assim, avaliamos quais táxons estão presentes e a porcentagem (abundância relativa) de cada um.

Para analisar e comparar diferentes amostras, são utilizados dois tipos de índices de diversidade: alfa (α) e beta (β). A diversidade α , ou local, corresponde à diversidade dentro de uma dada população. A diversidade β corresponde à diversidade entre populações, isto é, mede o quanto a composição de espécies varia de uma população para outra.

Outra ferramenta útil é a “curva de rarefação”, que permite avaliar o quanto uma análise se aproxima de capturar todas as espécies da amostra a ser investigada. Quando a curva estabiliza, ou seja, nenhuma espécie nova é adicionada, significa que a riqueza total foi obtida. A partir disso, novos sequenciamentos daquela amostra não são necessários.

2 Justificativa

2 JUSTIFICATIVA

O desequilíbrio da microbiota intestinal pode ter impacto nos mecanismos fisiopatológicos da doença do refluxo gastroesofágico. Porém, dados sobre alterações da microbiota intestinal, em pacientes com doença do refluxo gastroesofágico, ainda são escassos.

3 Objetivos

3 OBJETIVOS

Objetivo principal

Avaliar a microbiota intestinal em pacientes com doença do refluxo gastroesofágico erosiva e em controles saudáveis assintomáticos.

4 Casuística e Métodos

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Período do estudo

De maio de 2017 a fevereiro de 2019.

4.2 Desenho do estudo

Observacional, descritivo.

4.3 Sujeitos do estudo

O estudo foi conduzido com 22 pacientes, de ambos os sexos, matriculados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). A análise experimental foi desenvolvida no Laboratório de Investigação Médica – LIM 46, setor de Parasitologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo.

A) Critérios de Inclusão

Foram incluídos pacientes:

- de ambos os sexos
- com idade entre 18 e 60 anos

- com diagnóstico confirmado de DRGE erosiva através de critérios clínicos e endoscópicos

B) Critérios de Exclusão

- Utilização de inibidores de bomba de prótons, antagonistas H₂ ou antiácidos nos últimos trinta dias
- Utilização de antimicrobianos ou de probióticos nos últimos três meses
- Presença de gastrite atrófica severa e/ou extensa, confirmada histologicamente
- Comorbidades que pudessem interferir na motilidade do trato gastrointestinal (diabetes mellitus, acidente vascular encefálico prévio, doenças neurológicas)
- Uso de drogas que pudessem interferir na motilidade do trato gastrointestinal ou na salivação (bloqueadores do canal de cálcio, nitratos, anticolinérgicos, estrógenos)
- Hérnia hiatal volumosa (maior ou igual a 5 cm)
- Esofagite erosiva graus C ou D de Los Angeles
- Viagens de longa distância nos últimos 3 meses (para fora da região sudeste do país)
- Pacientes grávidas ou amamentando
- História prévia de cirurgia do aparelho digestivo alto
- Obesidade (índice de massa corpórea igual ou maior que 30 kg/m²)
- Paciente com síndrome consumptiva ou desnutrição

- Uso de tabaco nos últimos 30 dias / Uso de álcool (mais que 20 g por dia, nos últimos 30 dias)

4.4 Protocolo do estudo

Foram selecionados pacientes com suspeita clínica de DRGE. Estes foram submetidos à endoscopia digestiva alta. Para os pacientes que apresentavam esofagite erosiva, foi solicitada a coleta de fezes para envio para análise da microbiota intestinal através da metagenômica, pela amplificação do domínio V4 do segmento 16S ribossômico bacteriano.

Cada participante recebeu um kit composto de um tubo falcon, de 15 ml, contendo uma solução com cloridrato de guanidina (a fim de uma adequada preservação do material genético das amostras), e uma espátula. Os pacientes foram orientados a evacuar sobre uma folha de papel e, com a ajuda da espátula, armazenar o material fecal no tubo contendo solução de guanidina. Orientou-se a entrega imediata das amostras no Laboratório de Investigação Médica – LIM 46, setor de Parasitologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, onde permaneceram em temperatura de -80°C até a extração do DNA. Não sendo possível a entrega do material no mesmo dia da coleta, orientou-se manter as amostras congeladas em *freezer* domiciliar até a entrega no laboratório.

Os controles assintomáticos foram convidados a participar da pesquisa, sendo solicitada a coleta de fezes para mesma análise.

4.5 Exame endoscópico

A EDA foi realizada conforme descrição a seguir. Os pacientes se apresentavam em jejum de oito horas. Inicialmente, recebiam 2 ml de simeticona, diluídos em 10 ml de água, por via oral. A seguir, era realizada anestesia tópica da orofaringe com aplicações de "spray" de xilocaína a 10%. Logo depois, era administrada solução IV contendo midazolam (de 2,5 a 5,0 mg) e fentanil (50 µg), para fins de sedação. Os pacientes eram posicionados em decúbito lateral esquerdo e o aparelho introduzido sob visão direta. A seguir, iniciava-se o exame endoscópico sistematizado do esôfago, estômago e duodeno. Durante o exame de endoscopia digestiva alta, foram realizadas biópsias da incisura angularis, corpo e antro gástricos para avaliar atrofia.

A esofagite erosiva foi avaliada através da Classificação de Los Angeles ^(76, 77), a qual divide o grau de severidade em:

Grau A - uma (ou mais) solução de continuidade da mucosa confinada às pregas mucosas, não maiores que 5 mm cada

Grau B - uma (ou mais) solução de continuidade da mucosa confinada às pregas mucosas, maiores que 5 mm cada

Grau C - uma (ou mais) solução de continuidade da mucosa contígua entre o topo de duas (ou mais) pregas mucosas, envolvendo mesmo que 75% da circunferência do esôfago

Grau D - uma (ou mais) ruptura da mucosa que envolve pelo menos 75% da circunferência esofágica

Figura 2 - Fluxograma dos participantes incluídos no estudo

4.6 Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (número de permissão 1.463.131), e todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido após tomar conhecimento da natureza do estudo e assentir em participar do mesmo.

4.7 Metagenômica

Nas amostras fecais, a microbiota bacteriana foi avaliada através da técnica de metagenômica. Foi extraído o DNA nas amostras, com posterior amplificação por PCR, sequenciamento de bases nitrogenadas e determinação filogenética da comunidade bacteriana local.

4.7.1 Sequenciamento automático

A caracterização da microbiota foi realizada pela amplificação do domínio V4 do segmento 16S ribossômico bacteriano, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores F515 (5'-CACGGTCGKCGGCGCCATT-3') e R806 (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3').

4.7.2 Amplificação de sequências-alvo

Para a amplificação da sequências-alvo, os reagentes (Primers, PlatinumR PCR SuperMix High Fidelity) e a amostra contendo DNA genômico de alta qualidade foram mantidos em gelo.

Cada par de iniciadores foi misturado em volumes iguais, obtendo uma solução estoque de 10 μ M e os reagentes da tabela abaixo foram adicionados em tubo de 0,2 mL na seguinte ordem: 1º 45 μ L do PlatinumR PCR SuperMix High Fidelity, 2º 4 μ L de 20–50 ng de DNA genômico, 3º 1 μ L da solução estoque de primer a 10 μ M, em volume total de 50 μ L.

Os tubos foram, então, colocados no termociclador com as seguintes condições de amplificação: ativação da Enzima 94 °C por 3 minutos,

desnaturação 94 °C por 30 segundos, anelamento 58 °C por 30 segundos, extensão 68 °C por 1 minutos/kb e 4°C.

4.7.3 Purificação da biblioteca

Para o processo de purificação da biblioteca, o reagente Agencourt® AMPure® XP Reagent foi resuspendido e mantido a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos e adicionados 90 µL do reagente “Agencourt® AMPure® XP Reagent” a cada tubo contendo o amplicom. Essa mistura foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente.

Após os 5 minutos de incubação, os tubos foram posicionados em estante magnética e incubados novamente por 2 minutos, ou até a solução apresentar-se límpida. O sobrenadante foi cuidadosamente removido, sem que o sedimento tenha sido desprendido, e foram adicionados 30 µL de etanol 70% recém-preparado e essa mistura incubada por 30 segundos. Ao término da incubação, foi removido e desprezado o sobrenadante gerado, sem que o pellet tenha sido desprendido. Este processo de lavagem com etanol a 70%, foi repetido por mais uma vez.

Após os processos de lavagem, foi certificado a remoção de todo o etanol dos poços e os tubos foram mantidos em estante magnética para que ocorresse a secagem das “beads” através da incubação à temperatura ambiente por 5 minutos. Os tubos foram removidos da estante magnética e foram adicionados 20 µL de tampão TE (tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) à cada tubo e homogeneizados com o auxílio de uma pipeta por cinco vezes.

O tubo foi posicionado novamente em estante magnética, durante 1 minuto, e o sobrenadante contendo a biblioteca aplicada foi transferido para um novo tubo.

4.7.4 Preparo do pool equimolar das bibliotecas amplificadas

O agrupamento das amostras em quantidades equimolares permite a total cobertura das regiões-alvo.

Foi analisada uma alíquota de cada amostra no instrumento Agilent Bioanalyzer®, segundo as instruções do protocolo do kit DNA 1000 para determinar a concentração molar (nmol/L) de cada biblioteca. Todas as amostras foram diluídas para que se tornassem equimolares utilizando a maior concentração possível e, misturadas em um tubo contendo volumes iguais de cada amostra, para um volume total de no mínimo 25 µL.

4.7.5 PCR em emulsão

4.3.5.1 Preparo da solução de amplificação

Em um tubo Eppendorf LoBind® 1,5 mL, foram adicionados os seguintes componentes, na ordem seguinte: 1º 500 µL do Ion PGM™ Template OT2 400 Reagent Mix, 2º 285 µL do Ion PGM™ Template OT2 400 PCR Reagent B, 3º 50 µL do Ion PGM™ Template OT2 400 Enzyme Mix, 4º 40 µL Ion PGM™ Template OT2 400 Reagent Mix e 5º 900 µL da Biblioteca diluída, em um volume total de 900 µL.

O reagente PGM™ Template OT2 400 Ion Sphere™ Particles foi vortexado, durante um minuto, para que as partículas ficassem

resuspendidas, centrifugado durante dois minutos, homogeneizado com o auxílio de uma pipeta e adicionado 100 µL à solução de amplificação de 900 µL, com volume total de 1000 µL.

A solução de amplificação foi vortexada por 5 minutos e o filtro Ion PGM™ OneTouch Plus Reaction Filter Assembly foi preenchido e instalado.

Observação: Ao término da reação, foi transferida a suspensão obtida em dois tubos para um único tubo e prosseguido para o enriquecimento da amostra.

4.7.6 Enriquecimento

4.7.6.1 Preparar a solução Melt-Off

A solução Melt-Off foi preparada com a combinação dos seguintes reagentes: 280 µL da Solução Tween®, 40 µL de 1M NaOH, em uma solução total de 320 µL.

4.7.6.2 Preenchimento da tira de reação do *Enrichment System* (ES)

O restante dos poços da tira foram preenchidos com: 100 µL Solução ISP template-positiva no poço 1, 130 µL de Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 Beads resuspenso em MyOne™ Beads no poço 2, 300 µL Ion OneTouch™ Wash Solution nos poços 3, 4 e 5, 300 µL da solução Melt-Off no poço 7 e os poços 6 e 8 ficaram vazios.

A um tubo de PCR de 0,2 mL foram adicionados 10 µL de solução Neutralization Solution e colocado no equipamento.

Imediatamente após a corrida, foi retirado o tubo de PCR de 0,2 mL contendo as ISPs enriquecidas, tampado, misturado seu conteúdo cinco vezes por inversão e certificado que o tubo possuía 0,2 mL da solução. Após esse processo, as amostras foram sequenciadas ou guardadas em freezer em uma temperatura entre 2 °C e 8 °C por até três dias.

4.7.7 Reação de Sequenciamento

4.7.7.1 Preparo da amostra

O reagente Control Ion Sphere™ Particles foi centrifugado durante dois minutos e 5 µL dele foi adicionado diretamente à amostra recém – enriquecida, em um tubo de PCR a 0,2 mL.

4.7.7.2 Anelamento do “Sequencing Primer”

Os reagentes presentes no tubo da amostra foram misturados com o auxílio de uma pipeta, centrifugados por 2 minutos a 15.500G e o sobrenadante foi cuidadosamente removido sem que o pellet tenha sido desprendido, deixando o tubo com um volume de 15 µL (foi comparado o volume com um tubo contendo 15 µL de líquido).

A esse volume, foram adicionados 12 µL de Sequencing Primer, confirmando o volume do tubo de 27 µL e a amostra foi misturada vigorosamente com o auxílio de uma pipeta para que o pellet fosse rompido.

O termociclador foi programado durante 2 minutos a 97 °C e 2 minutos a 37 °C com a opção “aquecer a tampa” ativa, o tubo do termociclador foi posicionado e o programa anterior acionado. Ao fim do

ciclo, o tubo permaneceu no termociclador a temperatura ambiente, durante a checagem do chip.

4.7.7.3 Ligação da Polimerase

Após o anelamento do Sequencing Primer, o tubo foi removido do termociclador e foram adicionados 3 μL de Ion PGM™ Sequencing 400 v2 Polymerase, em um volume total de 30 μL . Depois a amostra foi homogeneizada com o auxílio de uma pipeta por cinco vezes e incubada à temperatura ambiente durante 5 minutos.

4.7.7.4 Carregamento do CHIP

Primeiramente, o chip foi posicionado em um adaptador de centrífuga. Após a reação da polimerase, todo o volume da amostra (~ 30 μL) foi coletado utilizando uma ponteira de 200 μL , a qual foi firmemente inserida à porta do chip.

