FLÁVIA BARRETO GARCEZ CARVALHO

**Associação entre microbioma intestinal e ocorrência
de *delirium* em idosos agudamente enfermos**

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

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Educação e Saúde

Orientador: Prof. Dr. Thiago Junqueira
Avelino da Silva

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Garcez Carvalho, Flávia Barreto
Associação entre microbioma intestinal e
ocorrência de delirium em idosos agudamente
enfermos / Flávia Barreto Garcez Carvalho. -- São
Paulo, 2021.

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

Programa de Ciências Médicas. Área de
Concentração: Educação e Saúde.

Orientador: Thiago Junqueira Avelino da Silva.

Descritores: 1.Idoso 2.Delirium 3.Transtornos da
consciência 4.Microbioma gastrointestinal
5.Microbiota 6.Hospitalização

USP/FM/DBD-084/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família.

Aos meus avós, em especial **José Augusto**, que me inspirou e inspira a ser uma médica melhor.

Aos meus pais, **João e Célia**, a quem devo tudo que sou hoje.

Aos meus irmãos, **Carolina, Tiago, e Paula**, pelo apoio e amor incondicionais.

Aos meus sobrinhos, pela alegria e carinho em todos os momentos.

E ao meu marido, **Lucas**, sem o qual eu não teria chegado até aqui, e ao nosso filho, **Samuel**, sendo gerado junto com este trabalho: vocês trouxeram força e significado para a conclusão dessa etapa.

Agradecimentos

Ao Prof. Thiago Junqueira Avelino da Silva, pelo privilégio de ser sua orientanda desde o início da residência em Geriatria e pelo suporte em todas as etapas deste projeto. Meu profundo agradecimento por confiar em mim, por compartilhar o seu conhecimento e por abrir tantas portas para que eu crescesse como profissional e pesquisadora. A sua mentoria e a sua amizade são frutos permanentes dessa tese.

Ao Serviço de Geriatria do HC-FMUSP, na pessoa do Prof. Wilson Jacob Filho e da Dr^a. Flavia Campora, a minha gratidão pelo acolhimento de sempre e pelo terreno fértil que representa para todos os seus residentes e alunos. A sua disponibilidade e seu apoio foram essenciais para a realização desse trabalho.

À equipe do Pronto-Socorro de Clínica Médica do HC-FMUSP e do LIM 51, nas pessoas do Prof. Heraldo Possolo de Souza, Hermes Barbeiro e Luz Marina, por auxiliar na implementação e na manutenção desse projeto. Em especial, ao amigo Júlio Alencar, que com sua parceria constante e determinação tornou possível a realização desse projeto tão desafiador.

Às enfermeiras Caroline Torres, Giulia Serigatti, Fabiana Cardoso e Ariela Persiane, que foram essenciais para a concretização desse projeto. Agradeço por terem dividido a rotina diária com toda a disposição e leveza, e por mostrarem mais uma vez o valor do trabalho em grupo.

À nutricionista Shirley Fernandez, pela participação fundamental na coleta de dados e disponibilidade em ajudar nas análises desse projeto.

À equipe do LIM 46 (Parasitologia Médica), nas pessoas da Prof^a Ester Sabino, Roberta Martins e Lucas Franco, pelo auxílio na construção desse projeto e pelos ensinamentos na área de microbioma intestinal.

À Prof^a. Vivian Helena lida Avelino da Silva, pelo papel central na idealização desse projeto, e ao Dr. Márlon Aliberti, por me ensinar constantemente com a dedicação e a excelência que deposita em tudo que realiza. Agradeço a amizade e os ensinamentos na área de pesquisa clínica e de bioestatística, que consolidaram o meu conhecimento durante a pós-graduação.

Aos colegas e amigos que o Serviço de Geriatria do HC-FMUSP me deu, em especial Sílvia Takahashi, Érica Boteon, Paula Poço e Marcos Martinelli, e à minha colega de profissão e irmã Juliane Seabra, minha gratidão por participarem ativamente da minha jornada dentro da Pós-Graduação e pelo auxílio em todas as fases desse projeto.

Aos queridos e queridas pacientes, que doaram seu tempo e sua privacidade de forma voluntária em um momento de doença aguda, meu eterno agradecimento.

Aos membros do NIDUS (*Network for Investigation of Delirium: Unifying Scientists*), na pessoa da Prof^a Dr^a Sharon Inouye, que confiaram nesse projeto e ofereceram os recursos necessários para a sua realização.

Epígrafe

“Como os pássaros migratórios, nós sem dúvida temos também uma voz interior que, se soubermos ouvir, nos dirá com certeza quando partir para o desconhecido.”

(Elisabeth Kübler-Ross)

Normatização

Essa tese está de acordo com as seguintes normas em vigor no momento dessa publicação:

Referências: adaptado do *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. Fredd, Maria F. Crestana, Marinalva de Sousa Araújo, Suely Campos Cardoso, Valeria Vilhena. 3a Ed. São Paulo. Divisão de Biblioteca e Documentação, 2011.

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

Sumário

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	xi
Lista de figuras.....	xiii
Lista de tabelas	xv
Resumo.....	xvi
Abstract.....	xviii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Microbiota intestinal e envelhecimento.....	4
1.2 Microbiota intestinal e o sistema nervoso central	6
1.2.1 Disbiose intestinal e doenças neuropsiquiátricas	6
1.2.2 Disbiose intestinal e neurodegeneração	8
1.2.3 Eixo cérebro-intestino	9
1.3 <i>Delirium</i> : aspectos clínicos e fisiopatológicos.....	10
1.3.1 Interface entre <i>delirium</i> e microbioma intestinal.....	11
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo primário	15
2.2 Objetivos secundários	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Desenho	17
3.2 Recrutamento.....	17
3.3 Ambiente	17
3.4 População	18
3.4.1 Critérios de inclusão	18
3.4.2 Critérios de exclusão	18
3.5 Desfechos e variáveis independentes.....	19
3.5.1 Desfechos.....	19
3.5.2 Variáveis independentes.....	21
3.5.2.1 Diversidade alfa	21
3.5.2.2 Diversidade beta	22

3.5.2.3	Covariáveis	23
3.6	Procedimentos do estudo.....	27
3.6.1	Estudo piloto	27
3.6.2	Avaliação clínica e laboratorial	27
3.6.2.1	Deteção de <i>delirium</i>	28
3.6.2.2	Coleta de sangue e dosagem de marcadores inflamatórios.....	28
3.6.3	Coleta do microbioma intestinal.....	30
3.6.3.1	Métodos de coleta do microbioma intestinal	30
3.6.3.2	Procedimento do estudo para coleta de swabs retais	31
3.6.4	Análise do microbioma intestinal	33
3.6.4.1	Métodos de análise do microbioma intestinal	33
3.6.4.2	Procedimentos do estudo para análise do microbioma intestinal	35
3.7	Aspectos éticos	37
3.8	Análise estatística	38
3.8.1	Análise estatística primária: por amostras de swabs	39
3.8.2	Análise estatística secundária: por indivíduo	41
3.8.3	Análise de bioinformática.....	43
4	RESULTADOS	45
4.1	Características gerais da população	46
4.2	Coleta e processamento dos swabs retais.....	49
4.3	Diversidade alfa.....	51
4.3.1	Diversidade alfa na amostra geral de swabs	51
4.3.2	Diversidade alfa por indivíduo.....	55
4.4	Diversidade beta	58
4.4.1	Diversidade beta na amostra geral de swabs	58
4.4.2	Diversidade beta por indivíduo	60
4.5	Abundância relativa.....	60
4.5.1	Abundância relativa em nível de filo	60
4.5.2	Abundância relativa em nível de gênero.....	62
4.6	Análise multivariada - Abundância relativa.....	63
4.6.1	Associação na amostra geral de swabs.....	63
4.6.2	Associação na amostra de baseline - por indivíduo.....	65

4.7	Core microbiome e análise da conversão do CAM	67
4.7.1	Core microbiome – Conversão precoce do CAM.....	67
4.7.2	Core microbiome – Conversão tardia do CAM	70
4.8	Diversidade alfa e marcadores inflamatórios	71
5	DISCUSSÃO.....	73
5.1	Alterações do microbioma intestinal e desfechos de interesse	74
5.2	Associação entre <i>delirium</i> e microbioma intestinal.....	76
5.3	Disbiose intestinal e <i>delirium</i> : aspectos fisiopatológicos e clínicos	77
5.3.1	Papel da inflamação e de cepas bacterianas específicas.....	77
5.3.2	Aspectos clínicos da associação entre disbiose e <i>delirium</i>	83
5.4	Pontos fortes e limitações	85
6	CONCLUSÕES.....	88
7	TRABALHOS FUTUROS.....	91
8	REFERÊNCIAS	94
9	ANEXOS.....	112
	Anexo A – Formulário de Inclusão.....	113
	Anexo B – Formulário de Seguimento	126
	Anexo C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	131

Listas

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Por cento
$\geq$	Maior ou igual
$\leq$	Menor ou igual
$>$	Maior que
$<$	Menor que
ex	Exemplo
m	Metro
kg	Quilograma
μL	Microlitro
pg	Picograma
®	Marca registrada
10-CS	<i>10-point Cognitive Screener</i>
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ASV	<i>amplicon sequence variants</i>
ABVD	Atividades Básicas de Vida Diária
BUN	<i>Blood Urea Nitrogen</i>
CAM	<i>Confusion Assessment Method</i>
CAM-S	<i>Confusion Assessment Method – Severity</i>
Charlson	Índice de Comorbidades de Charlson
DADA2	<i>Divisive Amplicon Denoising Algorithm</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
GABA	Ácido Gama-aminobutírico
GEE	<i>Generalized Estimating Equations</i>
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HHA	hipotálamo-hipófise-adrenal
IL	Interleucina
IQR	Intervalo Interquartil
LASSO	<i>Least Absolute Shrinkage and Selection Operator</i>
LIM	Laboratório de Investigação Médica
LPS	Lipopolissacarídeo
OTU	<i>Operational Taxonomic Units</i>
OR	<i>Odds Ratio</i>
PERMANOVA	<i>Permutational Multivariate Analysis of Variance</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PS	Pronto-Socorro
QIIME	<i>Quantitative Insights Into Microbial Ecology</i>
RASS	<i>Richmond Agitation and Sedation Scale</i>
REDCap	<i>Research Electronic Data Capture</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
rRNA	Ácido Ribonucleico ribossomal
SNC	Sistema Nervoso Central
TCE	Traumatismo cranioencefálico grave
TGI	Trato Gastrointestinal
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>

FIGURAS

Figura 1 -	Fluxograma com esquema geral dos procedimentos do estudo desde a inclusão	33
Figura 2 -	Fluxograma de inclusão dos participantes no estudo	47
Figura 3 -	Fluxograma de inclusão das amostras de <i>swab</i> retal e seus respectivos momentos de coleta	50
Figura 4 -	Diversidade alfa das amostras de <i>swab</i> segundo ocorrência de <i>delirium</i> (N=257). A: Índice de Shannon (P=0,019); B: Índice de Pielou (P=0,005)	51
Figura 5 -	Diversidade alfa das amostras de <i>swab</i> segundo a alteração do nível de consciência (N=257). A: Índice de Shannon (P=0,11); B: Índice de Pielou (P=0,08).....	53
Figura 6 -	Índice de Shannon nas amostras de <i>swab</i> segundo gravidade de <i>delirium</i> pelo CAM-S (N=257). P=0,13	54
Figura 7 -	Índice de Pielou nas amostras de <i>swab</i> segundo gravidade de <i>delirium</i> pelo CAM-S (N=257). P=0,061	54
Figura 8 -	Gráficos de análise de coordenadas principais para métricas de diversidade beta das amostras de <i>swab</i> retal de idosos agudamente enfermos segundo ocorrência de <i>delirium</i> (N=257). A. Bray Curtis (P=0.011); B. Jaccard (P=0.025); C. UniFrac não-ponderado (P=0.012); D. UniFrac ponderado (P=0.024).....	58
Figura 9 -	Gráficos de análise de coordenadas principais para métricas de diversidade beta das amostras de <i>swab</i> retal de idosos agudamente enfermos segundo alteração do nível de consciência (N=257). A. Bray Curtis (P=0.006); B. Jaccard (P=0.003); C. UniFrac não-ponderado (P=0.03); D. UniFrac ponderado (P=0.193)	59
Figura 10 -	Abundância relativa de filos nas amostras de pacientes com <i>delirium</i>	60
Figura 11 -	Abundância relativa de filos nas amostras de pacientes sem <i>delirium</i>	61
Figura 12 -	Abundância relativa dos filos mais frequentes nos grupos com e sem <i>delirium</i>	61