O líquido da ponteira do chip foi depositado conforme as instruções do fabricante, e quando o chip estava carregado, era pressionada a tela Next do PGM e seguido para a seleção da corrida planejada e realização do sequenciamento.

4.7.8 Análise dos resultados do sequenciamento

Após o sequenciamento, as sequências geradas pelo Ion PGM Torrent foram filtradas utilizando o software Torrent Browser, para a remoção de sequências policlonais e de baixa qualidade.

Os arquivos, com extensão sff, gerados pelo Torrent Browser, foram analisados utilizando a ferramenta QIIME™ versão 1.8 (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*)⁽⁷⁸⁾, de acordo com o protocolo de análise do *Brazilian Microbiome Project*⁽⁷⁹⁾. Leituras menores de 50pb foram descartadas. As sequências remanescentes foram agrupadas em Unidades Operacionais Taxonômicas (OTU, *operational taxonomic unit*), baseando-se em similaridade de 97%, utilizando o algoritmo UCLUST. Uma OTU é tipicamente definida como um agrupamento de leituras com similaridade de 97%, motivada pela expectativa de que estas correspondam, aproximadamente, a espécies. OTUs foram classificadas taxonomicamente, com o software QIIME™, utilizando como referência o banco de dados *Ribosomal Database Project*⁽⁸⁰⁾, utilizando com referência o banco de dados *Greengenes* (versão 13.8)⁽⁸¹⁾.

Esse processo resultou na formação de árvores filogenéticas com formato padrão Newick, as quais foram utilizadas posteriormente para o cálculo Unifrac. Além disso, no software QIIME™, foram analisadas as diversidades alfa e beta.

Para a análise da alfa-diversidade, que é a diversidade taxonômica dentro de uma mesma população, foram utilizados os índices de Shannon, Simpson, Chao 1 e número de espécies observadas. Estes índices utilizam fórmulas matemáticas para medir a diversidade microbiana das amostras estudadas. São baseados nas abundâncias proporcionais dos táxons, sendo as medidas de diversidade mais utilizadas em ecologia. O aumento do

número de espécies ou da uniformidade das abundâncias aumenta a alfa-diversidade.

Para medida da beta-diversidade, que é a diversidade entre populações, foi realizada análise de coordenadas principais (PCoA), baseada na matriz de distância UniFrac, para demonstrar similaridades ou dissimilaridades entre as amostras analisadas. Unifrac é um cálculo de distância que compara a história evolutiva, de diferentes comunidades microbianas, através da medida da distância dos ramos de uma árvore filogenética compartilhada entre duas ou mais comunidades. A distância pode ser qualitativa (não ponderada) quando leva em consideração somente as diversidades de espécies presentes, ou quantitativa (ponderada) levando em consideração tanto a diversidade das espécies presentes como a abundância de cada uma ⁽⁸²⁾.

4.9 Análise estatística

Para determinar as diferenças estatisticamente significantes que ocorreram nas populações microbianas entre os dois grupos estudados, primeiramente foi realizada uma rarefação para o mesmo número de sequências entre todas as amostras, sendo 59.300 quando comparadas o grupo da DRGE e o grupo dos voluntários saudáveis.

Após a rarefação, a abundância relativa das amostras foi calculada utilizando o teste não paramétrico Mann-Whitney. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Para a análise de estatística da alfa diversidade, foi realizado o teste U de Mann-Whitney. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. A análise da beta-diversidade foi realizada utilizando o teste ANOSIM, método não paramétrico baseado em matriz de distância, no *software* QIIME™, sendo considerados valores de $p < 0,05$ estatisticamente significantes.

Gráficos de *boxplot* e tabelas foram gerados para estudar as diversidades segundo valores de Simpson, Shannon, Chao1 e *Observed Species*. Para a organização taxonômica (filó, classe, ordem, família e gênero), foram gerados gráficos de barra e tabelas com valores de média, desvio padrão (DP), mediana, percentil 25 (P25) e 75 (P75). O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliar a normalidade das variáveis analisadas.

Todos os testes realizados levaram em consideração um α bidirecional de 0.05 e intervalo de confiança (IC) de 95% e foram realizados com apoio computacional dos softwares IBM SPSS 25 (Statistical Package for the Social Sciences) e Excel 2010® (Microsoft Office).

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 População do Estudo

Foram coletadas amostras fecais de 22 adultos brasileiros, de ambos os sexos, com idade entre 24 e 55 anos, sendo 11 adultos com diagnóstico de DRGE erosiva (idade média de 38,8 anos, 8 homens e 3 mulheres) e 11 adultos saudáveis assintomáticos (idade média de 34,9 anos, 10 homens e 1 mulher) (**Tabela 1**).

Quanto ao grau da esofagite erosiva, seis pacientes exibiram grau A (54,5%) e cinco pacientes grau B (45,5%).

As coletas ocorreram no período de março de 2017 a fevereiro de 2018.

Tabela 1 - Dados sociodemográficos

	DRGE	Controle
	% (IC95%) média ($\pm$ DP)	% (IC95%) média ($\pm$ DP)
<i>Feminino</i>	27,3% (8,3%-56,5%)	9,1% (1,0%-35,3%)
<i>Masculino</i>	72,7% (43,5%-91,7%)	90,9% (64,7%-99,0%)
Idade (anos)	39 ($\pm$ 11)	34 ($\pm$ 6)
Peso (Kg)	73 ($\pm$ 6)	74 ($\pm$ 8)
Altura (metros)	1,7 ($\pm$ 0,08)	1,7 (0,06)
IMC	25,5 ($\pm$ 1,9)	24,6 ($\pm$ 1,8)

5.2 Análise metagenômica da microbiota das amostras fecais

A microbiota intestinal foi avaliada com objetivo de determinar a abundância relativa de bactérias nos diferentes níveis taxonômicos. Para este objetivo, foram comparados dados obtidos em amostras de fezes do grupo de DRGE com o grupo controle, após amplificação da região hipervariável V4 de 16S rRNA, seguida pelo sequenciamento do DNA. Este procedimento resultou em 2.154.546 leituras, com média de 93.016 sequências por amostra.

Para todas as amostras, foi realizado o processo de rarefação, tendo como base a amostra que apresentou o menor número de sequências (59.300). As sequências foram agrupadas em OTUs, baseando-se em similaridade de 97%, com auxílio do software QIIME™, utilizando como fonte o banco de dados *Greengenes* (versão 13.8). Apenas os grupos com frequência média acima de 0,1% foram analisados.

5.3 Análise do grupo DRGE vs grupo controle

A curva de rarefação para amostras de fezes de pacientes com DRGE e controles está ilustrada na **Figura 3** e mostra que o número de leituras realizado foi suficiente para determinar a diversidade microbiana das amostras.

Figura 3 - Curva de rarefação demonstrando o número estimado de Unidades Operacionais Taxonômicas (OTU, *operational taxonomic unit*) no grupo controle (azul) e no grupo da DRGE (vermelho), em função do esforço de sequenciamento gerado através do software QIIME™ (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*)

De acordo com os índices de Shannon, índice de diversidade de Simpson, da estimativa de riqueza de Chao1 e número de espécies observadas, não houve diferença estatisticamente significativa na alfa-diversidade entre os dois grupos, como observa-se na **Tabela 2** e na **Figura 4**.

Tabela 2 - Alfa-diversidade medida através dos índices de Shannon, de Simpson, da estimativa de riqueza de *Chao1* e número de espécies observadas

	DRGE					Controle				
	Média	DP	Mediana	P25	P75	Média	DP	Mediana	P25	P75
Shannon	5.22	0.69	5.11	4.85	5.35	5.13	1.1	5.5	4.55	5.97
Simpson	0.93	0.03	0.93	0.9	0.94	0.91	0.09	0.94	0.92	0.97
Chao1	368.41	112.14	342.97	276	515.17	350.57	98.9	384.16	265	421.49
Observed Species	330.18	100.73	310	240	456	319.82	89.15	351	243	389

Figura 4 - Gráficos *boxplot* com índices de Shannon, de Simpson, da estimativa de riqueza de *Chao1* e número de espécies observadas, não sendo observada diferença estatisticamente significativa, na alfa-diversidade, entre os dois grupos

A análise da beta-diversidade (diversidade taxonômica entre populações) está ilustrada na **Figura 5**. Foi realizada através do método de Análise de Coordenadas Principais (PCoA), baseada na matriz de distância UniFrac não ponderada (**Figura 5A**) e ponderada (**Figura 5B**). Pode-se observar que não houve variação da comunidade bacteriana nas amostras de fezes entre os dois grupos. Para confirmar esses resultados, foi realizada a análise estatística ANOSIM, método não paramétrico baseado em matriz de distância, obtendo o valor de $p=0,870$ para a análise da PCoA não ponderada e de $p=0,43$ para a análise da PCoA ponderada, não apresentando diferença significativa entre os dois grupos.

Figura 5 - A – valor de p (Anosim)=0,870; **B** - valor de p (Anosim)=0,430. Unifrac. Análise da comunidade bacteriana, nas amostras dos casos (vermelho) e controles (azul), pelo método de análise das coordenadas principais (PCoA) não ponderada (A) e ponderada (B) nos grupos caso e controle

5.3.1 Análise da taxa de abundância relativa

Na **Tabela 3** e **Figura 6**, estão apresentados os dados de abundância relativa, em nível de filo, nos pacientes com DRGE e nos controles saudáveis.

Em ambos os grupos, os filos mais abundantes, em ordem decrescente, foram *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria*, sem diferenças estatisticamente significantes.

Tabela 3 - Estatísticas descritivas do *filo* considerando mediana e percentis 25 e 75 para casos e controle e nível descritivo da estatística baseado no teste de Mann-Whitney

	DRGE			Controle			p
	Mediana	P25	P75	Mediana	P25	P75	
Euryarchaeota	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,989
Actinobacteria	0,60%	0,20%	8,10%	3,20%	0,30%	3,40%	0,748
Bacteroidetes	27,40%	14,70%	44,90%	37,80%	28,20%	51,40%	0,193
Cyanobacteria	0,00%	0,00%	0,10%	0,00%	0,00%	0,00%	0,148
Firmicutes	56,20%	40,10%	81,70%	50,00%	42,70%	62,20%	0,606
Fusobacteria	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,748
Lentisphaerae	0,00%	0,00%	1,00%	0,10%	0,00%	0,20%	0,898
Proteobacteria	3,10%	1,50%	9,00%	2,30%	0,70%	4,30%	0,332
Synergistetes	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,478
Tenericutes	0,00%	0,00%	0,90%	0,10%	0,00%	0,30%	0,797
Verrucomicrobia	0,00%	0,00%	1,60%	0,10%	0,00%	0,40%	0,898
UnassignedOther	0,00%	0,00%	0,10%	0,00%	0,00%	0,00%	0,438

Figura 6 - Abundância relativa e classificação taxonômica de *Bacteria*, em nível de filo, em amostras fecais obtidas de pacientes do grupo controle e da DRGE

Os dados sobre a abundância relativa, em nível de classe, estão apresentados na **Tabela 4** e na **Figura 7**. Em ambos os grupos, as classes mais abundantes foram *Clostridia* e *Bacteroidia*. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

Tabela 4 - Estatísticas descritivas de *classe* considerando mediana e percentis 25 e 75 para casos e controle e nível descritivo da estatística baseado no teste de Mann-Whitney

	DRGE			Controle			p
	Mediana	P25	P75	Mediana	P25	P75	
Euryarchaeota;c__Methanobacteria	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0,989
Actinobacteria;c__Actinobacteria	0.60	0.10	8.00	2.70	0.20	3.30	0,699
Actinobacteria;c__Coriobacteriia	0.10	0.10	0.20	0.10	0.10	0.30	0,898
Bacteroidetes;c__Bacteroidia	27.40	14.70	44.90	37.80	28.20	51.40	0,193
Cyanobacteria;c__4C0d-2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0,949
Cyanobacteria;c__Chloroplast	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0,748
Firmicutes;c__Bacilli	0.40	0.20	1.70	0.60	0.20	1.50	0,948
Firmicutes;c__Clostridia	53.40	39.90	76.40	48.80	41.60	60.50	0,606
Firmicutes;c__Erysipelotrichi	0.70	0.10	0.90	0.30	0.10	1.10	0,989
Fusobacteria;c__Fusobacteriia	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0,748
Lentisphaerae;c__[Lentisphaeria]	0.00	0.00	1.00	0.10	0.00	0.20	0,798
Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0,797
Proteobacteria;c__Betaproteobacteria	1.10	0.20	2.70	0.60	0.30	2.20	0,898
Proteobacteria;c__Deltaproteobacteria	0.20	0.00	0.80	0.20	0.00	0.80	0,748
Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria	0.40	0.30	1.20	0.20	0.10	0.60	0,217
Synergistetes;c__Synergistia	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0,478
Tenericutes;c__Mollicutes	0.00	0.00	0.80	0.00	0.00	0.20	0,898
Tenericutes;c__RF3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0,270
Verrucomicrobia;c__Opitutae	0.00	0.00	0.20	0.00	0.00	0.00	0,606
Verrucomicrobia;c__Verrucomicrobiae	0.00	0.00	1.40	0.00	0.00	0.30	0,898
Verrucomicrobia;c__[Pedosphaerae]	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0,748
Unassigned;Other;Other	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0,449

Figura 7 - Abundância relativa e classificação taxonômica de *Bacteria*, em nível de *classe*, em amostras fecais obtidas de pacientes do grupo controle e da DRGE

Os dados da microbiota, em nível de ordem, estão apresentados na **Tabela 5** e **Figura 8**. As classes mais abundantes, em ambos os grupos, foram *Clostridiales* e *Bacteroidales*, o que está de acordo com a maior abundância das classes *Clostridia* e *Bacteroidia* (tabela anterior).