Figura 13 - Abundância relativa dos gêneros mais frequentes nos grupos com e sem <i>delirium</i>	62
Figura 14 - Flutuação do <i>core microbiome</i> em amostras de <i>swab</i> com e sem <i>delirium</i> nos pacientes com conversão precoce do CAM.....	69
Figura 15 - Flutuação do <i>core microbiome</i> em amostras de <i>swab</i> com e sem <i>delirium</i> nos pacientes com conversão tardia do CAM.....	70
Figura 16 - Relação entre os níveis de IL-6 no baseline e a média das métricas de diversidade alfa na internação. A: Shannon (P=0,002); B: Pielou (P=0,008).....	72
Figura 17 - Relação entre os níveis de IL-10 no baseline e a média das métricas de diversidade alfa na internação. A: Shannon (P=0,002); B: Pielou (P=0,036)	72

TABELAS

Tabela 1 -	Características sociodemográficas e clínicas da população de acordo com a ocorrência de <i>delirium</i> (N=133).....	48
Tabela 2 -	Métricas de diversidade alfa (índices de Shannon e Pielou) nas amostras de <i>swab</i> retal de idosos agudamente enfermos de acordo com os desfechos de interesse (N=257)	52
Tabela 3 -	Métricas de diversidade alfa (índices de Shannon e Pielou) no baseline de idosos agudamente enfermos de acordo com os desfechos de interesse (N=114).....	56
Tabela 4 -	Métricas de diversidade alfa (índices de Shannon e Pielou) no baseline da população de idosos agudamente enfermos de acordo com covariáveis de interesse (N=133).....	57
Tabela 5 -	Principais associações entre táxons bacterianos e desfechos de interesse nas amostras de <i>swab</i> (N=257)	64
Tabela 6 -	Principais associações entre táxons bacterianos e desfechos de interesse nas amostras de baseline (N=114) ...	66
Tabela 7 -	<i>Core microbiome</i> das amostras de pacientes com <i>delirium</i> e conversão do CAM durante a internação (N=69)	68

Resumo

Garcez-Carvalho FB. *Associação entre microbioma intestinal e ocorrência de delirium em idosos agudamente enfermos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

INTRODUÇÃO: As alterações de microbioma intestinal já foram investigadas em doenças neuropsiquiátricas crônicas prevalentes, como depressão e doença de Alzheimer. *Delirium* é uma alteração neuropsiquiátrica aguda, frequente em idosos hospitalizados, e associada a diversos eventos adversos. Considerando as lacunas ainda existentes na fisiopatologia de *delirium* e seu potencial impacto clínico, justifica-se explorar as alterações de microbioma intestinal nesta condição. **OBJETIVOS:** O objetivo primário deste estudo foi investigar a associação entre a composição do microbioma intestinal e a ocorrência de *delirium* em idosos agudamente enfermos hospitalizados. **MÉTODOS:** Estudo prospectivo de coorte incluindo idosos agudamente enfermos com idade ≥ 65 anos, admitidos consecutivamente no pronto-socorro de um hospital universitário terciário, em São Paulo, Brasil. Foram excluídos indivíduos com doenças gastrointestinais agudas, presença de alimentação artificial, uso recente de pré ou probióticos, em uso de antibióticos por 24 horas ou mais na admissão, internação recente (< 30 dias), traumatismo cranionencefálico grave ou admissão para cuidados de fim de vida. Os participantes foram avaliados nas primeiras 24 horas da admissão, seguindo protocolo padronizado com registro de dados sociodemográficos, clínicos e laboratoriais. O desfecho primário do estudo foi a ocorrência de *delirium* conforme o *Confusion Assessment Method* (CAM). Foram coletadas amostras de *swab* retal para análise do microbioma intestinal na inclusão (S1), após 72 horas da inclusão (S2), e em caso de surgimento de *delirium* ou resolução do mesmo após admissão (S3). Os grupos de desfecho foram comparados quanto aos índices de diversidade alfa e beta, abundância relativa de táxons e *core microbiome*, tanto na amostra geral de *swabs* (observações dependentes), quanto conforme *swabs* no estrato dos participantes (amostras do baseline). As métricas de diversidade alfa foram comparadas entre os grupos com equações de estimativas generalizadas (GEE) ou teste não-paramétricos tradicionais, e a diversidade beta foi avaliada usando *permutational multivariate analysis of variance* (PERMANOVA). Modelos de regressão logística e de GEE foram utilizados para investigar a associação entre características do microbioma intestinal e *delirium*, ajustando as análises para idade, gênero, índice de comorbidades de Charlson e índice de massa corpórea. **RESULTADOS:** Foram incluídos 133 participantes entre 30 de setembro de 2019 e 17 de março de 2020. Na amostra total, 56% eram do sexo masculino, com idade média de 75 (± 8) anos, e tempo de internação mediano de 8 (5,15) dias. *Delirium* foi detectado em 38 pacientes (29%), 19 deles na admissão e

outros 19 ao longo da internação hospitalar. Obtivemos 262 amostras de swab retal (S1=133; S2=108; e S3=21). As amostras de participantes com *delirium* apresentaram menor abundância e menor riqueza de microrganismos conforme indicado pelas métricas de diversidade alfa. Mesmo após ajuste para possíveis fatores de confusão, maiores índices de diversidade alfa associaram-se a uma menor ocorrência de *delirium*, tanto para o índice de Shannon (OR=0,77; IC 95%=0,60-0,99; P=0,042) quanto para o Pielou (OR=0,02; IC 95%=0,002-0,33; P=0,005). Houve diferença significativa em todas as métricas de diversidade beta de acordo com a presença de *delirium*, indicando uma composição microbiana divergente entre os grupos estudados. As análises de abundância relativa e *core microbiome* indicaram alguns táxons bacterianos mais associados ao grupo *delirium* (*Serratia*, *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Methanobrevibacter*), e outros, ao grupo sem *delirium* (*Finnegoldia* e *Anaerococcus*). **CONCLUSÕES:** Observamos diferenças significativas na diversidade e composição do microbioma intestinal de acordo com a presença ou ausência de *delirium* em idosos agudamente enfermos hospitalizados. Este é um estudo inédito de prova de conceito e serve de base para a investigação de biomarcadores e potenciais alvos terapêuticos para prevenção e tratamento de *delirium*.

Descritores: Idoso; *Delirium*; Transtornos da consciência; Microbioma gastrointestinal; Microbiota; Hospitalização.

Abstract

Garcez-Carvalho FB. *Association of gut microbiome and delirium in acutely ill older adults* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

BACKGROUND: Disturbances in gut microbiome have been investigated in common neuropsychiatric disorders, such as depression and Alzheimer’s disease. Delirium is an acute neuropsychiatric disorder that frequently affects hospitalized older adults and is associated with many adverse outcomes. Given the remaining gaps in the pathophysiology of delirium and its potential clinical impact, renewed understanding might arise from the investigation of gut microbiome disturbances in this condition. **OBJECTIVES:** Our primary objective was to investigate the association between gut microbiome composition and delirium occurrence in acutely ill older adults. **METHODS:** Prospective cohort study including acutely ill older adults aged 65 years or over admitted to the emergency department of a tertiary university hospital in Sao Paulo, Brazil. We excluded patients with acute gastrointestinal disorders, use of artificial nutrition, recent use of prebiotics or probiotics, antibiotics use for 24 hours or more on admission, recent hospitalization (<30 days), severe traumatic brain injury, or admission for end-of-life care. We assessed participants within 24 hours of admission using a standardized interview protocol to collect sociodemographic, clinical, and laboratory data. Our primary outcome was delirium occurrence as detected by the Confusion Assessment Method (CAM). We collected rectal swab samples for microbiome analysis at inclusion (S1), after 72 hours of inclusion (S2), and again during hospitalization if delirium ensued or resolved (S3). We compared alpha and beta diversities, taxa relative abundance, and core microbiome between outcome groups in the overall swab sample (dependent observations) and according to participant-level swabs (baseline samples). We used generalized estimating equations (GEE) or traditional non-parametric tests to compare alpha diversity metrics and permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) to analyze beta diversity. Finally, we used logistic regressions and GEE models to investigate the independent association between gut microbiome composition and delirium, adjusting our analyses for age, sex, Charlson comorbidity index, and body mass index. **RESULTS:** We included 133 participants from September 30, 2019, to March 17, 2020. Overall, 56% were male, with a mean age of 75 (± 8) years and median length of stay of 8 (5, 15) days. Delirium was detected in 38 patients (29%) - 19 on admission and 19 during hospital stay. We collected 262 swab samples (S1=133; S2=108; e S3=21) and found that swab samples from delirious participants had lower abundance and richness of microorganisms, as demonstrated by the alpha diversity measures. After adjusting for possible confounders, we observed that a greater alpha

diversity was associated with a lower chance of developing delirium, as measured by the Shannon (odds ratio[OR]=0.77; 95%CI=0.60-0.99; P=0.042) and Pielou indexes (OR=0.02; 95%CI=0.002-0.33; P=0.005). Beta diversity metrics were also significantly different according to delirium occurrence, indicating a divergent microbial composition between groups. Relative abundance and core microbiome analyses identified specific taxa associated with the delirium group (*Serratia*, *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Methanobrevibacter*) and the non-delirium group (*Finegoldia*, *Anaerococcus*). **CONCLUSIONS:** Gut microbiome diversity and composition were significantly different according to delirium occurrence in acutely ill hospitalized older adults. Our work is an original proof-of-concept investigation and provides groundwork for future biomarkers studies and potential therapeutic targets for delirium prevention and treatment.

Descriptors: Aged; Delirium; Consciousness disorders; Gastrointestinal microbiome; Microbiota; Hospitalization.

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O trato gastrointestinal (TGI) humano é habitado por uma diversidade de microrganismos que se desenvolve desde o nascimento, com natureza dinâmica no início da vida, menor variabilidade na fase adulta, e relativa estabilidade próximo à meia-idade.^{1,2} Esse conjunto de microrganismos presentes no ambiente do TGI é chamado de microbiota intestinal, resultando da interação entre fatores genéticos e ambientais ao longo da vida, como componentes da dieta, uso de medicamentos e presença de doenças.^{1,3} A microbiota intestinal de cada indivíduo tem uma assinatura única, com variações em diversidade e em abundância ao longo do TGI. O intestino grosso é a porção com maior concentração e atividade metabólica desses microrganismos, reunindo cerca de 400 a 1000 espécies bacterianas diferentes, em aumento progressivo até o cólon descendente.⁴

Enquanto microbiota refere-se aos próprios microrganismos presentes em um determinado ambiente, o termo microbioma costuma ser utilizado quando há consideração sobre o ambiente e genoma (coleção de genes) dos microrganismos, sendo que é sobre este último que estudos analíticos na área geralmente se debruçam.⁵

A preservação da microbiota intestinal está relacionada a um estado de saúde adequado, já que esse conjunto de microrganismos, que incluem bactérias, fungos, vírus e protozoários, é responsável por manter o funcionamento normal do intestino e de outros órgãos e sistemas.⁶ A microbiota intestinal tem papel importante em diversas funções orgânicas,

como desenvolvimento da resposta imune do hospedeiro, regulação de funções endócrinas intestinais, sinalização neurológica, e biossíntese de vitaminas e neurotransmissores.³ Há evidência de que exista uma comunidade central fixa de microrganismos que garantem uma capacidade funcional e uma proteção comum contra insultos exógenos, levando a um compartilhamento de grande parcela da composição microbiana entre indivíduos adultos saudáveis.⁷ Essa comunidade microbiana é compartilhada geralmente em nível de filo, indicando uma função global comum da microbiota intestinal em seres humanos. Por outro lado, a variabilidade filogenética é mantida de forma considerável em nível de gênero e espécie, explicando a singularidade da microbiota entre diferentes indivíduos.⁸

Apesar da resistência dessa comunidade microbiana fixa a agentes externos, os componentes dinâmicos da microbiota intestinal podem ser afetados por inúmeros fatores (por ex.: genética, atividade física, dieta) e modificados rapidamente, o que denota a plasticidade e a suscetibilidade microbiana em resposta a diferentes hábitos ou condições ambientais.⁷ Esse componente dinâmico costuma ser o foco principal das análises de disbiose intestinal (distúrbio na composição ou função da microbiota intestinal), embora também seja possível avaliar de que forma doenças ou outras condições nocivas afetam a abundância relativa dos componentes estáveis da microbiota.

O avanço nas técnicas de avaliação do microbioma intestinal tornou possível identificar a disbiose intestinal com maior precisão e associá-la a diversas doenças. Na maioria das situações, ainda não é possível

determinar se a disbiose é causa ou consequência, levando em consideração as limitações metodológicas de tais estudos (seleção de controles inadequados, baixo poder estatístico, ausência de relação temporal).³ Por outro lado, condições inflamatórias e metabólicas como asma na infância,⁹ doença inflamatória intestinal,¹⁰ obesidade e resistência insulínica¹¹, já foram investigadas com maior profundidade e com abordagem mecanicista, na busca de estabelecer uma relação causal com disbiose intestinal. A participação da disbiose intestinal na fisiopatologia de outras condições crônicas também tem sido explorada, como neoplasias, doenças cardiovasculares e transtornos neurológicos, além de processos fisiológicos do envelhecimento e de seus distúrbios associados.^{3,12}

1.1 Microbiota intestinal e envelhecimento

Sabe-se que a relativa estabilidade da microbiota intestinal existente até a meia-idade é comprometida durante o envelhecimento, com surgimento de disbiose relacionada à idade.¹³ A identificação de alterações da microbiota em modelos experimentais de envelhecimento em diferentes organismos vivos (por ex.: nematódeos, camundongos, peixes) sugere que existam mudanças exclusivamente relacionadas à idade.^{14,15} Essa perda de biodiversidade, combinada a alterações estruturais do envelhecimento, possivelmente resulta do próprio processo de senescência, parecendo estar mais associada à idade biológica (modificações dos sistemas e órgãos com o tempo), do que ao número de anos vividos (idade cronológica).¹² A

sobreposição com outras alterações frequentemente encontradas em idosos, como a presença de multimorbidade, uso de medicamentos, polifarmácia, e mudanças dietéticas, torna a diferenciação da disbiose relacionada à idade ainda mais desafiadora.^{13,16,17}

O envelhecimento do TGI, especificamente, parece contribuir para a ocorrência de disbiose, levando ao supercrescimento ou à diminuição na quantidade de determinados microrganismos. Por exemplo, a redução da produção de mucina leva a uma perda da barreira de proteção intestinal, e possibilita a interação de micróbios que normalmente não alcançariam determinadas camadas, gerando inflamação.¹⁸ Além disso, em um modelo de envelhecimento do TGI da *Drosophila*, verificou-se que as alterações intestinais associadas à idade mediadas por inflamação crônica são responsáveis por deflagrar a disbiose intestinal. Demonstrou-se ainda que é possível amenizar (ou eliminar) a disbiose com a prevenção dessas alterações do sistema digestivo através do bloqueio do processo inflamatório, gerando um prolongamento na expectativa de vida.¹⁹

De fato, as doenças crônicas e as alterações metabólicas que surgem com a idade são frequentemente permeadas por um estado inflamatório de baixo grau ("*inflamm-aging*"), com alterações na secreção de citocinas, e aumento dos níveis de interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF). O envelhecimento em si não parece ser o fator principal para as alterações do TGI, mas sim esse estado inflamatório crônico que o acompanha e que contribui para a perda de integridade da mucosa e do aumento da

permeabilidade intestinal. Justifica, então, pelo menos em parte, as mudanças de microbioma intestinal observadas nesse período da vida.^{13,20}

A participação do microbioma intestinal nos mecanismos de saúde e de doença no envelhecimento é reforçada por estudos com pacientes centenários. Esses indivíduos parecem ter um microbioma com maior diversidade e abundância em comparação com adultos jovens e idosos entre 60 e 80 anos.^{21,22} A diversidade alfa também se mostrou um bom preditor de longevidade nessa população, e a persistência de espécies que são vinculadas a um bom estado de saúde em centenários e supercentenários reforça a associação entre microbioma intestinal e envelhecimento bem-sucedido. Esta associação é provavelmente mediada por fatores genéticos, dieta (particularmente com alto teor de fibras e baixo teor de gorduras saturadas) e outras intervenções que podem manter ou promover a diversidade microbiana.^{13,22,23}

1.2 Microbiota intestinal e o sistema nervoso central

1.2.1 Disbiose intestinal e doenças neuropsiquiátricas

Além do envelhecimento em si, há evidência da associação entre disbiose intestinal e condições prevalentes em indivíduos idosos, especialmente doenças neuropsiquiátricas crônicas, como os transtornos depressivos e a Doença de Alzheimer.^{24–29} Depressão maior está associada a marcadores de estresse fisiológico, com desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), aumento de cortisol plasmático, aumento da

concentração de citocinas pró-inflamatórias e de lipopolissacarídeos (LPS).^{30,31} Essas alterações poderiam resultar da interação com a atividade de bactérias intestinais, dada sua influência no funcionamento do eixo HHA e no sistema imunológico. Em camundongos livres de micróbios no TGI ou *germ-free*, a hiperresponsividade do eixo HHA foi revertida com a associação de uma única linhagem bacteriana de ação probiótica (*Bifidobacterium infantis*).³²

Algumas cepas bacterianas também são capazes de modular a produção de neurotransmissores envolvidos na fisiopatologia da depressão, como noradrenalina (*Escherichia*, *Bacillus* e *Saccharomyces*), serotonina (*Candida*, *Streptococcus* e *Enterococcus*), e dopamina (*Bacillus* e *Serratia*).^{33,34} Em um estudo clínico, a composição microbiana intestinal de pacientes com depressão maior mostrou-se diferente de controles saudáveis, e com alterações significativas na abundância relativa de *Firmicutes*, *Actinobacteria* e *Bacteroidetes*.³⁵ Nesse mesmo estudo, observou-se que o transplante da microbiota fecal dos indivíduos portadores de depressão maior, para camundongos com TGI previamente estéril, foi capaz de induzir comportamentos depressivos nos animais, sugerindo uma interação desses microrganismos com o sistema nervoso central (SNC) e com neurotransmissores associados à ocorrência de depressão.³⁵

1.2.2 Disbiose intestinal e neurodegeneração

O microbioma intestinal pode ter um papel importante também no processo de neurodegeneração durante o envelhecimento. Essa associação entre disbiose intestinal e declínio cognitivo parece ter como fundamento comum o estado inflamatório de baixo grau que age como mediador de diversas condições associadas à idade, e a disbiose intestinal poderia contribuir através de estímulos proinflamatórios diretos e de perda da função imunorregulatória.²⁴ Além disso, o microbioma intestinal é essencial para a disponibilidade de polifenóis, gorduras não-saturadas e antioxidantes, todos estes potenciais protetores do envelhecimento neuronal e celular em condições normais.³⁶

A inflamação é um componente fisiopatológico significativo de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, e de outras síndromes demenciais.^{24,28} O microbioma intestinal de indivíduos com doença de Alzheimer mostrou-se significativamente diferente daqueles cognitivamente normais, com menor abundância de algumas cepas específicas, como *Bacteroides*.²⁶ Um outro estudo recente com modelo experimental de doença de Alzheimer (camundongos APP/PS1) também demonstrou uma possível relação dessa condição com o microbioma intestinal.³⁷ A exposição prolongada dos animais a antibióticos de amplo espectro selecionados provocou distúrbios na diversidade microbiana, com redução na deposição de proteína β -amiloide e na gliose associada às placas de β -amiloide, além de atenuação das respostas neuroinflamatórias mediadas pela micróglia e por astrócitos.

1.2.3 Eixo cérebro-intestino

A proximidade fisiopatológica entre o TGI e o SNC mediada pelo microbioma intestinal e corroborada através de estudos experimentais e clínicos levou à descrição do chamado “eixo cérebro-intestino”.^{24,38} O eixo cérebro-intestino é definido como uma rede bidirecional de comunicação entre o SNC e as funções intestinais periféricas, gerando sinalizações provenientes dos centros neurais que podem alterar o comportamento motor, sensorial e secretório do TGI, e mensagens de ordem visceral que interferem na função cerebral de forma recíproca.^{39,40} As vias que permitem a comunicação entre esses dois sistemas tem mediação neuroimunológica e neuroendócrina, levando a ativação imune, estímulo de reflexos entéricos e alteração da permeabilidade intestinal.⁴⁰ O estresse agudo tem ação importante na intensificação dessa sinalização, especialmente através do eixo HHA, que interage com o sistema neuroendócrino de forma significativa e tem a capacidade de alterar a regulação da microbiota intestinal, conforme identificado em estudos experimentais.⁴¹ Nesse sentido, o controle de processos fisiológicos centrais pelo eixo cérebro-intestino envolveria modulações de neurogênese, neurotransmissão (por ex.: triptofano, catecolaminas), e neuroinflamação (por ex.: citocinas, TNF-alfa, IL1- β , IL-6).⁴¹

Portanto, considerando que o eixo cérebro-intestino vem sendo estudado em diversas doenças crônicas do SNC na população geriátrica com resultados promissores, justifica-se explorar as características da composição microbiana em condições de caráter agudo. Com base na

potencial desregulação do microbioma em momentos de estresse orgânico, que pode ter comportamento flutuante, torna-se intrigante a possibilidade de sua participação em uma condição neuropsiquiátrica impactante como *delirium*.^{26,42}

1.3 *Delirium*: aspectos clínicos e fisiopatológicos

Delirium é uma alteração aguda e flutuante do estado mental, caracterizada por déficit da atenção e de outros domínios cognitivos, e frequentemente associada ao comprometimento da consciência. Representa a complicação neuropsiquiátrica mais comum em idosos hospitalizados, afetando cerca de 50% desses pacientes durante a internação.^{43,44} A ocorrência de *delirium* associa-se a diversos eventos adversos, como declínio funcional e cognitivo, maior tempo de hospitalização, maior risco de institucionalização, e aumento de mortalidade.^{44,45} *Delirium* é considerado uma condição multifatorial, resultando da interação entre fatores determinantes de vulnerabilidade (fatores predisponentes) e fatores estressores (fatores precipitantes).⁴⁶ Dentre esses fatores, destacam-se a presença de déficit cognitivo preexistente, uso de substâncias psicoativas, desnutrição, polifarmácia, e distúrbios hidroeletrólíticos.

Há diversas teorias derivadas de estudos experimentais e de investigações bioquímico-moleculares que buscam explicar o substrato neurobiológico de *delirium*.⁴⁷ A hipótese de que a desregulação neuronal detectada nesses pacientes seja desencadeada por insultos sistêmicos

causados por mecanismos complexos que envolvem envelhecimento neuronal, estresse oxidativo, neuroinflamação e disfunção circadiana é comum a todas essas teorias e tornou-se o modelo fisiopatológico mais aceito atualmente.⁴⁸

As vias de estresse oxidativo levariam à redução do metabolismo cerebral, alteração da via de neurotransmissão, produção de radicais livres, e falência na eliminação de neurotoxinas. Já o componente de neuroinflamação seria representado pela quebra da barreira hematoencefálica identificada durante os quadros de *delirium*, com disfunção neuronal e sináptica, ativação de células parenquimatosas cerebrais, e liberação de citocinas como IL-6, IL-10, IL8 e TNF-alfa.⁴⁹ Além desses componentes, observa-se disfunção do eixo HHA, elevação do nível de glicocorticoides e resposta anormal ao estresse, indicando uma disfunção neuroendócrina que contribui para intensificar o dano neuronal. Por fim, todos esses mecanismos gerariam desequilíbrio de neurotransmissores (redução da acetilcolina, e aumento da norepinefrina, dopamina e glutamato), e desconexão da rede funcional cerebral. A maioria dessas vias se sobrepõe aos processos fisiopatológicos envolvidos na disbiose intestinal, reforçando uma potencial colaboração do eixo cérebro-intestino nos mecanismos originadores ou perpetuadores do quadro de *delirium*.