Tabela 5 - Estatísticas descritivas da *ordem* considerando mediana e percentis 25 e 75 para casos e controle e nível descritivo da estatística baseado no teste de Mann-Whitney

	DRGE			CONTROLE			p
	Mediana	P25	P75	Mediana	P25	P75	
Unassigned;Other;Other;Other	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%	0,0%	0,0%	0,241
k__Archaea;p__Euryarchaeota;c__Methanobacteria;o__Methanobacteriales	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,948
k__Archaea;p__Euryarchaeota;c__Thermoplasmata;o__E2	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,000
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,147
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Bifidobacteriales	0,6%	0,1%	8,0%	2,6%	0,2%	3,2%	0,742
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Coriobacteriia;o__Coriobacteriales	0,1%	0,1%	0,2%	0,1%	0,1%	0,3%	0,860
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales	27,4%	14,7%	44,9%	37,8%	28,2%	51,4%	0,178
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Cytophagia;o__Cytophagales	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,000
k__Bacteria;p__Cyanobacteria;c__4C0d-2;o__YS2	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,922
k__Bacteria;p__Cyanobacteria;c__Chloroplast;o__Streptophyta	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,317
k__Bacteria;p__Elusimicrobia;c__Elusimicrobia;o__Elusimicrobiales	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,000
k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Bacillales	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,000
k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Gemellales	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,000
k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales	0,3%	0,2%	1,0%	0,5%	0,1%	1,3%	0,869
k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Turicibacteriales	0,0%	0,0%	0,1%	0,1%	0,0%	0,1%	0,712
k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales	53,4%	39,9%	76,4%	48,8%	41,6%	60,5%	0,577

continua

Tabela 5 - Estatísticas descritivas da *ordem* considerando mediana e percentis 25 e 75 para casos e controle e nível descritivo da estatística baseado no teste de Mann-Whitney (continuação)

	DRGE			CONTROLE			p
	Mediana	P25	P75	Mediana	P25	P75	
k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__SHA-98	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,000
k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Erysipelotrichi;o__Erysipelotrichales	0,7%	0,1%	0,9%	0,3%	0,1%	1,1%	0,973
k__Bacteria;p__Fusobacteria;c__Fusobacteriia;o__Fusobacteriales	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,317
k__Bacteria;p__Lentisphaerae;c__[Lentisphaeria];o__Victivallales	0,0%	0,0%	1,0%	0,1%	0,0%	0,2%	0,865
k__Bacteria;p__Lentisphaerae;c__[Lentisphaeria];o__Z20	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,317
k__Bacteria;p__Planctomycetes;c__Planctomycetia;o__Pirellulales	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,000
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,317
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__RF32	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,148
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Rhizobiales	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,000
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Burkholderiales	1,1%	0,2%	2,7%	0,6%	0,3%	2,2%	0,895
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Neisseriales	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,000
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Rhodocyclales	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,000
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Deltaproteobacteria;o__Desulfovibrionales	0,2%	0,0%	0,8%	0,2%	0,0%	0,8%	0,707
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Epsilonproteobacteria;o__Campylobacteriales	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,000
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Aeromonadales	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,545
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Cardiobacteriales	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,000

continua

Tabela 5 - Estatísticas descritivas da *ordem* considerando mediana e percentis 25 e 75 para casos e controle e nível descritivo da estatística baseado no teste de Mann-Whitney (conclusão)

[illegible]

Figura 8 - Abundância relativa e classificação taxonômica de *Bacteria*, em nível de *ordem*, em amostras fecais obtidas de pacientes do grupo controle e da DRGE

Em nível de família, os dados de abundância relativa da microbiota estão apresentados na **Tabela 6** e **Figura 9**. Neste nível taxonômico, as famílias mais abundantes foram, em ordem decrescente, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* e *Bacteroidaceae*.

Houve diferença, estatisticamente significativa, na abundância da família *Clostridiaceae*, entre controles saudáveis e pacientes com DRGE erosiva (0,3% versus 2,0%, $p = 0,032$), ilustrado na **Figura 10**.

Tabela 6 - Estatísticas descritivas da *família* considerando mediana e percentis 25 e 75 para casos e controle e nível descritivo da estatística baseado no teste de Mann-Whitney

	DRGE			CONTROLE			p
	Mediana	P25	P75	Mediana	P25	P75	
Unassigned;Other;Other;Other;Other	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%	0,0%	0,0%	0,241
k__Archaea;p__Euryarchaeota;c__Methanobacteria;o__Methanobacteriales;f__Methanobacteriaceae	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,948
k__Archaea;p__Euryarchaeota;c__Thermoplasmata;o__E2;f__[Methanomassiliicoccaceae]	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,000
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Actinomycetaceae	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,000
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Corynebacteriaceae	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,000
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Micrococcaceae	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,000
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Bifidobacteriales;f__Bifidobacteriaceae	0,6%	0,1%	8,0%	2,6%	0,2%	3,2%	0,742
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Coriobacteriia;o__Coriobacteriales;f__Coriobacteriaceae	0,1%	0,1%	0,2%	0,1%	0,1%	0,3%	0,860
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__	0,0%	0,0%	0,7%	0,0%	0,0%	0,0%	0,561
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae	10,1%	4,0%	25,3%	14,5%	7,7%	32,2%	0,375
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Porphyromonadaceae	0,6%	0,2%	1,0%	1,3%	0,4%	1,4%	0,130
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Prevotellaceae	0,5%	0,0%	1,9%	1,5%	0,0%	14,9%	0,486
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Rikenellaceae	0,4%	0,2%	0,6%	0,2%	0,1%	1,4%	0,974
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__S24-7	0,2%	0,0%	1,6%	0,4%	0,0%	1,5%	0,759
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__[Barnesiellaceae]	0,3%	0,0%	0,9%	0,2%	0,0%	0,5%	0,920
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__[Odoribacteraceae]	0,4%	0,2%	1,3%	1,1%	0,6%	1,6%	0,188
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__[Paraprevotellaceae]	0,1%	0,0%	0,5%	0,1%	0,0%	1,1%	0,679

continua

Tabela 6 - Estatísticas descritivas da *família* considerando mediana e percentis 25 e 75 para casos e controle e nível descritivo da estatística baseado no teste de Mann-Whitney (continuação)

	DRGE			CONTROLE			p
	Mediana	P25	P75	Mediana	P25	P75	
k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_p-2534-18B5	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,317
k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Cytophagia;o_Cytophagales;f_Cyclobacteriaceae	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,000
k_Bacteria;p_Cyanobacteria;c_4C0d-2;o_YS2;f__	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,922
k_Bacteria;p_Cyanobacteria;c_Chloroplast;o_Streptophyta;f__	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,317
k_Bacteria;p_Elusimicrobia;c_Elusimicrobia;o_Elusimicrobiales;f_Elusimicrobiaceae	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,000
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Bacillales;f_Staphylococcaceae	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,000
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Gemellales;f_Gemellaceae	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,000
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Lactobacillales;f_Aerococcaceae	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,000
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Lactobacillales;f_Enterococcaceae	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,948
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Lactobacillales;f_Lactobacillaceae	0,0%	0,0%	0,8%	0,0%	0,0%	0,3%	0,883
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Lactobacillales;f_Leuconostocaceae	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,845
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Lactobacillales;f_Streptococcaceae	0,2%	0,0%	0,5%	0,3%	0,1%	0,6%	0,641
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Turicibacterales;f_Turicibacteraceae	0,0%	0,0%	0,1%	0,1%	0,0%	0,1%	0,712
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;Other	0,2%	0,1%	0,6%	0,3%	0,1%	0,5%	0,643
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f__	3,9%	1,4%	17,0%	4,4%	2,9%	10,9%	0,922
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Christensenellaceae	0,1%	0,0%	1,9%	0,1%	0,0%	0,3%	0,811
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Clostridiaceae	2,0%	0,7%	5,3%	0,3%	0,3%	1,3%	0,032

continua

Tabela 6 - Estatísticas descritivas da *família* considerando mediana e percentis 25 e 75 para casos e controle e nível descritivo da estatística baseado no teste de Mann-Whitney (continuação)

	DRGE			CONTROLE			p
	Mediana	P25	P75	Mediana	P25	P75	
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Dehalobacteriaceae	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,147
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_EtOH8	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,000
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Eubacteriaceae	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,000
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae	20,9%	16,3%	23,1%	17,4%	9,3%	28,6%	0,818
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Peptococcaceae	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%	0,0%	0,1%	0,939
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Peptostreptococcaceae	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,000
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Ruminococcaceae	19,3%	9,6%	24,6%	20,3%	18,8%	23,6%	0,491
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Syntrophomonadaceae	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,000
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Veillonellaceae	2,6%	0,7%	4,3%	1,6%	0,5%	3,1%	0,718
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_[Mogibacteriaceae]	0,0%	0,0%	0,1%	0,1%	0,0%	0,1%	0,853
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_[Tissierellaceae]	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,000
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_SHA-98;f__	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,000
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Erysipelotrichi;o_Erysipelotrichales;f_Erysipelotrichaceae	0,7%	0,1%	0,9%	0,3%	0,1%	1,1%	0,973
k_Bacteria;p_Fusobacteria;c_Fusobacteriia;o_Fusobacteriales;f_Fusobacteriaceae	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,317
k_Bacteria;p_Fusobacteria;c_Fusobacteriia;o_Fusobacteriales;f_Leptotrichiaceae	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,000
k_Bacteria;p_Lentisphaerae;c_[Lentisphaeria];o_Victivallales;f_Victivallaceae	0,0%	0,0%	1,0%	0,1%	0,0%	0,2%	0,865
k_Bacteria;p_Lentisphaerae;c_[Lentisphaeria];o_Z20;f_R4-45B	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,317

continua

Tabela 6 - Estatísticas descritivas da *família* considerando mediana e percentis 25 e 75 para casos e controle e nível descritivo da estatística baseado no teste de Mann-Whitney (continuação)

	DRGE			CONTROLE			p
	Mediana	P25	P75	Mediana	P25	P75	
k_Bacteria;p_Planctomycetes;c_Planctomycetia;o_Pirellulales;f_Pirellulaceae	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,000
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o__f__	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,317
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_RF32;f__	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,148
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Aurantimonadaceae	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,000
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_Alcaligenaceae	1,1%	0,2%	2,7%	0,6%	0,3%	2,2%	0,844
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_Comamonadaceae	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,000
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_Oxalobacteraceae	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,000
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Neisseriales;f_Neisseriaceae	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,000
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Rhodocyclales;f_Rhodocyclaceae	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,000
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Deltaproteobacteria;o_Desulfovibrionales;f_Desulfovibrionaceae	0,2%	0,0%	0,8%	0,2%	0,0%	0,8%	0,707
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Epsilonproteobacteria;o_Campylobacteriales;f_Campylobacteraceae	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,000
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Aeromonadales;f_Succinivibrionaceae	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,545
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Cardiobacteriales;f_Cardiobacteriaceae	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,000
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Enterobacteriales;f_Enterobacteriaceae	0,3%	0,1%	0,9%	0,1%	0,0%	0,2%	0,055
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Oceanospirillales;f_Alcanivoracaceae	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,000
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Pasteurellales;f_Pasteurellaceae	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%	0,0%	0,5%	0,237
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Pseudomonadales;f_Moraxellaceae	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,000

continua

Figura 9 - Abundância relativa e classificação taxonômica de *Bacteria*, em nível de *família*, em amostras fecais obtidas de pacientes do grupo controle e da DRGE

Figura 10 - Gráfico boxplot com abundância relativa da família *Clostridiaceae* do grupo controle e grupo da DRGE, com diferença estatisticamente significativa (0,3% versus 2,0%, $p = 0,032$)

Em nível de gênero, os dados de abundância relativa da microbiota estão apresentados na **Tabela 7** e **Figura 11**.

Neste nível, foi observada uma diferença, estatisticamente significativa, na abundância do gênero *Faecaliumbacterium*, entre controles saudáveis e pacientes com DRGE erosiva (10,5% versus 4,5%, $p = 0,045$), como se vê na **Figura 12**.

Tabela 7 - Estatísticas descritivas da *gênero* considerando mediana e percentis 25 e 75 para casos e controle e nível descritivo da estatística baseado no teste de Mann-Whitney

	DRGE			CONTROLE			p
	Mediana	P25	P75	Mediana	P25	P75	
Unassigned;Other;Other;Other;Other;Other	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.241
k__Archaea;p__Euryarchaeota;c__Methanobacteria;o__Methanobacteriales;f__Methanobacteriaceae;g__Methanobrevibacter	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.948
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Bifidobacteriales;f__Bifidobacteriaceae;g__Bifidobacterium	0.6%	0.1%	8.0%	2.6%	0.2%	3.2%	0.742
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Coriobacteriia;o__Coriobacteriales;f__Coriobacteriaceae;g__	0.1%	0.1%	0.2%	0.1%	0.0%	0.3%	0.515
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Coriobacteriia;o__Coriobacteriales;f__Coriobacteriaceae;g__Slackia	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.069
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__g__	0.0%	0.0%	0.7%	0.0%	0.0%	0.0%	0.561
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae;g__Bacteroides	10.1%	4.0%	25.3%	14.5%	7.7%	32.2%	0.375
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Porphyromonadaceae;g__Parabacteroides	0.6%	0.2%	1.0%	1.3%	0.4%	1.4%	0.130
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Prevotellaceae;g__Prevotella	0.5%	0.0%	1.9%	1.5%	0.0%	14.9%	0.486
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Rikenellaceae;g__	0.4%	0.2%	0.6%	0.2%	0.1%	1.4%	0.974
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__S24-7;g__	0.2%	0.0%	1.6%	0.4%	0.0%	1.5%	0.759
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__[Barnesiellaceae];g__	0.3%	0.0%	0.9%	0.2%	0.0%	0.5%	0.920
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__[Odoribacteraceae];g__Butyricimonas	0.1%	0.0%	0.5%	0.2%	0.0%	0.5%	0.523
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__[Odoribacteraceae];g__Odoribacter	0.4%	0.2%	0.9%	0.9%	0.3%	1.4%	0.210
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__[Paraprevotellaceae];g__	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.353
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__[Paraprevotellaceae];g__Paraprevotella	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.164

continua

Tabela 7 - Estatísticas descritivas da *gênero* considerando mediana e percentis 25 e 75 para casos e controle e nível descritivo da estatística baseado no teste de Mann-Whitney

	DRGE			CONTROLE			p
	Mediana	P25	P75	Mediana	P25	P75	
k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f__[Paraprevotellaceae];g__[Prevotella]	0.0%	0.0%	0.4%	0.0%	0.0%	0.8%	0.874
k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f__p-2534-18B5;g__	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.317
k_Bacteria;p_Cyanobacteria;c_4C0d-2;o_YS2;f__;g__	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.922
k_Bacteria;p_Cyanobacteria;c_Chloroplast;o_Streptophyta;f__;g__	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.317
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Lactobacillales;f__Enterococcaceae;Other	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.948
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Lactobacillales;f__Lactobacillaceae;g__	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.317
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Lactobacillales;f__Lactobacillaceae;g__Lactobacillus	0.0%	0.0%	0.8%	0.0%	0.0%	0.3%	0.883
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Lactobacillales;f__Leuconostocaceae;g__Leuconostoc	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.148
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Lactobacillales;f__Streptococcaceae;g__Lactococcus	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.148
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Lactobacillales;f__Streptococcaceae;g__Streptococcus	0.2%	0.0%	0.5%	0.3%	0.1%	0.4%	0.739
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Turicibacterales;f__Turicibacteraceae;g__Turicibacter	0.0%	0.0%	0.1%	0.1%	0.0%	0.1%	0.712
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;Other;Other	0.2%	0.1%	0.6%	0.3%	0.1%	0.5%	0.643
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f__;g__	3.9%	1.4%	17.0%	4.4%	2.9%	10.9%	0.922
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f__Christensenellaceae;g__	0.0%	0.0%	1.9%	0.1%	0.0%	0.3%	1.000
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f__Clostridiaceae;g__	2.0%	0.5%	5.3%	0.3%	0.2%	1.3%	0.041
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f__Clostridiaceae;g__Clostridium	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.275

continua

Tabela 7 - Estatísticas descritivas da *gênero* considerando mediana e percentis 25 e 75 para casos e controle e nível descritivo da estatística baseado no teste de Mann-Whitney

	DRGE			CONTROLE			p
	Mediana	P25	P75	Mediana	P25	P75	
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Dehalobacteriaceae;g_Dehalobacterium	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.147
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;Other	0.6%	0.4%	0.9%	0.6%	0.3%	1.2%	0.817
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g__	8.6%	3.6%	11.8%	9.0%	4.5%	13.9%	0.622
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_Anaerostipes	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.1%	0.551
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_Blautia	3.1%	1.1%	7.1%	2.0%	1.2%	4.3%	0.599
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_Coproccoccus	1.0%	0.9%	1.3%	1.5%	0.4%	2.5%	0.488
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_Dorea	0.8%	0.4%	1.0%	0.5%	0.1%	1.4%	0.211
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_Lachnospira	0.5%	0.2%	1.3%	0.3%	0.2%	1.5%	0.621
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_Oribacterium	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.000
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_Roseburia	1.4%	0.2%	2.9%	0.7%	0.2%	1.4%	0.469
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_[Ruminococcus]	0.4%	0.2%	0.9%	0.2%	0.1%	1.1%	0.531
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Peptococcaceae;g__	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.280
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Peptococcaceae;g_Peptococcus	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.509
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Peptococcaceae;g_rc4-4	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.069
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Ruminococcaceae;g__	5.8%	3.1%	11.4%	6.8%	2.7%	10.0%	0.948
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Ruminococcaceae;g_Faecalibacterium	4.5%	3.6%	16.9%	10.5%	6.2%	14.9%	0.045

continua

Tabela 7 - Estatísticas descritivas da *gênero* considerando mediana e percentis 25 e 75 para casos e controle e nível descritivo da estatística baseado no teste de Mann-Whitney

	DRGE			CONTROLE			p
	Mediana	P25	P75	Mediana	P25	P75	
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Ruminococcaceae;g_Oscillospira	0.5%	0.3%	0.8%	0.5%	0.3%	0.8%	0.842
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Ruminococcaceae;g_Ruminococcus	1.0%	0.6%	1.7%	1.9%	0.4%	2.4%	0.532
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Veillonellaceae;g__	0.1%	0.0%	0.4%	0.0%	0.0%	0.0%	0.019
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Veillonellaceae;g_Acidaminococcus	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.3%	0.468
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Veillonellaceae;g_Anaerovibrio	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.317
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Veillonellaceae;g_Dialister	0.0%	0.0%	2.2%	0.4%	0.0%	1.1%	0.408
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Veillonellaceae;g_Megamonas	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.317
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Veillonellaceae;g_Megasphaera	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.922
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Veillonellaceae;g_Mitsuokella	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.948
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Veillonellaceae;g_Phascolartobacterium	0.0%	0.0%	0.8%	0.0%	0.0%	0.7%	0.971
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Veillonellaceae;g_Veillonella	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.147
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_[Mogibacteriaceae];g__	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.1%	0.852
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Erysipelotrichi;o_Erysipelotrichales;f_Erysipelotrichaceae;g__	0.1%	0.0%	0.2%	0.1%	0.0%	0.1%	0.755
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Erysipelotrichi;o_Erysipelotrichales;f_Erysipelotrichaceae;g_Catenibacterium	0.0%	0.0%	0.1%	0.1%	0.0%	0.4%	0.159
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Erysipelotrichi;o_Erysipelotrichales;f_Erysipelotrichaceae;g_RFN20	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.317
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Erysipelotrichi;o_Erysipelotrichales;f_Erysipelotrichaceae;g_[Eubacterium]	0.1%	0.0%	0.6%	0.0%	0.0%	0.6%	0.916

continua

Tabela 7 - Estatísticas descritivas da *gênero* considerando mediana e percentis 25 e 75 para casos e controle e nível descritivo da estatística baseado no teste de Mann-Whitney

[illegible]

Figura 11 - Abundância relativa e classificação taxonômica, em nível de gênero, em amostras fecais obtidas de pacientes do grupo controle e da DRGE

Figura 12 - Gráfico *boxplot* com abundância relativa do gênero *Faecalibacterium* do grupo controle e grupo da DRGE, com diferença estatisticamente significativa (10,5% versus 4,5%, $p = 0,045$)

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

Este estudo avaliou a microbiota intestinal, através do sistema de sequenciamento genético de nova geração Ion PGM TorrentTM, de pacientes com DRGE erosiva e voluntários saudáveis. Este método de avaliação da microbiota tem a vantagem de oferecer descrição taxonômica com técnica independente de cultivo. Apenas pequena parcela dos microrganismos (em torno de 1%) é cultivável em laboratório pelas técnicas padrões de cultivo ⁽⁶⁰⁾. Isto permitiu uma avaliação mais global da comunidade bacteriana das nossas amostras.

A doença do refluxo gastroesofágico vem apresentando aumento na sua prevalência nas últimas décadas, particularmente na América do Norte e no Leste da Ásia ⁽¹⁾. Possui fisiopatologia complexa e multifatorial. O tratamento farmacológico, com uso principalmente de inibidores de bomba de prótons, tem eficácia comprovada na melhora sintomática e endoscópica ⁽⁶⁾.

O desequilíbrio da microbiota do trato gastrointestinal pode ter importante impacto em mecanismos que estão diretamente relacionados com a fisiopatologia da DRGE ^(83–85). De fato, a disbiose intestinal vem sendo descrita como fator de risco para esta doença ^(86–88).

As bactérias presentes no cólon são as principais responsáveis pela produção de gases (principalmente nitrogênio, oxigênio, dióxido de carbono, hidrogênio e metano), através da fermentação de carboidratos não-digeríveis

⁽⁴⁹⁾. Vários autores observaram que desequilíbrio nesta microbiota é capaz de aumentar a produção destes gases intraluminais, levando à elevação da pressão intra-abdominal, distensão gástrica e aumento da frequência de relaxamentos transitórios do EEI ^(50–52, 88). Ocorre, então, maior exposição do epitélio esofágico ao refluxo de material gástrico e duodenal, aumentando risco de esofagite erosiva ^(89, 90).

Estudos recentes, utilizando métodos indiretos de avaliação de supercrescimento bacteriano intestinal, observaram esta relação. Kwang-Min Kim et al. realizaram estudo para avaliar se a esofagite erosiva está relacionada com o supercrescimento bacteriano do intestino delgado. Foram analisados vinte e oito pacientes com esofagite erosiva na EDA e vinte e nove indivíduos sem esofagite erosiva, pareados por sexo e idade. Todos foram submetidos a EDA e ao teste respiratório de hidrogênio expirado com lactulose. Testes respiratórios indicaram supercrescimento em 67% dos pacientes com esofagite erosiva, em comparação com 37% do grupo controle, com diferença estatisticamente significativa ⁽⁸⁶⁾.

Urita et al. avaliaram a produção de hidrogênio e metano no trato digestivo alto de 793 pacientes (270 homens e 523 mulheres, entre 19 e 85 anos de idade). Eles foram submetidos a endoscopia digestiva alta e foi encontrada esofagite de refluxo em 147 dos 793 pacientes. Antes do exame, foi coletado uma amostra de ar exalado. Durante o exame, o aparelho foi introduzido sem insuflação, sendo então coletados 20 ml de gás da câmara gástrica e 20 ml da segunda porção duodenal. A concentração de hidrogênio e metano de cada amostra foi medida através de cromatografia gasosa.

Níveis elevados destes gases foram mais frequentemente encontrados em pacientes com esofagite de refluxo. Os pesquisadores concluíram que a presença de fermentação no trato digestivo foi considerada um fator de risco para o desenvolvimento de esofagite de refluxo ⁽⁸⁷⁾.

Piche et al. observaram que a fermentação colônica de carboidratos não-digeríveis, pela microbiota intestinal, levou a maior taxa de relaxamentos transitórios do EIE, maior número de episódios de refluxo ácido e de sintomas de DRGE ⁽⁸⁸⁾. A disbiose bacteriana no TGI pode levar também à desconjugação de ácidos biliares, achado que pode ter implicações na fisiopatologia da lesão da mucosa gastroesofágica ⁽⁹¹⁾.

Em recente estudo, Qing-Hua Sun et al. observaram que uso de probióticos, associados ao inibidor da bomba de prótons, tem efeito benéfico no tratamento da esofagite de refluxo, com redução de recidivas ⁽⁹²⁾.

A ligação entre a disbiose intestinal e a DRGE, no entanto, permanece pouco documentada. Este estudo avalia a microbiota bacteriana intestinal em pacientes com DRGE erosiva e em indivíduos saudáveis.

Primeiramente, na seleção dos participantes, foram excluídas várias situações que poderiam interferir na composição da microbiota intestinal, como uso recente de inibidor de bomba de prótons, uso de antibióticos ou probióticos, gastrite atrófica severa ou extensa, cirurgias do trato gastrointestinal, comorbidades ou medicações que interferissem na motilidade do trato gastrointestinal, entre outros já mencionados. Além disso, considerando que estudos recentes demonstraram que a microbiota intestinal é sensível a mudanças de clima e dieta, foi tomado o cuidado de

incluir participantes moradores da mesma região do país e sem viagens recentes de longa distância ^(93–96).

As coletas das amostras fecais foram descritas na seção de casuística e métodos e ressalta-se que Ribeiro et al., no ano de 2017, no Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, realizaram estudo para testar a conservação do DNA de amostras fecais humana, onde concluíram que a solução de guanidina é eficaz para a conservação do material para estudos de microbiota intestinal ⁽⁹⁷⁾.

Analisando os dados sociodemográficos dos participantes, não houve diferença, entre os dois grupos, quanto ao sexo, idade, peso, altura e IMC.

Após o processo de sequenciamento genético e descrição taxonômica completa, os dados foram analisados com auxílio do software QIIME™. Existem mais de 50 filos já identificados em nosso meio. Em estudos de caracterização da microbiota, em seres humanos, os filos dominantes são apenas quatro, sendo eles *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria* ⁽⁹⁸⁾. Nossos resultados estão de acordo com a literatura, revelando maior abundância desses quatro filos na microbiota intestinal dos pacientes de ambos os grupos.

Nossos resultados mostraram ainda que não houve diferença na beta-diversidade entre os dois grupos, não sendo observada formação de *clusters* no gráfico de PCoA (Figura 5). Também não houve diferença na alfa-diversidade (Figura 4). Assim, considerando a biodiversidade global, os dois grupos apresentaram microbiotas intestinais semelhantes no que diz

respeito ao número total de espécies, à composição dessas espécies e a suas abundâncias relativas.

Contudo, ao avaliar cada nível taxonômico, foi observada maior abundância relativa da família *Clostridiaceae* e menor abundância relativa do gênero *Faecalibacterium*, no grupo de pacientes com DRGE erosiva. (Figuras 10 e 12).