1.3.1 Interface entre *delirium* e microbioma intestinal

Disbiose intestinal e *delirium* compartilham três características fundamentais: (1) maior ocorrência na população idosa; (2) associação com

condições complexas e frequentemente multifatoriais; e (3) presença de inflamação e desregulação neuroendócrina como componentes importantes de sua fisiopatologia.^{13,39,41,44,48}

Como a população idosa tem menor reserva fisiológica e maior suscetibilidade a enfermidades que acometem o SNC, os distúrbios do eixo cérebro-intestino seriam igualmente esperados. Em unidades de internação geriátrica, especialmente naquelas em que são admitidos idosos agudamente enfermos e onde se observa uma alta prevalência de *delirium*, a ocorrência de disbiose intestinal também é elevada.^{50–52} Além disso, considerando os fatores neuroinflamatórios e imunológicos associados a *delirium*, que se assemelham àqueles mediados pelo microbioma intestinal, torna-se fundamental explorar o papel do eixo cérebro-intestino nesse contexto. Com a vulnerabilidade intrínseca dos indivíduos idosos, tais desregulações poderiam favorecer a colonização do intestino por micróbios oportunistas e patobiontes, gerando modificações locais e funcionais que contribuiriam para a patogênese do *delirium*.

É plausível considerar que as alterações de permeabilidade intestinal e a inflamação observadas em idosos agudamente enfermos, potencialmente modificando a composição microbiana intestinal, possam decorrer de insultos semelhantes aos que estão presentes no quadro de *delirium*, e até contribuir para o seu surgimento. Embora seja relativamente estável em condições normais, o microbioma intestinal pode sofrer alterações dinâmicas em poucos dias, como demonstrado na fase inicial do seguimento de pacientes hospitalizados por doenças críticas.⁵³ Dessa

maneira, seria possível detectar uma mudança rápida na composição do microbioma caso esta antecederesse ou acompanhasse a natureza flutuante do quadro de *delirium*.

Portanto, a análise do microbioma intestinal em uma população com alto risco de disbiose e elevada vulnerabilidade para ocorrência de *delirium* representa um passo potencialmente importante para o melhor entendimento desta condição. Apesar do conhecimento atual sobre a neuropatogenia do *delirium*, a descoberta de novos biomarcadores é fundamental para aprofundar o entendimento de seus mecanismos fisiopatológicos, aprimorar a predição de sua ocorrência, e identificar novos alvos de tratamento.⁴⁴ Nossa principal hipótese é de que idosos agudamente enfermos com *delirium* apresentem uma composição microbiana diferente em comparação a idosos sem *delirium*, e que este perfil microbiano esteja associado a outros marcadores inflamatórios sabidamente preditores de *delirium*.

2 Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo primário

- Investigar a associação entre características do microbioma intestinal e ocorrência de *delirium* em idosos agudamente enfermos hospitalizados.

2.2 Objetivos secundários

- Descrever a composição do microbioma intestinal de idosos agudamente enfermos hospitalizados;
- Comparar, nesta população, a composição do microbioma intestinal antes e depois da incidência de *delirium*;
- Investigar, nesta população, a associação entre características do microbioma intestinal e:
 - Tempo de *delirium*;
 - Gravidade de *delirium*;
 - Alteração do nível de consciência;
 - Níveis de marcadores inflamatórios séricos.
- Investigar, nesta população, a associação entre ocorrência de *delirium* e mortalidade hospitalar.

3 Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho

- Estudo prospectivo de coorte.

3.2 Recrutamento

Foram avaliados para inclusão os pacientes com idade igual ou superior a 65 anos admitidos no Pronto Socorro (PS) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) durante o período de 30 de setembro de 2019 a 17 de março de 2020.

3.3 Ambiente

O HCFMUSP é um complexo hospitalar universitário terciário, com cerca de 2.200 leitos, localizado na cidade de São Paulo. O PS é uma unidade de atendimento referenciado, responsável por urgências e emergências clínicas e cirúrgicas de pacientes provenientes de diversas regiões de São Paulo.

Idosos internados no PS com perspectiva de tempo de hospitalização superior a dois dias são encaminhados para uma das unidades de

internação do Instituto Central do HC de acordo a estabilidade clínica e o diagnóstico de admissão: (1) enfermarias (Geriatria, Clínica Médica, e especialidades médicas); ou (2) unidades de terapia intensiva.

3.4 População

3.4.1 Critérios de inclusão

- Idade igual ou superior a 65 anos;
- Hospitalização ou admissão em outros serviços de saúde há menos de 24 horas por doença aguda, definida como condição de saúde de início recente, ou complicação recente de doença crônica, ou descompensação clínica de doença crônica, exigindo cuidados hospitalares;
- Consentimento livre e esclarecido para participação.

3.4.2 Critérios de exclusão

- Pacientes em uso de antibióticos por 24 horas ou mais;
- Doenças agudas do TGI, incluindo:
 - Hemorragia digestiva alta ou baixa;
 - Abdome agudo inflamatório ou obstrutivo;
 - Diarreia aguda de qualquer etiologia;
 - Suboclusão intestinal por fecaloma;
 - Doenças agudas do pâncreas e das vias biliares.

- Presença de alimentação artificial na admissão (por ex.: sonda nasoenteral ou gastrostomia);
- Uso recente (últimos 30 dias) ou atual de prébióticos, probióticos ou simbióticos;
- Admissão para cuidados de fim de vida;
- Hospitalização recente (últimos 30 dias) ou institucionalização;
- Traumatismo cranioencefálico grave;
- Tempo esperado de internação hospitalar inferior a 48 horas: pacientes com programação de alta para o mesmo dia ou para o dia seguinte (tempo de internação menor que 48 horas) eram excluídos por não haver tempo suficiente para se determinar a ocorrência de *delirium*. Em casos duvidosos, o participante era submetido ao protocolo de inclusão e posteriormente excluído se houvesse alta dentro deste período.

3.5 Desfechos e variáveis independentes

3.5.1 Desfechos

- Desfecho primário: ocorrência de *delirium* conforme o *Confusion Assessment Method* (CAM) ⁵⁴.
- Desfechos secundários:
 - Tempo em *delirium*, medido no final da hospitalização como a soma dos dias em que o CAM foi positivo (cada episódio de

- delirium* foi definido como resolvido quando o CAM permaneceu negativo por ao menos dois dias consecutivos);
- Gravidade de *delirium*, medida conforme a versão curta da escala CAM-Severity (CAM-S) ⁵⁵;
 - Nível de consciência medido pelo *Richmond Agitation and Sedation Scale* (RASS) ⁵⁶;
 - Mortalidade intra-hospitalar.

O CAM é o instrumento mais utilizado para detecção de *delirium*, com sensibilidade de 94% e especificidade de 96% em validação realizada para a população brasileira.⁵⁷ O algoritmo é baseado em quatro características centrais do quadro de *delirium*: (1) início agudo e/ou curso flutuante; (2) déficit de atenção; (3) desorganização do pensamento; (4) alteração do nível de consciência. A presença de *delirium* é determinada pela presença dos critérios 1 e 2, somados ao 3 e/ou 4. Outras cinco características (desorientação têmporo-espacial, déficit de memória, distúrbios de sensopercepção, alteração de atividade psicomotora, e alteração do ciclo sono-vigília) fazem parte do algoritmo do CAM para a pontuação do item 1, em caso de surgimento agudo ou flutuação.

O CAM-S é uma ferramenta derivada do CAM com o objetivo de avaliação da gravidade do episódio de *delirium*. Na versão curta utilizada neste estudo, a pontuação do CAM-S varia de 0 a 7, sendo o item 1 do CAM pontuado como ausente (0) ou presente (1), e os itens de 2 a 4 como ausente (0), leve (1) ou acentuado (2).⁵⁵ Para fins de interpretação clínica, o

CAM-S é categorizado de acordo com a mediana da pontuação obtida na população (0: sem *delirium*; 1-2: *delirium* leve a moderado; 3-7: *delirium* grave).

O RASS é uma escala validada para avaliação do nível de consciência em pacientes agudamente enfermos e hospitalizados, com uma pontuação que varia de -5 (não desperta) a +4 (combativo).^{56,58} O nível de consciência pelo RASS é considerado um marcador sensível e específico da presença de *delirium*, especialmente em cenários de cuidado agudos em que a avaliação completa de *delirium* é comprometida por restrições de tempo e de profissionais.⁵⁹ A alteração de nível de consciência já foi descrita como um fator de pior prognóstico em idosos hospitalizados, independentemente da presença de *delirium* ou demência.⁶⁰

3.5.2 Variáveis independentes

Nossas variáveis independentes primárias foram:

- Métricas de diversidade alfa e beta do microbioma intestinal dos participantes, que permitem quantificar e comparar as características da composição microbiana na própria amostra e entre grupos de amostras diferentes;
- Abundância relativa de bactérias em nível de filo e gênero.^{61–63}

3.5.2.1 Diversidade alfa

A diversidade alfa quantifica as características da diversidade microbiana individualmente em cada amostra e pode ser comparada entre

diferentes grupos de amostras através de testes estatísticos.⁶³ Alguns índices de diversidade levam em consideração a árvore filogenética nas suas estimativas, ou seja, a relação evolutiva mais próxima ou mais distante entre as espécies.

As métricas utilizadas no presente estudo estão dentre as mais comuns nos estudos de microbioma:

- Número de espécies observadas (espécies únicas em cada amostra);
- Índice de diversidade de Shannon (riqueza e equidade das espécies na amostra);
- Índice de Pielou (equidade das espécies na amostra);
- Índice de diversidade filogenética de Faith (riqueza da amostra baseada na árvore filogenética).

3.5.2.2 Diversidade beta

A diversidade beta quantifica a diferença da composição microbiana entre cada par de amostras, formando uma matriz completa das distâncias entre todos os pares de amostras disponíveis.⁶³ Dessa forma, as métricas de diversidade beta realizam uma comparação direta entre amostras diferentes.

As métricas utilizadas para diversidade beta foram:^{61,62}

- Quantitativas:
 - Distância de Bray-Curtis: métrica não-filogenética que considera a abundância de espécies;

- Teste UniFrac ponderado: métrica que considera a abundância de cada espécie juntamente com suas distâncias filogenéticas.
- Qualitativas:
 - Teste UniFrac não-ponderado: métrica filogenética que considera a presença ou ausência de espécies;
 - Índice de Jaccard: métrica que avalia presença ou ausência de espécies de forma binária.