Até o momento, o *Faecalibacterium prausnitzii* é a única espécie identificada no gênero *Faecalibacterium*. Este é o principal representante do filo *Firmicutes*, classe de *Clostridium*, família *Ruminococcaceae*. Em humanos, o gênero *Faecalibacterium* é dividido em dois filogrupos diferentes, embora ainda não se saiba se apresentam funções fisiológicas diferentes ⁽⁹⁹⁾. *F. prausnitzii* é bactéria extremamente sensível ao oxigênio, sendo difícil de se cultivar, mesmo em condições anaeróbicas ⁽¹⁰⁰⁾. Atualmente, é aceito que *F. prausnitzii* é responsável por aproximadamente 5% da microbiota fecal total em adultos saudáveis, podendo chegar até 15% em alguns indivíduos ⁽¹⁰¹⁾. A presença do *F. prausnitzii* já foi descrita no trato gastrointestinal de vários mamíferos. A abundância e onipresença de *F. prausnitzii* sugerem que este é membro funcionalmente importante da microbiota, apresentando impacto positivo na fisiologia e saúde do hospedeiro. Alterações na abundância desta bactéria já foram amplamente descritos em diferentes doenças intestinais e metabólicas em seres humanos, como doença de Crohn, doença celíaca, síndrome do intestino irritável, obesidade, câncer colorretal, doenças atópicas, entre outras ^(99, 102). Os efeitos benéficos do *F. prausnitzii*, vêm da sua capacidade de produzir

butirato, o qual modula favoravelmente o sistema imune intestinal, o estresse oxidativo e o metabolismo dos colonócitos ^(102, 103). O butirato pode exercer atividade anti-inflamatória na mucosa colônica promovendo diferenciação regulatória de células T. Além disso, *F. prausnitzii* demonstrou secretar compostos antiinflamatórios, como o ácido salicílico ⁽¹⁰⁴⁾. Em estudo recente, foram identificados sete peptídeos que derivam de uma única molécula anti-inflamatória microbiana, uma proteína de 15 kDa, presentes no sobrenadante de culturas de *F. prausnitzii*, capazes de bloquear a via do NF-kB ⁽¹⁰⁴⁾. Duarte et al. observaram que menor abundância de *F. prausnitzii* intestinal favoreceu o desenvolvimento de esteatohepatite, em pacientes magros, devido à geração de ambiente pró-inflamatório ⁽¹⁰⁵⁾. P. Stärkel et al. observaram que pacientes com menor abundância de *F. prausnitzii* apresentaram níveis plasmáticos mais elevados de interleucina 8, concluindo que alterações na composição microbiana estão associadas com aumento da permeabilidade intestinal e elevação dos níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias ⁽¹⁰⁶⁾. Sokol et al. observaram redução de *F. prausnitzii* em pacientes com Doença de Crohn e demonstraram que a administração oral de *Faecalibacterium prausnitzii* reduziu a gravidade da colite ⁽¹⁰⁷⁾. Rebeca Marin et al. observaram que administração de *Faecalibacterium prausnitzii* foi capaz de restaurar níveis de serotonina em cólon de ratos com inflamação crônica de baixo grau ⁽¹⁰⁸⁾. Embora a serotonina não seja um marcador direto da motilidade, ela estimula o peristaltismo, a secreção, a vasodilatação e a sinalização sensorial no intestino, regulando direta e indiretamente a motilidade intestinal ⁽¹⁰⁹⁾.

Quanto à família *Clostridiaceae*, sabe-se que é importante representante da Ordem *Clostridiales*, Classe de *Clostridia*, filo *Firmicutes*. Ao contrário do *F. prausnitzii*, possui poucos estudos que relacionam alterações na sua abundância com contextos patológicos. Porém, maior abundância desta família já foi descrita em contextos patológicos pró-inflamatórios. Muñiz Pedrego et al. observaram maior abundância de *Clostridiaceae* em pacientes com doença inflamatória intestinal e em pacientes com artrite reumatoide ⁽¹¹⁰⁾. Maior abundância de *Clostridiaceae* também foi observado em lactentes com alergia alimentar ⁽¹¹¹⁾.

Portanto, considerando o papel ativo da microbiota intestinal na regulação do metabolismo do hospedeiro, menor abundância do gênero *Faecalibacterium* e maior abundância da família *Clostridiaceae* podem gerar ambiente pró-inflamatório, com consequências diretas no funcionamento do trato gastrointestinal. Barbara et al. identificaram três mecanismos pelos quais a microbiota poderia influenciar na função do intestino: a) através da liberação de substâncias bacterianas ou produtos finais da fermentação bacteriana, b) via fatores neuroendócrinos intestinais, c) indiretamente, através dos efeitos dos mediadores liberados pela resposta imune do intestino ⁽⁸⁵⁾. No segmento superior do aparelho digestivo, podem surgir alterações motoras esôfago-gástricas que prejudiquem a adequada depuração esofagiana, o adequado esvaziamento gástrico, com disfunção da barreira anti-refluxo ⁽⁸⁸⁾. Consideramos, assim, que os resultados encontrados abrem novos horizontes na pesquisa da fisiopatologia e do tratamento da DRGE.

Como consideração relevante, no contexto dos nossos resultados, foi considerada a possibilidade de que a redução da abundância de *Faecalibacterium*, nos nossos resultados, possa ser devido ao possível uso prévio de IBP por parte dos pacientes com DRGE. Alguns estudos observaram que o uso de IBP pode estar associado à redução da abundância de *Faecalibacterium* na microbiota intestinal. Tomohisa Takagi et al. observaram redução da abundância do *Faecalibacterium* em pacientes em uso prolongado de IBP ⁽¹¹²⁾. Tsuda et al. também demonstraram que a abundância de *Faecalibacterium* foi menor nos usuários de IBP em comparação em não usuários de IBP ⁽¹¹³⁾. Garcia-Mazcorro et al. demonstraram que o omeprazol diminuiu o *Faecalibacterium* em cães machos saudáveis ⁽¹¹⁴⁾. No nosso estudo, a fim de reduzir a influência dos IBP na microbiota intestinal, os indivíduos deviam estar sem uso de IBP há 30 dias, no mínimo. Charlie T. Seto et al. observaram que houve recuperação da microbiota intestinal trinta dias após suspender o uso de IBP. Porém, ainda são necessários mais estudos para melhor avaliação das alterações provocadas pelos IBP na microbiota intestinal ⁽¹¹⁵⁾.

Em nossos resultados, alguns níveis taxonômicos não exibiram diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos. Porém, possuem reconhecida influência na saúde do trato intestinal.

Por exemplo, as abundâncias relativas do gênero *Prevotella* foram de 1,5% e 0,5% ($p = 0,486$), nos controles saudáveis e pacientes com DRGE erosiva, respectivamente. *Prevotella* é gênero amplo, com alta diversidade de espécies que podem ter altos níveis de diversidade genômica entre

cepas. Na população humana, há certa incerteza de como a *Prevotella* atua no intestino. Para melhor compreender sua função, será necessária compreensão mais refinada do potencial genético de suas espécies, sua ecologia, interações com outros microrganismos e com o próprio anfitrião ⁽¹¹⁶⁾. A dieta ocidental pode reduzir a abundância de *Prevotella* intestinal. De fato, microbiotas intestinais de americanos e europeus, que seguem uma dieta ocidental, tendem a ser dominados por *Bacteroides* e *Clostridiales*, enquanto as populações rurais, com uma dieta rica em fibras e com poucas proteínas, tendem a ser dominadas pela *Prevotella* ^(117, 118). Em alguns estudos, o gênero *Prevotella* tem sido associado a condições inflamatórias ^(119, 120). Dois estudos recentes, utilizando o sequenciamento 16S rRNA de amostras fecais, encontraram disbiose associada a cepas de *Prevotella* em pacientes com episódios de exacerbação de artrite reumatoide ^(119, 121). Estudos observaram papel da *Prevotella* na indução de colite experimental em camundongos ^(122, 123). Embora o papel do *Prevotella*, na doença inflamatória intestinal, seja convincente nos estudos de colite experimental em camundongos, atualmente nenhum estudo forneceu uma associação entre o aumento da abundância deste gênero e a doença, em humanos ⁽¹²⁴⁾. De fato, estudos observaram menor abundância de *Prevotella* na Doença de Crohn pediátrica e em população adulta ^(125, 126). Além disso, recente e abrangente estudo não encontrou associação entre *Prevotella* e Doença de Crohn de início recente ^(127, 128). Considerando estes resultados conflitantes, não é possível, até o momento, tirar conclusões definitivas quanto ao seu papel na homeostase intestinal.

Outro gênero muito pesquisado é o *Bifidobacterium*. Alguns estudos observaram alívio significativo da constipação intestinal com uso de cepas probióticas, únicas ou combinadas, de *bifidobacterium* (*B. longum*, *B. infantis* e *B. breve*)^(129, 130, 131, 132). Tabbers et al. observaram que, com quantidades adequadas de bifidobactérias no intestino, pode haver fermentação de oligossacarídeos e produção de acético ácido e ácido lático, promovendo o peristaltismo intestinal, evacuações e alívio da constipação⁽¹³³⁾. O gênero *bifidobacterium* pode também melhorar sintomas de constipação através do aumento da concentração de ácido acético e da abundância relativa de *Lactobacillus* e da redução do conteúdo de *Alistipes*, *Odoribacter* e *Clostridium*. Vários estudos investigaram a microbiota gastrointestinal na constipação, bem como na síndrome do intestino irritável com constipação. Em adultos, esses estudos demonstram consistentemente diminuição de bifidobactérias e lactobacilos e aumento de *Bacteroidetes*^(134, 135, 136). Cepas de *Bifidobacterium* com propriedade de adesão podem aliviar a constipação com eficiência, melhorando o conteúdo de água, propionato e butirato nas fezes e o tempo geral de trânsito gastrointestinal⁽¹³⁷⁾. Além disso, observou-se que a suplementação com *Bifidobacterium Lactis* pode ser boa opção para melhora clínica de sintomas de dispepsia⁽¹³⁸⁾. Contudo, estudo que utilizou suplementos probióticos com *Bifidobacterium Lactis* observou que nem todos os microrganismos têm os mesmos efeitos no hospedeiro, podendo haver variação de efeitos encontrados de uma cepa probiótica para outra⁽¹³⁹⁾. No nosso estudo, as abundâncias relativas do gênero *Bifidobacterium* foram de 2,6% e 0,6% ($p = 0,486$), nos controles saudáveis

e pacientes com DRGE erosiva, respectivamente. Apesar de não ter havido diferença significativa, considerando o potencial do *Bifidobacterium* de promover peristalse e de impacto no tempo de trânsito intestinal, pode-se indagar se a menor proporção deste gênero, no grupo da DRGE, pode ter impacto no contexto desta patologia.

Destaca-se, também, o filo *Actinobacteria* que, apesar de representar grupo minoritário de bactérias comensais, desempenha papel central na homeostase intestinal. Sua influência é proposta na modulação da permeabilidade intestinal, sistema imunológico, metabolismo e eixo intestinal-cérebro ⁽¹⁴⁰⁾. Variações em sua abundância foram observadas em condições patológicas. Por exemplo, algumas bactérias do filo *Actinobacteria* são conhecidas como degradadoras de mucina, estando associadas ao comprometimento da barreira intestinal em caso de disbiose. Su Jeong Kim et al. observaram que as actinobactérias se mostraram inversamente relacionadas com presença de proteínas da *tight junction* (como a E-caderina), e positivamente associadas a citocinas pró-inflamatórias ⁽¹⁴¹⁾. As *tight junction* são as principais responsáveis pela manutenção da barreira da permeabilidade endotelial, regulando a passagem de íons e solutos entre as células pela via paracelular ⁽¹⁴²⁾. Portanto, desequilíbrios envolvendo este filo têm papel no comprometimento da barreira intestinal, com potencial inflamação do cólon. Por esse motivo, o interesse no uso da *Actinobacteria* como probiótico, especialmente da família *Bifidobacteria*, está aumentando constantemente. Esse grupo pode representar parte significativa da próxima geração de probióticos, com potencial eficácia, tanto em doenças intestinais,

quanto em distúrbios extra-intestinais ⁽¹⁴⁰⁾. No nosso estudo, as abundâncias relativas do filo *Actinobacteria* foram de 3,2% e 0,6% ($p = 0,748$), nos controles saudáveis e pacientes com DRGE erosiva, respectivamente.

Alguns estudos propuseram que a *Razão Firmicutes/Bacteroidetes* está alterada em condições patológicas. Bervoets et al. demonstraram que a microbiota de crianças obesas possui maior *Razão Firmicutes/Bacteroidetes* em comparação com microbiota de crianças magras ⁽¹⁴³⁾. Riva et al. observaram que obesidade está associada a níveis elevados de *Firmicutes* e níveis reduzidos de *Bacteroidetes* ⁽¹⁴⁴⁾. Estudos avaliando pacientes com síndrome do intestino irritável revelaram variações de filos e gêneros, com elevação da *Razão Firmicutes/Bacteroidetes* ^(145, 146). Diferenças na relação entre *Firmicutes* e *Bacteroidetes* também foram observadas em doenças como diabetes tipo 2 e autismo ^(147, 148). Nos nossos pacientes, o filo Firmicutes foi mais abundante no grupo com DRGE e o filo Bacteroidetes no grupo nos controles saudáveis, porém sem diferença estatisticamente significativa. Ao analisar a *Razão Firmicutes/Bacteroidetes*, não foi observada diferença entre controles saudáveis e pacientes com DRGE erosiva, respectivamente (1,26 versus 2,05, $p = 0,30$).