3.5.2.3 Covariáveis

- Dados sociodemográficos (idade, sexo, cor da pele, escolaridade, estado civil, classificação econômica);
- História de tabagismo e etilismo;
- Polifarmácia (uso de cinco ou mais medicamentos);
- Uso de antibióticos durante a internação;
- Índice de Comorbidades de Charlson (Charlson): índice ponderado que estima a carga de doenças de uma pessoa, com base na presença de determinados diagnósticos no momento da avaliação.⁶⁴ Atribui-se um peso diferenciado (P) para cada grupo de comorbidades, calculado no estudo original de acordo com o impacto observado no prognóstico. O escore final é a soma dos pesos para cada uma das doenças (N):
 - Peso=1 (infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca congestiva, doença cerebrovascular, demência, doença

- pulmonar crônica, doença do tecido conjuntivo, doença ulcerosa péptica, hepatopatia leve e diabetes);
- Peso=2 (hemiplegia, doença renal moderada ou grave, qualquer neoplasia, leucemia, linfoma);
 - Peso=3 (hepatopatia moderada ou grave);
 - Peso=6 (neoplasia sólida metastática e AIDS);
 - $\text{Escore} = (P1 \times N1) + (P2 \times N2) + (P3 \times N3) + (P6 \times N6)$.
- Outras comorbidades relevantes (por ex.: hipertensão arterial sistêmica, doenças crônicas do TGI);
 - Estado nutricional avaliado pela versão curta da Mini Avaliação Nutricional (MAN)⁶⁵: a MAN é uma escala administrada para triagem de idosos desnutridos ou em risco de desnutrição. Ela contém seis itens que abordam a ingestão alimentar e perda de peso recentes, mobilidade, ocorrência de estresse físico ou psíquico recentes, presença de alterações neuropsiquiátricas (depressão e/o demência), e o índice de massa corpórea (IMC). O escore final varia de zero a 14 pontos e é possível classificar os pacientes em três categorias: desnutrição (0-7 pontos), risco de desnutrição (8-11 pontos), e estado nutricional normal (12-14 pontos).
 - Cognição:
 - História clínica;
 - *10-point Cognitive Screener* (10-CS)⁶⁶: instrumento de rastreio cognitivo que avalia o paciente quanto à

orientação temporal (ano, mês e dia do mês), memória de aprendizado (memorizar e repetir o nome de três objetos), fluência verbal (falar o maior número de animais em um minuto), e memória de evocação (repetir o nome dos três objetos memorizados anteriormente). A pontuação final varia de zero a 10 pontos, com três categorias de avaliação cognitiva: ≥ 8 pontos (normal), 6-7 pontos (comprometimento cognitivo possível), ≤ 5 pontos (comprometimento cognitivo provável). O 10-CS possui boa acurácia para detecção de comprometimento cognitivo em pacientes idosos, com possibilidade de ajuste do escore final em casos de baixa escolaridade.⁶⁶

- Funcionalidade avaliada pelas atividades básicas de vida diária (ABVDs)⁶⁷: avaliação de independência em seis tarefas de autocuidado (tomar banho; vestir-se; fazer a toalete; transferir-se; manter a continência; e alimentar-se). Para cada tarefa, mede-se a capacidade de execução sem ajuda (2 pontos), dificuldade em executar ou execução com alguma ajuda (1 ponto), e incapacidade total de execução (0 ponto). A soma dos pontos em cada tarefa gera o escore final de zero a 12 pontos (12=independência completa).
- Fragilidade (escala FRAIL)⁶⁸: escala para avaliação clínica de fragilidade, de rápida administração e com propriedades psicométricas favoráveis.⁶⁹ São analisadas cinco

características associadas à fragilidade de acordo com o mnemônico em inglês:

- F=*fatigue* (presença de fadiga);
- R=*resistance* (capacidade de subir um lance de escadas sem dificuldade);
- A=*ambulation* (capacidade de andar um quarteirão sem dificuldade);
- I=*illness* (presença de cinco ou mais dentre 11 doenças crônicas: artrite reumatoide, *diabetes mellitus*, disfunção renal moderada a grave, doença cerebrovascular, hipertensão arterial, infarto do miocárdio ou doença coronariana, insuficiência cardíaca, insuficiência arterial periférica, doença pulmonar obstrutiva crônica, asma e neoplasia);
- L=*loss of weight* (perda de 5% do peso ou 4,5kg no último ano).

Para cada item positivo atribui-se um ponto, e o escore final varia de zero a 5 pontos (zero: robusto; 1-2: pré-frágil; 3-5: frágil).

- Exames laboratoriais de rotina (hemoglobina, leucócitos, função renal, ureia, albumina, proteína C reativa);
- Citocinas proinflamatórias (IL-6, IL-10, e TNF-alfa).

3.6 Procedimentos do estudo

3.6.1 Estudo piloto

Na etapa inicial do presente trabalho foi realizado um estudo piloto com o objetivo de avaliar a viabilidade do método de coleta de microbioma intestinal na população estudada (*swab* retal) e a logística de implementação do projeto no ambiente de cuidados agudos. Foi realizado um estudo transversal no PS no período de 05 a 20 de agosto de 2019, incluindo 14 indivíduos recrutados conforme os critérios descritos nas seções 3.2 e 3.3.

Após assinatura do TCLE, foram coletadas 20 amostras de *swab* retal profundo conforme técnica previamente descrita⁷⁰ e discriminada na seção 3.6.3.2. Os *swabs* retais coletados mostraram-se viáveis para análise de microbioma, alcançando quantidades adequadas de DNA após extração e com visualização de banda em gel de agarose a 1.5%. Não houve eventos adversos reportados durante os procedimentos de coleta de *swab* retal no estudo piloto.

3.6.2 Avaliação clínica e laboratorial

Finalizado o estudo piloto, foi iniciado o recrutamento de candidatos para o estudo principal. Após avaliação de elegibilidade e assinatura do TCLE, os participantes foram submetidos a uma avaliação global do idoso padronizada.⁷¹ Esta era realizada no momento da sua inclusão no estudo, para registro das informações relacionadas às variáveis de interesse (Anexo A).

3.6.2.1 Detecção de *delirium*

Durante toda internação, os participantes foram avaliados diariamente em dois turnos (manhã e tarde/noite) para detecção de *delirium* de acordo com o CAM. Para pontuação do CAM, era realizada uma avaliação neuropsiquiátrica que incluía uma entrevista com o paciente e seu acompanhante, avaliação cognitiva pelo 10-CS, avaliação da atenção (dias da semana ao contrário e teste de vigilância do A)^{72,73}, e administração do RASS (Anexos A e B). Os prontuários médicos eram rotineiramente revisados para complementar as informações obtidas.

A aplicação do CAM foi realizada por investigadores devidamente treinados, alcançando alto nível de concordância entre examinadores (maior que 95%). Quaisquer dúvidas na pontuação do CAM ou na definição final de *delirium* eram resolvidas por dois médicos (um geriatra e um emergencista) experientes na detecção de *delirium*. Nos finais de semana (sábado e domingo), em que a segunda avaliação do dia não era possível, foi realizada a revisão dos registros médicos e de enfermagem do paciente na manhã seguinte, para identificar a presença de flutuação do estado mental ou de descritores sugestivos da ocorrência de *delirium*, segundo orientações de instrumento validado para este fim.⁷⁴

3.6.2.2 Coleta de sangue e dosagem de marcadores inflamatórios

Três enfermeiras treinadas foram responsáveis pela coleta de amostras de sangue (40 mL) à inclusão no estudo. O sangue coletado foi encaminhado em seguida ao Laboratório de Investigação Médica de

Emergências Clínicas do HCFMUSP (LIM-51), para centrifugação e armazenamento. As frações de plasma foram separadas em alíquotas de 200 a 500µl e congeladas a -80°C até o momento da análise final para dosagem das citocinas proinflamatórias séricas.

O kit Milliplex® MAP HCYTOMAG-60K e a tecnologia MAGPIX® System (Merck, Millipore Corporation, USA), que permitem a análise de múltiplos alvos (*multiplex*) num mesmo teste, foram utilizados para determinar a concentração dos analitos. Nesse teste, a concentração de citocinas é avaliada por meio da coloração de *beads* (ou microesferas magnéticas), segundo as instruções do fabricante. Em suma, a placa magnética foi lavada com a solução-tampão e uma alíquota de 25µl de cada amostra de plasma foi retirada para a análise. As microesferas magnéticas com diferentes fluorescências ligadas a anticorpos de captura foram incorporadas na amostra de plasma. Após lavagem, a placa magnética foi inoculada com os anticorpos de detecção e, em seguida, com a mistura de estreptavidina-ficoeritrina, esta última incubada por 30 minutos protegida da luz à temperatura ambiente, sob agitação. A placa foi então lavada mais duas vezes e submetida à leitura no MAGPIX® para identificação dos níveis séricos das citocinas. Os marcadores inflamatórios analisados no presente estudo foram: TNF-alfa, IL-6 e IL-10.

3.6.3 Coleta do microbioma intestinal

3.6.3.1 Métodos de coleta do microbioma intestinal

A primeira etapa para garantir uma seleção representativa das comunidades bacterianas presentes no intestino é a utilização de métodos adequados de coleta e armazenamento das amostras.⁷⁵ Cada método de amostragem possui recomendações específicas para viabilidade e preservação dos microrganismos até o momento da análise final.^{76,77}

A coleta de fezes é o método de amostragem mais utilizado para análise do microbioma intestinal.^{76,78} No entanto, a aquisição da amostra fecal depende do hábito intestinal, e esta pode ser contaminada no momento da coleta, já que frequentemente é realizada pelo próprio indivíduo. Além disso, a qualidade da amostra pode ser afetada pelo atraso no armazenamento ou pelo seu congelamento em temperaturas superiores a -20°C.⁷⁶ Outro método de amostragem é a biópsia de mucosa realizada durante a colonoscopia.⁷⁹ Apesar de favorecer uma excelente padronização para a coleta das amostras, a natureza invasiva desse método prejudica a implementação em larga escala ou quando se faz necessária a repetição da coleta em estudos longitudinais. Ademais, o preparo intestinal necessário para o procedimento pode alterar a composição microbiana de forma significativa.⁸⁰

Uma alternativa aos métodos citados é o uso de *swabs* retais. A coleta de *swabs* retais permite a aquisição de amostras para análise de microbioma de maneira eficiente e consistente, e tem a vantagem de já ser

realizada de forma rotineira em hospitais e outras instituições para rastreamento de microrganismos resistentes, com eficiência e segurança satisfatórias.^{81,82} A viabilidade de *swabs* retais já foi demonstrada para estudos longitudinais em populações variadas.^{70,83,84} O material extraído de amostras de *swabs* retais tem acurácia adequada para análises metagenômicas e é inclusive comparável ao microbioma adquirido através de amostras de fezes num mesmo indivíduo.⁸⁵ Além disso, a maioria dos kits de *swab* retal possuem um meio de conservação próprio que possibilita a preservação de microrganismos aeróbios e anaeróbios na amostra em temperatura ambiente por até 48 horas.⁸⁶

3.6.3.2 Procedimento do estudo para coleta de *swabs* retais

Realizamos a coleta de material para análise do microbioma através de *swabs* retais profundos (Copan Liquid Amies Swab, ESwab™, COPAN Italia), manipulados por enfermeiras treinadas. O kit do ESwab™ é estéril e contém os seguintes materiais para coleta: um tubo de polipropileno rosa com tampa rosqueada de formato cônico interno preenchido com 1ml de meio líquido Amies, e um cotonete aplicador de tamanho regular com ponta de fibra de náilon flocada.⁸⁷

A técnica de *swab* retal profundo consiste na introdução do aplicador no reto e progressão de pelo menos 2 cm, com rotações completas para coleta de material e retirada cautelosa do *swab* para impedir o contato com a região perianal.⁷⁰ O meio de conservação já presente no kit do ESwab™ (Amies) foi utilizado no transporte até o congelador. Após a coleta, os *swabs*

foram conservados em temperatura de -20°C, sendo transferidos em até 48 horas para congelamento a -80°C, onde permaneceram até o processamento e o sequenciamento final no Laboratório de Investigação Médica de Parasitologia do HCFMUSP (LIM 46).

Os *swabs* retais foram coletados na inclusão (S1) e 72 horas após a inclusão (S2) em todos os participantes. A coleta S2 não foi realizada em caso de recusa ou alta hospitalar antes de 72 horas. Uma terceira amostra de *swab* retal (S3) foi coletada caso o participante apresentasse alteração aguda do estado mental, com mudança na avaliação do CAM de negativo para positivo ou positivo para negativo, que não houvesse sido captada nas coletas S1 e S2 (Figura 1). A coleta S3 poderia ocorrer antes de 72 horas (conversão do CAM antes da amostra S2) ou após 72 horas (conversão do CAM após a amostra S2). O protocolo de coleta de *swabs* foi organizado dessa forma com o objetivo de minimizar a perda de dados e garantir a coleta de amostras em vigência de *delirium* e no momento da sua resolução, sem a necessidade de uma temporalidade fixa.