Nossos resultados contribuem também fornecendo informações sobre a microbiota intestinal da população brasileira, visto que a vasta maioria das pesquisas, neste campo, é realizada em outros países. Pouco se sabe sobre como a microbiota intestinal varia em diferentes regiões do planeta. Porém, já foi demonstrado que existe considerável variação entre regiões geográficas ^(89, 90, 91). Neste cenário, o Brasil apresenta combinação única de

grande distribuição demográfica, com grande diversidade de climas, dietas e costumes. Hoffmann Sardá et al. avaliaram a microbiota intestinal de voluntários brasileiros saudáveis e sua relação com diferentes populações. O grupo avaliou amostras fecais de 54 pacientes, utilizando método de sequenciamento genético utilizando o 16S RNA ribossomal. Dois “clusters” de indivíduos foram detectados na microbiota intestinal de brasileiros, sendo um com maior prevalência do gênero *Prevotella* (*Cluster A*) e outro com maior prevalência do gênero *Bacteroides* (*Cluster B*), contendo 45% e 55% dos indivíduos, respectivamente. Indivíduos brasileiros do *cluster A* segregaram com indivíduos ameríndios do Malaui/Venezuela. Os indivíduos do *cluster B* segregaram com indivíduos dos EUA, uma população fortemente industrializada. Concluíram, assim, que diferenças de microbiota intestinal podem estar associadas ao nível de industrialização do local. Outros estudos também observaram diferenças marcantes na microbiota intestinal entre populações industrializadas e rurais ^(92, 93, 94, 95). Também já foram observadas diferenças entre comunidades ocidentais e não-ocidentais ^(156, 157). Em nosso estudo, todos os indivíduos estudados são residentes da mesma região do país e de regiões industrializadas. Semelhantemente ao estudo de Hoffmann Sardá et al., os gêneros dominantes, em ambos os grupos, foram o *Bacteroides*, a *Prevotella* e o *Faecalibacterium*, em ordem decrescente.

Este estudo apresenta limitações. Primeiramente, não foram realizados inquéritos alimentares, os quais podem ser utilizados em estudos de avaliação da microbiota intestinal, visto que a dieta tem influência na

composição bacteriana ^(158, 159). Os participantes do estudo são residentes da mesma região do país, reduzindo possível variação expressiva de tipos de dieta. Em segundo lugar, não foram avaliadas frequência e consistência das fezes dos participantes, fatores que podem ter impacto na composição da microbiota intestinal ⁽⁴⁵⁾. Terceiro, de acordo com o Consenso de Lyon, a esofagite erosiva grau A e B são menos precisas para o diagnóstico da doença do refluxo gastroesofágico ⁽¹⁶⁰⁾. Também não houve avaliação metabolômica das amostras, sendo os métodos mais utilizados a espectrometria de massa, ressonância nuclear magnética ou espectroscopia. Além disso, o tamanho da amostra é pequeno, o que impede de considerar os resultados encontrados válidos para outras populações. Por último, não foi realizada avaliação de tempo esvaziamento gástrico, exame que pode ser útil considerando a influência do padrão motor do TGI sobre a microbiota.

Nossos resultados requerem investigações adicionais através de mais e maiores estudos, utilizando abordagens metabolômicas, com suas consequências na saúde do trato gastrointestinal, a fim de esclarecer o impacto da microbiota intestinal nos mecanismos fisiopatológicos da DRGE.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados neste estudo, pode-se concluir que:

- a) Não houve diferença estatisticamente significativa na alfa e beta diversidades da microbiota intestinal de pacientes com DRGE e voluntários saudáveis.
- b) A abundância relativa da família *Clostridiaceae* foi maior em pacientes com DRGE que em voluntários saudáveis, com diferença estatisticamente significativa.
- c) A abundância relativa do gênero *Faecalibacterium* foi menor em pacientes com DRGE que em voluntários saudáveis, com diferença estatisticamente significativa.

8 Referências

8 REFERÊNCIAS

1. Sandhu DS, Fass R. Current trends in the management of gastroesophageal reflux disease. *Gut Liver*. 2018;12(1):7-16.
2. Moraes-Filho JPP, Navarro-Rodriguez T, Barbuti R, Eisig J, Chinzon D, Bernardo W; Brazilian Gerd Consensus Group. Guidelines for the diagnosis and management of gastroesophageal reflux disease: An evidence-based consensus. *Arq Gastroenterol*. 2010;47(1):99-115.
3. Badillo R, Francis D. Diagnosis and treatment of gastroesophageal reflux disease. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*. 2014;5(3):105-12.
4. Smith JL, Opekun AR, Larkai E, Graham DY. Sensitivity of the esophageal mucosa to pH in gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology*. 1989;96(3):683-9.
5. Biccás BN, Lemme EMO, Abrahão Jr LJ, Agüero GC, Alvariz Â, Schechter RB. [Higher prevalence of obesity in erosive gastroesophageal reflux disease]. *Arq Gastroenterol*. 2009;46(1):15-9.
6. Bordin DS. [The acid pocket as the pathogenic basis and therapeutic target in gastroesophageal reflux disease]. *Ter Arkh*. 2014;86(2):76-81.
7. Sifrim D. Relevance of volume and proximal extent of reflux in gastroesophageal reflux disease. *Gut*. 2005;54(2):175-8.
8. Chinzon D, Rossini ARA, Kiburd B, Navarro-Rodrigues T, Barbuti RC, Hashimoto CL, Eisig JN, Moraes-Filho JPP. Refluxo gastroesofágico: diagnóstico e tratamento. Projeto Diretrizes. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. 2003;1-18.

9. Barbuti RC, Morais-Filho J. Doença do refluxo gastroesofágico. *Rev Bras Med.* 2010;67(12):67-75.
10. Hunt R, Armstrong D, Katelaris P, Afihene M, Bane A, Bhatia S, Chen MH, Choi MG, Melo AC, Fock KM, Ford A, Hongo M, Khan A, Lazebnik L, Lindberg G, Lizarzabal M, Myint T, Moraes-Filho JP, Salis G, Lin JT, Vaidya R, Abdo A, LeMair A, Review Team. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: GERD Global Perspective on Gastroesophageal Reflux Disease. *J Clin Gastroenterol.* 2017;51(6):467-78.
11. Tytgat GN. Long-term therapy for reflux esophagitis. *N Engl J Med.* 1995;333(17):1148-50.
12. Dal-Paz K, Moraes-Filho JP, Navarro-Rodriguez T, Eisig JN, Barbuti R, Quigley EM. Low levels of adherence with proton pump inhibitor therapy contribute to therapeutic failure in gastroesophageal reflux disease. *Dis Esophagus.* 2012;25(2):107-13.
13. Fass R, Gasiorowska A. Refractory GERD: What is it? *Curr Gastroenterol Rep.* 2008;10(3):252-7.
14. Subramanian C, Triadafilopoulos G. Refractory gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterol Rep.* 2015;13(1):41-53.
15. Guinane CM, Cotter PD. Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ. *Therap Adv Gastroenterol.* 2013;6(4):295-308.
16. Lloyd-Price J, Mahurkar A, Rahnavard G, Crabtree J, Orvis J, Hall AB, Brady A, Creasy HH, McCracken C, Giglio MG, McDonald D, Franzosa EA, Knight R, White O, Huttenhower C. Strains, functions and dynamics in the expanded Human Microbiome Project. *Nature.* 2017; 550(7674):61-6.

17. Seifert A, Kashi Y, Livney YD. Delivery to the gut microbiota: A rapidly proliferating research field. *Adv Colloid Interface Sci.* 2019;274:102038.
18. Hong SN, Rhee PL. Unraveling the ties between irritable bowel syndrome and intestinal microbiota. *World J Gastroenterol.* 2014;20(10):2470-81.
19. Turroni F, Duranti S, Milani C, Lugli GA, van Sinderen D, Ventura M. *Bifidobacterium bifidum*: a key member of the early human gut microbiota. *Microorganisms.* 2019;7(11):544.
20. Conlon M, Bird A. The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. *Nutrients.* 2014;7(1):17-44.
21. Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev.* 2010;90(3):859-904.
22. Bull MJ, Plummer NT. Part 1: The human gut microbiome in health and disease. *Integr Med (Encinitas).* 2014;13(6):17-22.
23. Ramakrishna BS. The normal bacterial flora of the human intestine and its regulation. *J Clin Gastroenterol.* 2007;41:S2-S6.
24. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol.* 2015;21(29):8787-803.
25. Frank DN, St. Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(34):13780-5.

-
26. Tanaka M, Nakayama J. Development of the gut microbiota in infancy and its impact on health in later life. *Allergol Int.* 2017;66(4):515-22.
 27. Collado MC, Rautava S, Aakko J, Isolauri E, Salminen S. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Sci Rep.* 2016;6:23129.
 28. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, Knight R. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(26):11971–5.
 29. Stinson LF, Payne MS, Keelan JA. A critical review of the bacterial baptism hypothesis and the impact of cesarean delivery on the infant microbiome. *Front Med (Lausanne).* 2018;5:135.
 30. Dunn AB, Jordan S, Baker BJ, Carlson NS. The maternal infant microbiome: considerations for labor and birth. *MCN Am J Matern Child Nurs.* 2017;42(6):318-25.
 31. Voreades N, Kozil A, Weir TL. Diet and the development of the human intestinal microbiome. *Front Microbiol.* 2014;5:494.
 32. Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Baldassano RN, Anokhin AP, Heath AC, Warner B, Reeder J, Kuczynski J, Caporaso JG, Lozupone CA, Lauber C, Clemente JC, Knights D, Knight R, Gordon JI. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature.* 2012;486(7402):222-7.
 33. Arboleya S, Watkins C, Stanton C, Ross RP. Gut bifidobacteria populations in human health and aging. *Front Microbiol.* 2016;7:1204.

34. Bergström A, Skov TH, Bahl MI, Roager HM, Christensen LB, Ejlerskov KT, Mølgaard C, Michaelsen KF, Licht TR. Establishment of intestinal microbiota during early life: A longitudinal, explorative study of a large cohort of Danish infants. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(9):2889-900.
35. Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, Feng Q, Jia H, Kovatcheva-Datchary P, Li Y, Xia Y, Xie H, Zhong H, Tanweer Khan MT, Zhang J, Li J, Xiao L, Al-Aama J, Zhang D, Lee YS, Kotowska D, Colding C, Tremaroli V, Yin Y, Bergman S, Xu X, Madsen L, Kristiansen K, Dahlgren J, Wang J. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host Microbe*. 2015;17(6):852
36. Dogra S, Sakwinska O, Soh SE, Ngom-Bru C, Brück WM, Berger B, Brüssow H, Lee YS, Yap F, Chong YS, Godfrey KM, Joanna D Holbrook JD; GUSTO Study Group. Dynamics of infant gut microbiota are influenced by delivery mode and gestational duration and are associated with subsequent adiposity. *mBio*. 2015;6(1):e02419-14.
37. Zoetendal EG, Akkermans ADL, Akkermans-van Vliet WM, De Visser JAGM, De Vos WM. The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. *Microb Ecol Health Dis*. 2001;13(3):129-34.
38. Dethlefsen L, Eckburg PB, Bik EM, Relman DA. Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends Ecol Evol*. 2006;21(9):517-23.
39. Clish CB. Metabolomics: an emerging but powerful tool for precision medicine. *Cold Spring Harb Mol Case Stud*. 2015;1(1):a000588.
40. Mandal R, Chamot D, Wishart DS. The role of the Human Metabolome Database in inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis*. 2018;41(3):329-36.

41. Tuddenham S, Sears CL. The intestinal microbiome and health. *Curr Opin Infect Dis.* 2015;28(5):464-70.
42. Young VB, Schmidt TM. Antibiotic-associated diarrhea accompanied by large-scale alterations in the composition of the fecal microbiota. *J Clin Microbiol.* 2004;42(3):1203-6.
43. Jernberg C, Sullivan Å, Edlund C, Jansson JK. Monitoring of antibiotic-induced alterations in the human intestinal microflora and detection of probiotic strains by use of terminal restriction fragment length polymorphism. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(1):501-6.
44. Greenwood C, Morrow AL, Lagomarcino AJ, Altaye M, Taft DH, Yu Z, Newburg DS, Ward DV, Schibler KT. Early empiric antibiotic use in preterm infants is associated with lower bacterial diversity and higher relative abundance of enterobacter. *J Pediatr.* 2014;165(1):23-9.
45. Vandeputte D, Falony G, Vieira-Silva S, Tito RY, Joossens M, Raes J. Stool consistency is strongly associated with gut microbiota richness and composition, enterotypes and bacterial growth rates. *Gut.* 2016;65(1):57-62.
46. Brüssow H. Problems with the concept of gut microbiota dysbiosis. *Microb Biotechnol.* 2020;13(2):423-34.
47. Knudsen JK, Bundgaard-Nielsen C, Hagstrøm S, Sørensen S, Leutscher P. [The human gut microbiota]. *Ugeskr Laeger.* 2017;179(49):V05170378.
48. Ferreira CM, Vieira AT, Vinolo MAR, Oliveira FA, Curi R, Martins F dos S. The central role of the gut microbiota in chronic inflammatory diseases. *J Immunol Res.* 2014;2014:689492.

-
49. Urita Y, Watanabe T, Takemoto I, Sasaki Y, Maeda T, Matsumoto M, Honda Y, Shimada N, Nakajima H, Sugimoto M. Intraluminal gas and gastrointestinal diseases. In: Yoshikawa T, Naito Y. Gas biology research in clinical practice. Basel: Karger; 2011. p. 6-14.
50. Holloway RH, Hongo M, Berger K, McCallum RW. Gastric distention: a mechanism for postprandial gastroesophageal reflux. *Gastroenterology*. 1985;89(4):779-84.
51. Hirsch DP, Mathus-Vliegen EMH, Dagli U, Tytgat GNJ, Boeckxstaens GEE. Effect of prolonged gastric distention on lower esophageal sphincter function and gastroesophageal reflux. *Am J Gastroenterol*. 2003;98(8):1696-704.
52. Zerbib F, Bicheler V, Leray V, Joubert M, Bruley des Varannes S, Galmiche JP. H. pylori and transient lower esophageal sphincter relaxations induced by gastric distension in healthy humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001;281(2):G350-6.
53. Samosir DRS, Lesmana L, Abdullah M. Delayed gastric emptying in an Indonesian population with reflux esophagitis. *Acta Med Indones*. 2011;43(4):229-32.
54. Quigley EMM. Microflora modulation of motility. *J Neurogastroenterol Motil*. 2011;17(2):140-7..
55. Vantrappen G, Janssens J, Hellemans J, Ghooos Y. The interdigestive motor complex of normal subjects and patients with bacterial overgrowth of the small intestine. *J Clin Invest*. 1977;59(6):1158-66.
56. Quera PR, Quigley EM, Madrid SAM. Small intestinal bacterial overgrowth. An update. *Rev méd Chile*. 2005;133(11):1361-70.