Figura 1 - Fluxograma com esquema geral dos procedimentos do estudo desde a inclusão

3.6.4 Análise do microbioma intestinal

3.6.4.1 Métodos de análise do microbioma intestinal

Tradicionalmente, o método utilizado para explorar as comunidades microbianas que sobrevivem fora do intestino é dependente de meios de cultura.⁸⁸ No entanto, apenas 40 a 50% dos microrganismos que integram a microbiota intestinal crescem em meios de cultura, o que se torna uma barreira para as análises laboratoriais dessas comunidades.^{4,89} Os avanços

recentes nas tecnologias de sequenciamento de alto rendimento (*high-throughput* ou *next-generation sequencing*) trouxeram a possibilidade de identificação rápida e mais abrangente desses microrganismos sem a necessidade de cultura, com técnicas moleculares baseadas no sequenciamento de DNA presente no gene 16S do RNA ribossomal (rRNA).^{77,89,90} O fundamento dessa abordagem é que o gene 16S rRNA é específico de procariontes e está presente em todos os genomas bacterianos.⁸⁹ O gene 16S rRNA possui regiões altamente conservadas entre as espécies, utilizadas para o desenvolvimento universal de *primers* que permitam a sua amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR), e regiões com sequências de nucleotídeos com variabilidade suficiente para permitir a caracterização e discriminação filogenética desses microrganismos.⁸ Apesar de ser baseado em um único gene, o sequenciamento dessa fração do DNA bacteriano permite determinar adequadamente a abundância e a diversidade dos microrganismos da amostra e tem um custo-benefício favorável.

Em seguida, é realizada a designação taxonômica de cada bactéria através da comparação das leituras (*reads*) de suas sequências, com bancos de dados de sequências de genes 16S rRNA já conhecidas. Essas sequências são agrupadas (ou "clusterizadas") em unidades taxonômicas operacionais (OTU), que são grupos de sequências próximas entre si, com uma taxa de dissimilaridade máxima (normalmente até 3%).⁹¹ O agrupamento em OTUs permite a comparação das sequências através de diferentes algoritmos, e quando não há atribuição a um táxon específico, as

leituras são agrupadas segundo sua similaridade.⁹² Enquanto permite minimizar os efeitos de potenciais erros de sequenciamento, o processo de clusterização pode afetar a diversidade filogenética real, já que táxons com alta similaridade podem não ser discriminados adequadamente. Consequentemente, foram desenvolvidas estratégias complementares como o *Divisive Amplicon Denoising Algorithm* (DADA), que é um método aplicado através de um pacote do programa R e utilizado para avaliar *amplicon sequence variants* (ASVs). Ele emprega inferência estatística para corrigir os erros de leitura dos produtos da PCR, submetendo essas leituras a um protocolo de *denoising* (remoção ou atenuação de ruídos), e separar erros de sequenciamento de variantes biológicas.⁸ Após *denoising*, é possível combinar em ASVs as sequências que diferem apenas por esses erros de leitura, gerando sequências únicas não-clusterizadas que são facilmente comparáveis entre diferentes bancos de dados. A versão atualizada do algoritmo DADA2 mostrou-se mais acurada que outros métodos, com maior resolução para variações finas na filogenética e menos sequências incorretas, superior ao agrupamento em OTUs.⁹³ Dessa forma, as comunidades bacterianas podem ser delimitadas com maior precisão e maior detalhamento de informações.

3.6.4.2 Procedimentos do estudo para análise do microbioma intestinal

A primeira etapa da análise consistiu na extração do DNA microbiano, utilizando o ZymoBIOMICS® DNA Miniprep Kit, segundo as instruções do

fabricante. Cada amostra foi descongelada e as pontas flocadas dos *swabs* foram excisadas juntamente com seu meio líquido para tubos contendo 750 µL de solução de lise. As amostras foram processadas em velocidade máxima e submetidas a repetidos ciclos de centrifugação conforme recomendado. Após essas múltiplas etapas, o DNA filtrado foi considerado adequado para PCR. As condições de PCR foram de 94°C por três minutos, seguidos por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridização a 58°C por 30 segundos, e extensão a 68°C por um minuto. A quantificação do DNA extraído foi feita com uso do Qubit® dsDNA BR Assay Kit, através do método de fluorescência ultrassensível e a purificação da biblioteca com uso do reagente Agencourt® AMPure® XP Reagent. Todas as amostras foram confirmadas visualmente e aprovadas para sequenciamento por uma banda específica de 350 pb usando gel de agarose a 1,5%. As amostras sem banda visível foram submetidas novamente à quantificação do DNA com um novo ciclo de PCR. Em persistindo a ausência da banda após duas tentativas, a amostra era excluída.

Alíquotas de 25 ng de DNA foram usadas para gerar bibliotecas *single-end* (“extremidade única”) direcionadas à região V4 do segmento 16S do rRNA bacteriano. A microbiota foi caracterizada por amplificação da região V4 usando os *primers* F515 (5'-CACGGTCGKCGGCGCCATT-3') e R806 (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3').⁹⁴ A preparação do *template* foi realizada pelo *Ion Chef System* usando o kit Ion PGM Hi-Q View Chef. O sequenciamento foi realizado com a *Ion Personal Genome Machine* (PGM)

usando o Ion PGM Hi-Q Sequencing Kit e o Ion 318 Chip v2 seguindo as instruções do fabricante.

Finalizadas as etapas acima, os dados gerados na plataforma Ion PGM Torrent foram exportados para análise das comunidades bacterianas identificadas.

3.7 Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPEsq, nº 006688019.0.0000.0068, 7 de fevereiro de 2019). Todos os participantes foram submetidos ao procedimento de consentimento, com leitura prévia do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo C) e de suas condições antes da assinatura final. A capacidade de consentimento foi baseada nas condições cognitivas dos candidatos e determinada de acordo com a capacidade de comunicar claramente decisões e compreender informações clínicas relevantes.⁹⁵ Consentimento duplo foi obtido dos participantes e de seus representantes quando declínio cognitivo leve era detectado, ou apenas dos representantes quando houvesse declínio cognitivo moderado a grave.

Os pesquisadores responsáveis forneceram informações de contato atualizadas para fácil acesso dos participantes em caso de dúvidas ou questionamentos. Quaisquer amostras ou dados armazenados durante o estudo foram desprovidos de identificação individual e marcados somente

com um número de protocolo no intuito de assegurar a confidencialidade dos participantes. Todas as informações coletadas foram registradas na plataforma de captura eletrônica *Research Electronic Data Capture* (REDCap), com intuito de garantir armazenamento e gerenciamento adequado dos dados do estudo.⁹⁶ O projeto seguiu os princípios da Declaração de Helsinki e do Manual para Boa Prática Clínica – Versão Harmonizada Tripartite (Conferência Internacional de Harmonização, ICH).

O projeto recebeu financiamento do *National Institute of Health* (NIH) para os custos relacionados a coleta e análise do microbioma intestinal, com vigência de 01 de maio de 2019 a 31 de outubro de 2020 (*subaward* N° 91581 do *Federal Award* N° R24AG054259).

3.8 Análise estatística

Estudos prévios realizados em idosos agudamente enfermos hospitalizados demonstraram uma ocorrência mínima de *delirium* correspondente a 29%, enquanto cerca de 47% dos idosos admitidos na enfermaria de Geriatria do HCFMUSP apresentaram diagnóstico de *delirium* em algum momento da hospitalização.^{44,97} Em um modelo animal de cirurgia abdominal em 19 camundongos, o único estudo disponível na temática de microbioma e *delirium* até o momento, foi possível detectar diferença na composição microbiana entre os grupos.⁹⁸ Dessa forma, estimamos o tamanho amostral em 130 participantes, considerando a menor ocorrência

possível de *delirium* no cenário de estudo, e assegurando uma quantidade adequada de pacientes por grupo de comparação.

As características gerais da população foram analisadas conforme estratégias tradicionais. Variáveis categóricas foram comparadas segundo a ocorrência de *delirium* utilizando o teste do qui-quadrado de Pearson ou teste exato de Fisher, conforme apropriado. Variáveis contínuas foram comparadas através do teste t de Student ou teste da soma dos postos de Wilcoxon, conforme as características da distribuição.

A composição do microbioma intestinal (diversidade alfa, diversidade beta, e abundância relativa) foi comparada entre grupos de acordo com a ocorrência dos desfechos de interesse durante a hospitalização, em dois níveis distintos de análise: (1) *swabs*; e (2) participantes.

Todos os testes estatísticos foram bicaudais e realizados com uso do Stata SE 15 (Stata Corp, College Station, TX), admitindo-se um erro alfa inferior a 5%. Em caso de múltiplas comparações, o nível de significância foi ajustado para *false discovery rate* (FDR) pelo método de Benjamini-Hochberg.⁹⁹ As análises de abundância relativa e seus respectivos gráficos foram construídos no programa R versão v4.0.2 (*R Foundation For Statistical Computing*, Viena, Áustria) disponível em <http://www.r-project.org>.

3.8.1 Análise estatística primária: por amostras de swabs

A análise primária foi realizada considerando a amostra geral de todos os *swabs* retais coletados (S1, S2 e S3; N=257), para comparação de desfechos pontuais por amostra:

- Ocorrência de *delirium*;
- Gravidade do episódio de *delirium* (escore numérico pontual do CAM-S);
- Alteração do nível de consciência (RASS diferente de zero).

Todos esses desfechos são de natureza flutuante e, portanto, de ocorrência variável em cada amostra analisada. Por se tratarem de observações dependentes, com mais de um *swab* por participante em cada grupo, os desfechos foram avaliados em relação à diversidade alfa e à abundância relativa com uso de *generalized estimating equations* (GEE), considerando os próprios indivíduos como variável de agrupamento (*clusters*). A associação independente entre composição do microbioma intestinal e os desfechos binários (*delirium* e nível de consciência) foi avaliada por modelos de regressão logística baseada em GEE, enquanto a gravidade de *delirium* pelo CAM-S foi analisada como variável contínua também com uso de GEE.

Em todas as análises multivariadas, utilizou-se a abundância relativa de microrganismos em nível de gênero como preditor principal, juntamente às seguintes variáveis de ajuste: idade, sexo, Charlson e IMC. A grande quantidade de gêneros distintos encontrados no sequenciamento leva a um problema de multicolinearidade. Para evitar esse problema, foi realizada redução de dimensionalidade utilizando *Principal Component Analysis* (PCA), utilizando os componentes principais como preditores no modelo.^{100,101} Os erros padrão reportados no GEE e a matriz de distâncias obtida no PCA foram combinados para produzir a matriz de covariância dos

coeficientes de cada táxon, que por sua vez foi utilizada para calcular a significância estatística de cada táxon.

Para a análise do desfecho primário, foram utilizados os 100 componentes principais, de modo a preservar 90% da variância explicada. Na análise para nível de consciência pelo RASS, o uso de 100 componentes tornou os dados linearmente separáveis, inviabilizando a regressão logística. Para contornar o problema, foram utilizadas apenas 30 componentes principais.

3.8.2 Análise estatística secundária: por indivíduo

A análise secundária considerou apenas a amostra S1 (basal) de cada participante para explorar a associação da composição microbiana individual antes da hospitalização em relação aos desfechos de interesse. Os pacientes com CAM positivo no momento da admissão (N=19) foram excluídos desta análise, de forma a isolar as características do microbioma individual sem a presença de *delirium*.

Essa análise incluiu os seguintes desfechos ao longo de toda a internação:

- *Delirium* incidente (detectado após 24 horas da admissão);
- Tempo em *delirium* (soma dos dias com CAM positivo);
- Gravidade dos episódios de *delirium* (escore numérico máximo do CAM-S);
- Alteração do nível de consciência (RASS diferente de zero em qualquer momento da internação).

A análise univariada da diversidade alfa e da abundância relativa em relação aos desfechos e às demais variáveis de interesse foi realizada com o teste da soma dos postos de Wilcoxon ou o teste de Kruskal-Wallis (desfechos categóricos), e com o coeficiente de correlação de Spearman (desfechos numéricos), conforme apropriado.

Analizamos também a relação entre os níveis de marcadores inflamatórios no *baseline* e a média dos índices de diversidade alfa na internação, também através do coeficiente de correlação de Spearman.

Para a análise multivariada, utilizamos modelos lineares generalizados com regularização L1 (LASSO)¹⁰² para todos os desfechos citados, considerando a natureza independente das observações por indivíduo. Este método é mais robusto para lidar com eventuais multicolinearidades, através da identificação de preditores relevantes e redução de preditores desnecessários. Portanto, não foi necessário utilizar o método indireto com componentes principais. As variáveis de ajuste foram as mesmas citadas na seção 3.8.1.

Foi realizada ainda análise multivariada por indivíduo investigando *delirium* como preditor de mortalidade hospitalar. Para tal, foi elaborado modelo de regressão logística, considerando um desfecho binário (morte vs. alta hospitalar), ajustado para ocorrência de *delirium*, idade, sexo, Charlson, e estado nutricional.

3.8.3 Análise de bioinformática

A análise de bioinformática do microbioma foi realizada com o *Quantitative Insights Into Microbial Ecology* (QIIME 2) versão 2019.10.¹⁰³ Os dados das sequências demultiplexadas foram submetidos a *denoising* com DADA2 (via *script* q2-dada2) para geração de ASVs.⁹³ Métricas de diversidade alfa e métricas de diversidade beta foram estimadas usando o *script* q2-diversity.^{104–106} As ASVs foram classificadas taxonomicamente usando o *script* q2-feature-classifier¹⁰⁷ contra 99% das sequências de referência do *Greengenes* 13_8.¹⁰⁸

As composições das comunidades da microbiota foram resumidas por proporção em diferentes níveis de taxonomia, incluindo espécie, gênero, família, ordem, classe e classificações de filo, com representação em gráficos de abundância relativa por grupos de ocorrência de *delirium*. A abundância relativa é calculada pela divisão da contagem (frequência) de um táxon específico pelo número de táxons presentes na amostra.

Gráficos de análise de coordenadas principais (PCoA) foram construídos através das distâncias de Bray-Curtis, do índice de Jaccard, e do teste Unifrac não-ponderado e ponderado para representação da diversidade beta e visualização da formação de *clusters* nos grupos de comparação.¹⁰⁵ Para adequação às métricas de diversidade beta, todos os desfechos contínuos foram categorizados: CAM-S (0: sem *delirium*; 1-2: *delirium* leve a moderado; 3-7: *delirium* grave) e tempo de *delirium* (≥ 4 dias e < 4 dias). A significância numérica da diversidade beta foi avaliada pela análise de variância permutacional multivariada (PERMANOVA), um teste

não-paramétrico mais estável em casos de heterogeneidade de dispersões ou distribuições.⁶³

Por fim, foi avaliada a presença de um *core microbiome*, ou seja, de um conjunto mínimo de microrganismos que estaria presente em todas (100%) ou na maioria (75-80%) das amostras, verificado através da filtragem de ASVs. Investigamos o *core microbiome* por grupo de ocorrência de *delirium*, tanto na amostra geral de *swabs* quanto apenas nas amostras de pacientes que apresentaram mudança do CAM durante a internação. Nesta última, avaliamos a flutuação do *core microbiome* separadamente nos subgrupos de conversão precoce (≤ 72 horas) e conversão tardia (> 72 horas) do CAM.

As análises do *core microbiome* foram realizadas utilizando a plataforma QIIME2 versão 2020.11, através do *plugin* qiime feature-table core-features, e as amostras foram filtradas utilizando o *plugin* qiime feature-table filter-samples. Para visualização dos dados, foi utilizada a extensão ggalluvial (v0.11.3) do pacote ggplot2 (v3.3.2) em ambiente R.

4 Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Características gerais da população

Foram incluídos 133 participantes entre 30 de setembro de 2019 e 17 de março de 2020 (Figura 2). No total, 56% eram do sexo masculino, com idade média de 75 (± 8) anos, e tempo de internação mediano de 8 (5,15) dias. Encontramos dados sugestivos de comprometimento cognitivo preexistente em 44 (33%) pacientes, com uma maior prevalência no grupo de pacientes com *delirium* (Tabela 1).

Delirium foi detectado em 38 pacientes (29%), 19 deles com CAM positivo já na admissão (*delirium* prevalente) e 19 desenvolvendo o distúrbio durante a hospitalização (*delirium* incidente). A mediana e o respectivo intervalo interquartil (IQR) do tempo em *delirium* para os participantes acometidos foi de 4 (2, 7) dias. A distribuição das categorias de gravidade de *delirium* entre os participantes foi de: 48% sem *delirium* (N=124), 38% com *delirium* leve a moderado (N=80), e 14% com *delirium* grave (N=53). Pacientes com *delirium* tinham idade mais elevada, maior frequência de desnutrição e maior dependência para ABVDs.

As internações ocorreram em sua maioria por doença cardiovascular (35%) e infecções com ou sem sepse (25%). Doenças neurológicas agudas representaram 19% das admissões, e outros diagnósticos (por ex.: insuficiência renal aguda, doenças hematológicas e doenças urológicas) representaram 21% delas.

Figura 2 - Fluxograma de inclusão dos participantes no estudo

Tabela 1 - Características sociodemográficas e clínicas da população de acordo com a ocorrência de *delirium* (N=133)

	Total N=133	Sem <i>delirium</i> N=95	<i>Delirium</i> N=38	P-valor
Grupo etário				0,001
65-74 anos	74 (56%)	59 (62%)	15 (39%)	
75-84 anos	40 (30%)	29 (31%)	11 (29%)	
≥85 anos	19 (14%)	7 (7%)	12 (32%)	
Idade	75 (±8)	73 (±7)	78 (±9)	0,002
Sexo masculino	74 (56%)	54 (57%)	20 (52%)	0,66
Anos de escolaridade	5 (±4)	6 (±5)	5 (±4)	0,34
Cirurgia	40 (30%)	27 (28%)	13 (34%)	0,51
Diagnóstico da internação				0,70
Cardiovascular	47 (35%)	34 (36%)	13 (34%)	
Sepse/infecção	33 (25%)	21 (22%)	12 (32%)	
Neurológico	25 (19%)	19 (20%)	6 (16%)	
Outros	28 (21%)	21 (22%)	7 (18%)	
Admissão na UTI	46 (35%)	29 (31%)	17 (45%)	0,12
Uso de antibióticos				
Geral	69 (52%)	46 (48%)	23 (61%)	0,21
Na inclusão (< 24h)	15 (11%)	10 (11%)	5 (13%)	0,66
Índice de Charlson	1 (0, 3)	1 (0, 3)	1 (0, 3)	0,53
Comprometimento cognitivo*	44 (33%)	27 (28%)	17 (45%)	0,07
Polifarmácia	51 (38%)	35 (37%)	16 (42%)	0,57
Déficit visual	108 (81%)	80 (84%)	28 (74%)	0,16
Déficit auditivo	22 (16%)	15 (16%)	7 (18%)	0,71
Uso de sonda vesical	48 (36%)	30 (32%)	18 (47%)	0,08
Funcionalidade				0,04
Dependente	6 (4%)	3 (3%)	3 (8%)	
Parcialmente dependente	25 (19%)	14 (15%)	11 (29%)	
Independente	102 (77%)	78 (82%)	24 (63%)	
Fragilidade				0,69
Robusto	13 (10%)	10 (11%)	3 (8%)	
Pré-frágil	55 (41%)	41 (43%)	14 (37%)	
Frágil	65 (49%)	44 (46%)	21 (55%)	
Nutrição				0,001
Normal	24 (18%)	20 (21%)	4 (11%)	
Risco de desnutrição	60 (45%)	50 (53%)	10 (26%)	
Desnutrição	49 (37%)	25 (26%)	24 (63%)	
Tempo de internação	8 (5-15)	8 (4-13)	14 (6-32)	0,003
BUN (mg/dL)	23 (16-38)	22 (16-34)	26 (15-43)	0,33
Proteína C-reativa (mg/dL)	37 (8-32)	35 (7-70)	41 (9-134)	0,15
IL-6 (pg/mL)	5,7 (2,2-17,0)	4,3 (1,9-15,6)	10,8 (2,9-47,1)	0,024
IL-10 (pg/mL)	3,2 (1,6-9,9)	2,9 (1,6-8,1)	5,5 (1,9-15,2)	0,10
TNF-alfa (pg/mL)	8,1 (4,9-15,6)	8,4 (5,5-14,8)	7,1 (3,8-22,7)	0,46
Óbito intra-hospitalar	21 (16%)	8 (8%)	13 (34%)	<0,001

Variáveis categóricas estão apresentadas como porcentagens ou frequências, e variáveis numéricas como média (± desvio-padrão) ou mediana (intervalo interquartil)

BUN: *blood urea nitrogen*.

*Comprometimento cognitivo preexistente foi definido como: (1) história clínica de demência; ou (2) alteração no rastreio cognitivo em pacientes com CAM negativo.

Não houve diferença significativa na realização de procedimentos cirúrgicos e admissão em unidades de terapia intensiva, apesar de uma maior frequência desta última no grupo que apresentou *delirium*. Também não houve diferenças em relação ao uso de antibióticos na inclusão (<24 horas) ou ao longo da internação. Nos pacientes que receberam antibióticos, a prescrição das principais classes de antibiótico de amplo espectro em ambiente hospitalar foi semelhante entre os grupos (cefalosporinas: $P=0,25$; carbapenêmicos: $P=0,41$).

Os níveis de IL-6 no *baseline* foram duas vezes e meia, e os de IL-10 quase duas vezes, maiores em pacientes que desenvolveram *delirium*, com diferença estatisticamente significativa apenas para IL-6 ($P=0,024$).

No total, 21 pacientes (16%) morreram no hospital, mas a mortalidade atingiu 34% em pacientes com *delirium*. *Delirium* associou-se de forma independente com mortalidade hospitalar após ajuste para idade, sexo, Charlson e estado nutricional (*odds ratio* [OR]=4,58; intervalo de confiança [IC] 95%=1,56-13,4; $P=0,006$).

4.2 Coleta e processamento dos swabs retais

Obtivemos 262 amostras de swab retal (Figura 3). Não foi possível coletar a amostra S2 em 25 participantes (tempo de hospitalização menor que 72 horas em 19 casos; recusa de nova coleta em 5 casos; e instabilidade hemodinâmica em 1 caso). Um participante apresentou sangramento retal leve e autolimitado após o procedimento, explicado pela

presença de uma doença anorretal previamente desconhecida. Nenhum outro evento adverso foi reportado.

Figura 3 - Fluxograma de inclusão das amostras de swab retal e seus respectivos momentos de coleta

Após sequenciamento de DNA e procedimentos de *denoising*, cinco swabs não alcançaram critérios de qualidade para serem submetidos às análises subsequentes (>30 mil leituras). Destes swabs, quatro eram de participantes que não sofreram *delirium* e um de participante com *delirium*. Ainda assim, cada um desses pacientes teve mais de uma amostra de swab coletada sob condições clínicas semelhantes durante a internação, e puderam ser adequadamente representados na análise comparativa. A amostra final foi de 257 swabs (S1=130; S2=107; S3=20). Dentre as

amostras S3, oito foram coletadas por conversão precoce do CAM (antes de 72 horas) e 12 foram por conversão tardia do CAM (após 72 horas).

4.3 Diversidade alfa

4.3.1 Diversidade alfa na amostra geral de swabs

De maneira geral, as amostras de pacientes com *delirium* apresentaram menor diversidade de microrganismos em comparação àquelas de pacientes sem *delirium* (Figura 4), tanto em termos de abundância indicada pelo índice de Shannon ($P=0,019$), quanto em equilíbrio de espécies bacterianas, conforme medido pelo índice de Pielou ($P=0,005$). Esses achados foram confirmados na análise multivariada ajustada para idade, sexo, Charlson e IMC, com melhores índices de diversidade alfa associando-se à menor ocorrência de *delirium*, tanto para o índice de Shannon ($OR=0,77$; IC 95% $=0,60-0,99$; $P=0,042$) quanto o de Pielou ($OR=0,02$; IC 95% $=0,002-0,33$; $P=0,005$).

Figura 4 - Diversidade alfa das amostras de swab segundo ocorrência de *delirium* (N=257). **A:** Índice de Shannon ($P=0,019$); **B:** Índice de Pielou ($P=0,005$)

Não houve diferença entre os grupos em relação ao número de espécies observadas ($P=0,48$) ou à diversidade filogenética medida pelo Faith PD ($P=0,91$).