-
57. Simrén M, Stotzer P-O. Use and abuse of hydrogen breath tests. *Gut*. 2006;55(3):297-303.
58. Torsvik V, Øvreås L. Microbial diversity and function in soil: From genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol*. 2002;5(3):240-5.
59. Borroni D, Romano V, Kaye SB, Somerville T, Napoli L, Fasolo A, Gallon P, Ponzin D, Esposito A, Ferrari S. Metagenomics in ophthalmology: Current findings and future perspectives. *BMJ Open Ophthalmol*. 2019;4(1):e000248.
60. Bik EM, Eckburg PB, Gill SR, Nelson KE, Purdom EA, Francois F, Perez-Perez G, Blaser MJ, Reiman DA.. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(3):732-7.
61. Yang B, Wang Y, Qian PY. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics*. 2016;17:135.
62. Poretsky R, Rodriguez-R LM, Luo C, Tsementzi D, Konstantinidis KT. Strengths and limitations of 16S rRNA gene amplicon sequencing in revealing temporal microbial community dynamics. *PLoS One*. 2014;9(4):e93827.
63. Mizrahi-Man O, Davenport ER, Gilad Y. Taxonomic classification of bacterial 16S rRNA genes using short sequencing reads: evaluation of effective study designs. *PLoS One*. 2013;8(1):e53608.
64. Baker GC, Smith JJ, Cowan DA. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Methods*. 2003;55(3):541-55.

-
65. Tringe SG, Hugenholtz P. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Curr Opin Microbiol*. 2008;11(5):442-6.
66. Wang Y, Qian PY. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS One*. 2009;4(10):e7401.
67. Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(16):5261-7.
68. De R. Metagenomics: aid to combat antimicrobial resistance in diarrhea. *Gut Pathog*. 2019;11:47.
69. NIH HMP Working Group, Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, Schloss JA, Bonazzi V, McEwen JE, Wetterstrand KA, Deal C, Baker CC, Di Francesco V, Howcroft TK, Karp RW, Lunsford RD, Wellington CR, Belachew T, Wright M, Giblin C, David H, Mills M, Salomon R, Mullins C, Akolkar B, Begg L, Davis C, Grandison L, Humble M, Khalsa J, Little AR, Peavy H, Pontzer C, Portnoy M, Sayre MH, Starke-Reed P, Zakhari S, Read J, Watson B, Guyer M. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res*. 2009;19(12):2317-23.
70. Weinstock GM. Genomic approaches to studying the human microbiota. *Nature*. 2012;489(7415):250-6.
71. Tejesvi MV, Nissi R, Saravesi K, Pirttilä AM, Markkola A, Talvensaari-Mattila A, Ruotsalainen AL. Association of prevalent vaginal microbiome of mother with occurrence of type I diabetes in child. *Sci Rep*. 2019;9(1):959.
72. Milani C, Hevia A, Foroni E, Duranti S, Turrone F, Lugli GA, Sanchez B, Martín R, Gueimonde M, van Sinderen D, Margolles A, Ventura M.

Assessing the fecal microbiota: an optimized ion torrent 16S rRNA gene-based analysis protocol. *PLoS One*. 2013;8(7):e68739.

73. White AG, Watts GS, Lu Z, Meza-Montenegro MM, Lutz EA, Harber P, Burgess JL. Environmental arsenic exposure and microbiota in induced sputum. *Int J Environ Res Public Health*. 2014;11(2):2299-313.

74. Jünemann S, Prior K, Szczepanowski R, Harks I, Ehmke B, Goesmann A, Stoye J, Harmsen D. Bacterial community shift in treated periodontitis patients revealed by Ion Torrent 16S rRNA gene amplicon sequencing. *PLoS One*. 2012;7(8):e41606.

75. Nilakanta H, Drews KL, Firrell S, Foulkes MA, Jablonski KA. A review of software for analyzing molecular Sequences. *BMC Res Notes*. 2014;7:830.

76. Kasyap AK, Sah SK, Chaudhary S. Clinical spectrum and risk factors associated with asymptomatic erosive esophagitis as determined by Los Angeles classification: A cross-sectional study. *PLoS One*. 2018;13(2):e0192739.

77. Lundell LR, Dent J, Bennett JR, Blum AL, Armstrong D, Galimiche JP, Johnson F, Hongo M, Richter JF, Spechler SJ, Tytgat GN, Wallin L. Endoscopic assessment of oesophagitis: Clinical and functional correlates and further validation of the Los Angeles classification. *Gut*. 1999;45(2):172-80.

78. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*. 2010;7(5):335-6.

-
79. Pylro VS, Roesch LFW, Morais DK, Clark IM, Hirsch PR, Tótola MR. Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. *J Microbiol Methods*. 2014;107:30-7.
80. Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, Brown CT, Porras-Alfaro A, Kuske CR, Tiedje JM. Ribosomal Database Project: Data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(Database issue):D633-42.
81. DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, Huber T, Dalevi D, Hu P, Andersen GL. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(7):5069-72.
82. Lozupone CA, Hamady M, Kelley ST, Knight R. Quantitative and qualitative β diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(5):1576-85.
83. Grossi L, Ciccaglione AF, Travaglini N, Marzio L. Transient lower esophageal sphincter relaxations and gastroesophageal reflux episodes in healthy subjects and GERD patients during 24 hours. *Dig Dis Sci*. 2001;46(4):815-21.
84. Vakil N. Prescribing proton pump inhibitors: Is it time to pause and rethink? *Drugs*. 2012;72:437-45.
85. Barbara G, Stanghellini V, Brandi G, Cremon C, Nardo G Di, De Giorgio R, Corinaldesi R. Interactions between commensal bacteria and gut sensorimotor function in health and disease. *Am J Gastroenterol*. 2005;100(11):2560-8.

-
86. Kim K-M, Kim B-T, Lee D-J, Park S-B, Joo N-S, Kim Y-S, Kim K-N. Erosive esophagitis may be related to small intestinal bacterial overgrowth. *Scand J Gastroenterol*. 2012;47(5):493-8.
87. Urita Y, Sugimoto M, Hike K, Torii N, Kikuchi Y, Kurakata H, Kanda E, Sasajima M, Miki K. High incidence of fermentation in the digestive tract in patients with reflux oesophagitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2006;18(5):531-5.
88. Piche T, Des Varannes SB, Sacher-Huvelin S, Holst JJ, Cuber JC, Galmiche JP. Colonic fermentation influences lower esophageal sphincter function in gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology*. 2003;124(4):894-902.
89. Ronkainen J, Talley NJ, Storskrubb T, Johansson SE, Lind T, Vieth M, Agréus L, Aro P. Erosive esophagitis is a risk factor for barrett's esophagus: A community-based endoscopic follow-up study. *Am J Gastroenterol*. 2011;106(11):1946-52.
90. Manning MA, Shafa S, Mehrotra AK, Grenier RE, Levy AD. Role of multimodality imaging in gastroesophageal reflux disease and its complications, with clinical and pathologic correlation. *Radiographics*. 2020;40(1):44-71.
91. Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB, Bajaj JS. Bile acids and the gut microbiome. *Curr Opin Gastroenterol*. 2014 May;30(3):332-8.
92. Sun QH, Wang HY, Sun SD, Zhang X, Zhang H. Beneficial effect of probiotics supplements in reflux esophagitis treated with esomeprazole: A randomized controlled trial. *World J Gastroenterol*. 2019;25(17):2110-2121.
93. Zmora N, Suez J, Elinav E. You are what you eat: diet, health and the gut microbiota. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16(1):35-56.

-
94. Gentile CL, Weir TL. The gut microbiota at the intersection of diet and human health. *Science*. 2018;362(6416):776-80.
95. Singh RK, Chang H-W, Yan D, Lee KM, Ucmak D, Wong K, Abrouk M, Farahnik B, Nakamura M, Zhu TH, Bhutani T, Liao W. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *J Transl Med*. 2017;15(1):73.
96. Smits SA, Leach J, Sonnenburg ED, Gonzalez CG, Lichtman JS, Reid G, Knight R, Manjurano A, Chagalucha J, Elias JE, Dominguez-Bello MG, Sonnenburg JL. Seasonal cycling in the gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers of Tanzania. *Science*. 2017;357(6353):802-6.
97. Ribeiro RM. Estudo do efeito de diferentes métodos de armazenamento das amostras de fezes para a caracterização da microbiota intestinal por meio de sequenciamento de nova geração. Dissertação [Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.
98. Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Relman DA. An ecological and evolutionary perspective on humang-microbe mutualism and disease. *Nature*. 2007;449(7164):811-8.
99. Miquel S, Martín R, Rossi O, Bermúdez-Humarán LG, Chatel JM, Sokol H, Thomas M, Wells JM, Langella P. *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health. *Curr Opin Microbiol*. 2013;16(3):255-61.
100. Duncan SH, Hold GL, Harmsen HJM, Stewart CS, Flint HJ. Growth requirements and fermentation products of *Fusobacterium prausnitzii*, and a proposal to reclassify it as *Faecalibacterium prausnitzii* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2002;52(Pt 6):2141-6.

101. Hold GL, Schwartz A, Aminov RI, Blaut M, Flint HJ. Oligonucleotide probes that detect quantitatively significant groups of butyrate-producing bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(7):4320-4.
102. Ferreira-Halder CV, Faria AVS, Andrade SS. Action and function of *Faecalibacterium prausnitzii* in health and disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2017;31(6):643-8.
103. Fitzgerald CB, Shkoporov AN, Sutton TDS, Chaplin A V., Velayudhan V, Ross RP, Hill C. Comparative analysis of *Faecalibacterium prausnitzii* genomes shows a high level of genome plasticity and warrants separation into new species-level taxa. *BMC Genomics.* 2018;19(1):931
104. Quévrain E, Maubert MA, Michon C, Chain F, Marquant R, Tailhades J, Miquel S, Carlier L, Bermúdez-Humarán LG, Pigneur B, Lequin O, Kharrat P, Thomas G, Rainteau D, Aubry C, Breyner N, Afonso C, Lavielle S, Grill JP, Chassaing G, Chatel JM, Trugnan G, Xavier R, Langella P, Sokol H, Seksik P. Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut.* 2016;65(3):415-25.
105. Duarte SMB, Stefano JT, Miele L, Ponziani FR, Souza-Basqueira M, Okada LSRR, de Barros Costa FG, Toda K, Mazo DFC, Sabino EC, Carrilho FJ, Gasbarrini A, Oliveira CP. Gut microbiome composition in lean patients with NASH is associated with liver damage independent of caloric intake: A prospective pilot study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2018;28(4):369-84.
106. Stärkel P, Leclercq S, Delzenne NM, de Timary P. Alcohol-dependence and the microbiota-gut-brain axis. In: Hyland N, Stanton C. (editor). *The gut-brain axis dietary, probiotic, and prebiotic interventions on the microbiota.* New York: Academic Press; 2016.

107. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux JJ, Blugeon S, Bridonneau C, Furet J-P, Corthier G, Grangette C, Vasquez N, Pochart P, Trugnan G, Thomas G, Blottière HM, Doré J, Marteau P, Seksik P, Langella P. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(43):16731-6.
108. Martín R, Miquel S, Chain F, Natividad JM, Jury J, Lu J, Sokol H, Theodorou V, Bercik P, Verdu EF, Langella P, Bermúdez-Humarán LG. *Faecalibacterium prausnitzii* prevents physiological damages in a chronic low-grade inflammation murine model. *BMC Microbiol*. 2015;15:67.
109. Coates MD, Johnson AC, Greenwood-Van Meerveld B, Mawe GM. Effects of serotonin transporter inhibition on gastrointestinal motility and colonic sensitivity in the mouse. *Neurogastroenterol Motil*. 2006;18(6):464-71.
110. Muñiz Pedrego DA, Chen J, Hillmann B, Jeraldo P, Al-Ghalith G, Taneja V, Davis JM, Knights D, Nelson H, Faubion WA, Raffals L, Kashyap PC. An increased abundance of clostridiaceae characterizes arthritis in inflammatory bowel disease and rheumatoid arthritis: a cross-sectional study. *Inflamm Bowel Dis*. 2019;25(5):902-13.
111. Ling Z, Li Z, Liu X, Cheng Y, Luo Y, Tong X, Yuan L, Wang Y, Sun J, Li L, Xiang C. Altered fecal microbiota composition associated with food allergy in infants. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(8):2546-54.
112. Takagi T, Naito Y, Inoue R, Kashiwagi S, Uchiyama K, Mizushima K, Tsuchiya S, Okayama T, Dohi O, Yoshida N, Kamada K, Ishikawa T, Handa O, Konishi H, Okuda K, Tsujimoto Y, Ohnogi H, Itoh Y. The influence of long-term use of proton pump inhibitors on the gut microbiota: an age-sex-matched case-control study. *J Clin Biochem Nutr*. 2017;62(1):100-5.

-
113. Tsuda A, Suda W, Morita H, Takanashi K, Takagi A, Koga Y, Hattori M. Influence of proton-pump inhibitors on the luminal microbiota in the gastrointestinal tract. *Clin Transl Gastroenterol*. 2015;6:e89.
114. Garcia-Mazcorro JF, Suchodolski JS, Jones KR, Clark-Price SC, Dowd SE, Minamoto Y, Markel M, Steiner JM, Dossin O. Effect of the proton pump inhibitor omeprazole on the gastrointestinal bacterial microbiota of healthy dogs. *FEMS Microbiol Ecol*. 2012;80(3):624-36.
115. Seto CT, Jeraldo P, Orenstein R, Chia N, DiBaise JK. Prolonged use of a proton pump inhibitor reduces microbial diversity: Implications for *Clostridium difficile* susceptibility. *Microbiome*. 2014;4:10.
116. Ley RE. Prevotella in the gut: choose carefully. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016;13(2):69-70.
117. Koren O, Knights D, Gonzalez A, Waldron L, Segata N, Knight R, Huttenhower C, Ley RE. A guide to enterotypes across the human body: meta-analysis of microbial community structures in human microbiome datasets. *PLoS Comput Biol*. 2013;9(1):e1002863.
118. Sela DA, Mills DA. Nursing our microbiota: Molecular linkages between bifidobacteria and milk oligosaccharides. *Trends Microbiol*. 2010;18(7):298-307.
119. Scher JU, Sczesnak A, Longman RS, Segata N, Ubeda C, Bielski C, Rostron T, Cerundolo V, Pamer EG, Abramson SB, Huttenhower C, Littman DR. Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. *Elife*. 2013;Nov 5:e01202.
120. Dillon SM, Lee EJ, Kotter C V., Austin GL, Gianella S, Siewe B, Smith DM, Landay AL, McManus MC, Robertson CE, Frank DN, McCarter MD, Wilson CC. Gut dendritic cell activation links an altered colonic microbiome to

mucosal and systemic T-cell activation in untreated HIV-1 infection. *Mucosal Immunol.* 2016;9(1):24-37.

121. Maeda Y, Kurakawa T, Umemoto E, Motooka D, Ito Y, Gotoh K, Hirota K, Matsushita M, Furuta Y, Narazaki M, Sakaguchi N, Kayama H, Nakamura S, Iida T, Saeki Y, Kumanogoh A, Sakaguchi S, Takeda K. Dysbiosis contributes to arthritis development via activation of autoreactive T cells in the intestine. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68(11):2646-61.

122. Elinav E, Strowig T, Kau AL, Henao-Mejia J, Thaïss CA, Booth CJ, Peaper DR, Bertin J, Eisenbarth SC, Gordon JI, Flavell RA. NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell.* 2011;145(5):745-57.

123. Levy M, Thaïss CA, Zeevi D, Dohnalová L, Zilberman-Schapira G, Mahdi JA, David E, Savidor A, Korem T, Herzig Y, Pevsner-Fischer M, Shapiro H, Christ A, Harmelin A, Halpern Z, Latz E, Flavell RA, Amit I, Segal E, Elinav E. Microbiota-modulated metabolites shape the intestinal microenvironment by regulating NLRP6 inflammasome signaling. *Cell.* 2015;163(6):1428-43.

124. Larsen JM. The immune response to *Prevotella* bacteria in chronic inflammatory disease. *Immunology.* 2017;151(4):363-74.

125. Lewis JD, Chen EZ, Baldassano RN, Otley AR, Griffiths AM, Lee D, Bittinger K, Bailey A, Friedman ES, Hoffmann C, Albenberg L, Sinha R, Compher C, Gilroy E, Nessel L, Grant A, Chehoud C, Li H, Wu GD, Bushman FD. Inflammation, antibiotics, and diet as environmental stressors of the gut microbiome in pediatric Crohn's disease. *Cell Host Microbe.* 2015;18(4):489-500.

126. Vandeputte D, Kathagen G, D'Hoe K, Vieira-Silva S, Valles-Colomer M, Sabino J, Wang J, Tito RY, De Commer L, Darzi Y, Vermeire S, Falony G,

Raes J. Quantitative microbiome profiling links gut community variation to microbial load. *Nature*. 2017;551(7681):507-11.

127. Gevers D, Kugathasan S, Knights D, Kostic AD, Knight R, Xavier RJ. A microbiome foundation for the study of Crohn's disease. *Cell Host Microbe*. 2017;21(3):301-4..

128. Gevers D, Kugathasan S, Denson LA, Vázquez-Baeza Y, Van Treuren W, Ren B, Schwager E, Knights D, Song SJ, Yassour M, Morgan XC, Kostic AD, Luo C, González A, McDonald D, Haberman Y, Walters T, Baker S, Rosh J, Stephens M, Heyman M, Markowitz J, Baldassano R, Griffiths A, Sylvester F, Mack D, Kim S, Crandall W, Hyams J, Huttenhower C, Knight R, Xavier RJ. The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe*. 2014;15(3):382-92.

129. Kim HJ, Vazquez Roque MI, Camilleri M, Stephens D, Burton DD, Baxter K, Thomforde G, Zinsmeister AR. A randomized controlled trial of a probiotic combination VSL# 3 and placebo in irritable bowel syndrome with bloating. *Neurogastroenterol Motil*. 2005;17(5):687-96.

130. O'Mahony L, McCarthy J, Kelly P, Hurley G, Luo F, Chen K, O'Sullivan GC, Kiely B, Collins JK, Shanahan F, Quigley EMM. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in irritable bowel syndrome: Symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterology*. 2005;128(3):541-51.

131. Whorwell PJ, Altringer L, Morel J, Bond Y, Charbonneau D, O'Mahony L, Kiely B, Shanahan F, Quigley FMM. Efficacy of an encapsulated probiotic *Bifidobacterium infantis* 35624 in women with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol*. 2006;101(7):1581-90.

132. Ishizuka A, Tomizuka K, Aoki R, Nishijima T, Saito Y, Inoue R, Ushida K, Mawatari T, Ikeda T. Effects of administration of *Bifidobacterium animalis*

subsp. lactis GCL2505 on defecation frequency and bifidobacterial microbiota composition in humans. *J Biosci Bioeng.* 2012;113(5):587-91.

133. Tabbers MM, De Milliano I, Roseboom MG, Benninga MA. Is *Bifidobacterium breve* effective in the treatment of childhood constipation? Results from a pilot study. *Nutr J.* 2011;10:19.

134. Kim SE, Choi SC, Park KS, Park MI, Shin JE, Lee TH, Jung KW, Koo HS, Myung SJ, Constipation Research Group of Korean Society of Neurogastroenterology and Motility. Change of fecal flora and effectiveness of the short-term VSL#3 probiotic treatment in patients with functional constipation. *J Neurogastroenterol Motil.* 2015;21(1):111-20.

135. Parthasarathy G, Chen J, Chen X, Chia N, O'Connor HM, Wolf PG, Gaskins HR, Bharucha AE. Relationship between microbiota of the colonic mucosa vs feces and symptoms, colonic transit, and methane production in female patients with chronic constipation. *Gastroenterology.* 2016;150(2):367-79.e1.

136. Chassard C, Dapoigny M, Scott KP, Crouzet L, Del'Homme C, Marquet P, Martin JC, Pickering G, Ardid D, Eschalier A, Dubray C, Flint HJ, Bernalier-Donadille A. Functional dysbiosis within the gut microbiota of patients with constipated-irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012;35(7):828-38.

137. Wang L, Chen C, Cui S, Lee Y, Wang G, Zhao J, Zhang H, Chen W. Adhesive bifidobacterium induced changes in cecal microbiome alleviated constipation in mice. *Front Microbiol.* 2019;10:1721.

138. Barbuti RC, Oliveira MN, Perina NP, Haro C, Bogsan CS, Eisig JN, Nvarro-Rodriguez T. Tu1846 *Bifidobacterium lactis* B420/*Streptococcus thermophilus* TA040 – fermented milk improves dyspepsia. a prospective, randomized, double-blind trial. *Gastroenterology.* 2014;146(5):S-854.

-
139. Bogsan CSB, Ferreira L, Maldonado C, Perdigon G, Almeida SR, Oliveira MN. Fermented or unfermented milk using *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019: Technological approach determines the probiotic modulation of mucosal cellular immunity. *Food Res Int.* 2014;64:283-8.
140. Binda C, Lopetuso LR, Rizzatti G, Gibiino G, Cennamo V, Gasbarrini A. Actinobacteria: A relevant minority for the maintenance of gut homeostasis. *Dig Liver Dis.* 2018;50(5):421-8..
141. Kim SJ, Kim S-E, Kim A-R, Kang S, Park M-Y, Sung M-K. Dietary fat intake and age modulate the composition of the gut microbiota and colonic inflammation in C57BL/6J mice. *BMC Microbiol.* 2019 Dec 20;19(1):193.
142. Hou J. Paracellular Channel Formation. In: Hou J. *The Paracellular Channel*. New York: Elsevier; 2019. p. 9-27.
143. Bervoets L, Van Hoorenbeeck K, Kortleven I, Van Noten C, Hens N, Vael C, Goossens H, Desager KN, Vankerckoven V. Differences in gut microbiota composition between obese and lean children: A cross-sectional study. *Gut Pathog.* 2013;5(1):10.
144. Riva A, Borgo F, Lassandro C, Verduci E, Morace G, Borghi E, Berry D. Pediatric obesity is associated with an altered gut microbiota and discordant shifts in Firmicutes populations. *Environ Microbiol.* 2017;19(1):95-105.
145. Bhattarai Y, Muniz Pedrego DA, Kashyap PC. Irritable bowel syndrome: A gut microbiota-related disorder? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2017;312(1):G52-G62.
146. Salonen A, De Vos WM, Palva A. Gastrointestinal microbiota in irritable bowel syndrome: Present state and perspectives. *Microbiology (Reading).* 2010;156(Pt 11):3205-15..

147. Larsen N, Vogensen FK, Van Den Berg FWJ, Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen BK, Al-Soud WA, Sørensen SJ, Hansen LH, Jakobsen M. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One*. 2010;5(2):e9085.
148. Williams BL, Hornig M, Parekh T, Ian Lipkin W. Application of novel PCR-based methods for detection, quantitation, and phylogenetic characterization of *Sutterella* species in intestinal biopsy samples from children with autism and gastrointestinal disturbances. *mBio*. 2012;3(1):e00261-11.
149. He Y, Wu W, Zheng HM, Li P, McDonald D, Sheng HF, Chen MX, Chen ZH, Ji GY, Zheng ZD, Mujagond P, Chen XJ, Rong ZH, Chen P, Lyu LY, Wang X, Wu CB, Yu N, Xu YJ, Yin J, Raes J, Knight R, Ma WJ, Zhou HW. Regional variation limits applications of healthy gut microbiome reference ranges and disease models. *Nature Med*. 2018;24(10):1532-5.
150. Gupta VK, Paul S, Dutta C. Geography, ethnicity or subsistence-specific variations in human microbiome composition and diversity. *Front Microbiol*. 2017;8:1162.
151. Yadav D, Ghosh TS, Mande SS. Global investigation of composition and interaction networks in gut microbiomes of individuals belonging to diverse geographies and age-groups. *Gut Pathog*. 2016;8:17.
152. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, Collini S, Pieraccini G, Lionetti P. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(33):14691-6.
153. Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Baldassano RN, Anokhin AP, Heath AC, Warner B, Reeder J, Kuczynski J, Caporaso JG, Lozupone CA, Lauber C,

Clemente JC, Knights D, Knight R, Gordon JI. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 2012;486(7402):222-7.

154. Schnorr SL, Candela M, Rampelli S, Centanni M, Consolandi C, Basaglia G, Turrioni S, Biagi E, Peano C, Severgnini M, Fiori J, Gotti R, De Bellis G, Luiselli D, Brigidi P, Mabulla A, Marlowe F, Henry AG, Crittenden AN. Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers. *Nat Commun*. 2014;5:3654.

155. Obregon-Tito AJ, Tito RY, Metcalf J, Sankaranarayanan K, Clemente JC, Ursell LK, Zech Xu Z, Van Treuren W, Knight R, Gaffney PM, Spicer P, Lawson P, Marin-Reyes L, Trujillo-Villarroel O, Foster M, Guija-Poma E, Troncoso-Corzo L, Warinner C, Ozga AT, Lewis CM. Subsistence strategies in traditional societies distinguish gut microbiomes. *Nat Commun*. 2015;6:6505.

156. Mancabelli L, Milani C, Lugli GA, Turrioni F, Ferrario C, van Sinderen D, Ventura M. Meta-analysis of the human gut microbiome from urbanized and pre-agricultural populations. *Environ Microbiol*. 2017;19(4):1379-90.

157. de la Cuesta-Zuluaga J, Corrales-Agudelo V, Velásquez-Mejía EP, Carmona JA, Abad JM, Escobar JS. Gut microbiota is associated with obesity and cardiometabolic disease in a population in the midst of Westernization. *Sci Rep*. 2018;8(1):11356.

158. Bowyer RCE, Jackson MA, Pallister T, Skinner J, Spector TD, Welch AA, Steves CJ. Use of dietary indices to control for diet in human gut microbiota studies. *Microbiome*. 2018;6(1):77.

159. Johnson AJ, Vangay P, Al-Ghalith GA, Hillmann BM, Ward TL, Shields-Cutler RR, Kim AD, Shmagel AK, Syed AN, Personalized Microbiome Class Students; Walter J, Menon R, Koecher K, Knights D. Daily

sampling reveals personalized diet-microbiome associations in humans. *Cell Host Microbe*. 2019;25(6):789-802.e5.

160. Gyawali CP, Kahrilas PJ, Savarino E, Zerbib F, Mion F, Smout AJPM, Vaezi M, Sifrim D, Fox MR, Vela MF, Tutuian R, Tack j, Bredenoord AJ, Pandolfino J, Roman S. Modern diagnosis of GERD: the Lyon Consensus. *Gut*. 2018;67(7):1351-62.