Tabela 2 - Métricas de diversidade alfa (índices de Shannon e Pielou) nas amostras de *swab* retal de idosos agudamente enfermos de acordo com os desfechos de interesse (N=257)

Desfechos	Shannon	P	Pielou	P
<i>Delirium</i>		0,019		0,005
Ausente	5,7 (4,9 – 6,5)		0,73 (0,67 – 0,78)	
Presente	5,3 (4,6 – 5,8)		0,68 (0,61 – 0,74)	
Gravidade de <i>delirium</i> (Escore do CAM-S)		0,13*		0,061*
Ausente	5,8 (5,0 – 6,5)		0,73 (0,68 – 0,78)	
Leve a moderada	5,7 (4,9 – 6,5)		0,73 (0,68 – 0,78)	
Grave	5,2 (4,6 – 5,8)		0,67 (0,61 – 0,76)	
Nível de consciência		0,11		0,08
Normal	5,7 (5,0 – 6,5)		0,73 (0,67 – 0,78)	
Alterado	5,1 (4,4 – 5,5)		0,67 (0,61 – 0,73)	

Dados analisados com equações de estimativas generalizadas e apresentados como medianas (intervalo interquartil).

Alteração no nível de consciência foi definida como um escore diferente de zero no *Richmond Agitation and Sedation Scale* (RASS).

*Desfecho analisado como variável numérica pelo coeficiente de correlação de Spearman e categorizado para facilitar interpretação dos dados.

Resultados semelhantes foram encontrados para o nível de consciência medido pelo RASS, com índices de Shannon e Pielou indicando menor diversidade em amostras de pacientes com alteração do nível de consciência, mas sem diferença significativa pelos testes realizados (Tabela 2 e Figura 5).

Figura 5 - Diversidade alfa das amostras de *swab* segundo a alteração do nível de consciência (N=257). **A:** Índice de Shannon (P=0,11); **B:** Índice de Pielou (P=0,08)

As amostras de *swab* retal foram classificadas pontualmente pelo CAM-S como sem *delirium* em 48% (N=124), *delirium* leve a moderado em 31% (N=80), e *delirium* grave em 21% (N=53) dos casos. A mediana (IQR) do escore CAM-S para amostras de pacientes com e sem *delirium* foi 3 (1, 4) e 0 (0, 1), respectivamente. Não houve diferença nas métricas de diversidade alfa entre as os escores de gravidade de *delirium* (Figura 6), com uma tendência a significância para o índice de Pielou (Figura 7).

Figura 6 - Índice de Shannon nas amostras de *swab* segundo gravidade de *delirium* pelo CAM-S (N=257) (P=0,13).

Figura 7 - Índice de Pielou nas amostras de *swab* segundo gravidade de *delirium* pelo CAM-S (N=257) (P=0,061).

4.3.2 Diversidade alfa por indivíduo

As amostras de *baseline* dos indivíduos foram comparadas em relação aos desfechos e às covariáveis de interesse (idade, sexo, comprometimento cognitivo, e IMC).

Ao considerar apenas os 114 indivíduos com CAM negativo na admissão, não houve diferenças nas métricas de diversidade alfa basais quanto à incidência de *delirium*, gravidade máxima de *delirium*, tempo de *delirium* ou alteração de nível de consciência (Tabela 3). No entanto, ao incluir os 19 pacientes com *delirium* prevalente (CAM positivo na admissão), observamos índices de Shannon e Pielou menores nesses pacientes em comparação aos 114 restantes.

Tabela 3 - Métricas de diversidade alfa (índices de Shannon e Pielou) no baseline de idosos agudamente enfermos de acordo com os desfechos de interesse (N=114)

Desfecho	Shannon	P	Pielou	P
<i>Delirium</i> incidente		0,20		0,15
Ausente	6,1 (5,1 – 6,7)		0,74 (0,70 – 0,78)	
Presente	5,5 (4,8 – 6,4)		0,72 (0,68 – 0,74)	
<i>Delirium</i> prevalente (N=133)		0,05		0,005
Ausente	6,0 (5,1 – 6,7)		0,74 (0,69 – 0,78)	
Presente	5,3 (4,9 – 5,8)		0,65 (0,61 – 0,76)	
Gravidade máxima de <i>delirium</i>		0,26*		0,40*
Ausente	6,0 (5,1 – 6,7)		0,74 (0,70 – 0,79)	
Leve a moderada	5,8 (5,1 – 6,7)		0,74 (0,69 – 0,78)	
Grave	5,6 (4,8 – 6,4)		0,73 (0,68 – 0,76)	
Tempo em <i>delirium</i>		0,26*		0,16*
< 4 dias	6,0 (5,1 – 6,7)		0,74 (0,69 – 0,78)	
≥ 4 dias	5,8 (4,7 – 6,7)		0,72 (0,67 – 0,78)	
Nível de consciência		0,71		0,88
Normal	5,9 (5,0 – 6,7)		0,74 (0,68 – 0,78)	
Alterado	6,1 (5,3 – 6,5)		0,75 (0,69 – 0,78)	

Dados apresentados como mediana (intervalo interquartil). Pacientes com *delirium* na admissão (N=19) foram excluídos da análise, exceto para a variável *delirium* prevalente. Gravidade máxima de *delirium* medida pelo maior escore no CAM-S durante a internação. Alteração no nível de consciência foi definida como um escore diferente de zero no *Richmond Agitation and Sedation Scale* (RASS).

*Desfechos analisados como variável numérica pelo coeficiente de correlação de Spearman e categorizados para facilitar interpretação dos dados.

Em relação às características da população, observamos uma diferença significativa entre os índices de Shannon e Pielou quanto ao sexo e ao IMC (Tabela 4). Comparando sexo masculino e feminino também houve diferença na mediana [IQR] do número de espécies observadas (295 [201, 393] vs. 232 [139, 325]; $P=0,012$), e do Faith PD (23 [17, 28] vs. 19 [14, 24]; $P=0,009$). O número de espécies observadas foi diferente também entre as categorias de IMC ($P=0,033$). Indivíduos de idade mais avançada apresentaram menores índices de Shannon, mas essa diferença não se mostrou significativa.

Tabela 4 - Métricas de diversidade alfa (índices de Shannon e Pielou) no *baseline* da população de idosos agudamente enfermos de acordo com covariáveis de interesse (N=133)

Característica	Shannon	P	Pielou	P
Idade		0,73*		0,35*
65 – 74 anos	6,0 (5,0 – 6,5)		0,73 (0,69 – 0,78)	
75 – 84 anos	5,8 (5,3 – 6,7)		0,75 (0,68 – 0,78)	
≥ 85 anos	5,3 (5,1 – 6,5)		0,71 (0,64 – 0,78)	
Gênero		0,005		0,008
Masculino	6,1 (5,3 – 6,7)		0,75 (0,71 – 0,78)	
Feminino	5,5 (4,6 – 6,3)		0,71 (0,64 – 0,76)	
Comprometimento cognitivo		0,98		0,85
Ausente	5,8 (5,1 – 6,5)		0,73 (0,67 – 0,77)	
Presente	5,8 (5,1 – 6,6)		0,75 (0,68 – 0,78)	
IMC		0,024		0,055
< 19 kg/m ²	5,8 (5,1 – 6,1)		0,72 (0,64 – 0,76)	
≥ 19 e < 21 kg/m ²	5,0 (4,7 – 5,3)		0,70 (0,65 – 0,74)	
≥ 21 e < 23 kg/m ²	6,3 (5,6 – 6,9)		0,78 (0,70 – 0,79)	
≥ 23 kg/m ²	6,0 (5,1 – 6,7)		0,74 (0,68 – 0,78)	

Dados apresentados como mediana (intervalo interquartil).

*A idade foi analisada como variável numérica pelo coeficiente de correlação de Spearman e categorizada para facilitar interpretação dos dados.

4.4 Diversidade beta

4.4.1 Diversidade beta na amostra geral de swabs

Conforme as estimativas da PERMANOVA, houve diferença significativa em todas as métricas de diversidade beta de acordo com a ocorrência de *delirium*, indicando uma composição microbiana intestinal divergente entre os grupos estudados (Figura 8).

Sem *delirium*

Delirium

Figura 8 - Gráficos de análise de coordenadas principais para métricas de diversidade beta das amostras de *swab* retal de idosos agudamente enfermos segundo ocorrência de *delirium* (N=257). **A.** Bray Curtis (P=0,011); **B.** Jaccard (P=0,025); **C.** UniFrac não-ponderado (P=0,012); **D.** UniFrac ponderado (P=0,024)

Ao comparar grupos de acordo com alteração de nível de consciência pelo RASS, também foi observado diferença nas métricas de diversidade beta, com exceção do UniFrac ponderado (Figura 9). Já para os níveis de gravidade de *delirium* pelo CAM-S, não houve diferença significativa para essas métricas.

Figura 9 - Gráficos de análise de coordenadas principais para métricas de diversidade beta das amostras de swab retal de idosos agudamente enfermos segundo alteração do nível de consciência (N=257). **A.** Bray Curtis (P=0,006); **B.** Jaccard (P=0,003); **C.** UniFrac não-ponderado (P=0,03); **D.** UniFrac ponderado (P=0,193)

4.4.2 Diversidade beta por indivíduo

Considerando apenas a amostra basal de indivíduos sem *delirium* na admissão (N=114), não houve diferença nas métricas individuais de diversidade beta quanto aos desfechos de interesse (*delirium* incidente, gravidade de *delirium* e tempo de *delirium*).

4.5 Abundância relativa

4.5.1 Abundância relativa em nível de filo

Nas amostras de *swabs* dos pacientes com e sem *delirium*, os filos mais abundantes foram *Firmicutes* (56%), *Bacteroidetes* (25%), *Actinobacteria* (8%), e *Proteobacteria* (7%) (Figuras 10 e 11), que tiveram distribuições semelhantes entre os grupos (Figura 12).

Figura 10 - Abundância relativa de filos nas amostras de pacientes com *delirium*

Figura 11 - Abundância relativa de filos nas amostras de pacientes sem *delirium*

Figura 12 - Abundância relativa dos filos mais frequentes nos grupos com e sem *delirium*.(* $P > 0,1$; ** $P = 0,083$)

4.5.2 Abundância relativa em nível de gênero

Os gêneros mais abundantes nas amostras de pacientes com e sem *delirium* foram *Bacteroides* (5,7%), *Prevotella* (5%), *Finnegoldia* (2,6%), *Peptoniphilus* (2,2%), *Anaerococcus* (1,7%) e *Enterococcus* (0,03%). Na análise comparativa (Figura 13), houve diferença significativa entre os grupos com e sem *delirium* quanto às abundâncias relativas dos gêneros *Peptoniphilus* (1,3% vs. 3,1%) e *Enterococcus* (0,03% vs. 0,02%).

Figura 13 - Abundância relativa dos gêneros mais frequentes nos grupos com e sem *delirium* (* $P \geq 0,05$; ** $P = 0,024$; *** $P = 0,046$).

4.6 Análise multivariada - Abundância relativa

Após ajuste para idade, sexo, Charlson e IMC, identificamos a associação de alguns táxons bacterianos com os desfechos de interesse tanto na amostra geral de *swabs*, quanto na análise por indivíduo utilizando a amostra de *swabs* do *baseline*. Foram considerados os microrganismos com designação taxonômica preferencialmente em nível de gênero, ou em nível de família em caso de associação com maior tamanho de efeito.

4.6.1 Associação na amostra geral de swabs

Na amostra geral de *swabs*, diversos táxons associaram-se de forma independente com ocorrência de *delirium*, alteração do nível de consciência e gravidade de *delirium*, sendo os mais relevantes representados em ordem decrescente de tamanho de efeito na Tabela 5.

Tabela 5 – Principais associações entre táxons bacterianos e desfechos de interesse nas amostras de swab (N=257)

Filo/Classe/Ordem/Família/Gênero	Medida de associação	P-ajustado
Delirium	Odds Ratio (IC 95%)	
<i>Actinobacteria; Actinobacteria; Bifidobacteriales; Bifidobacteriaceae; Gardnerella</i>	1,04 (1,02 – 1,06)	<0,001
<i>Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae; Lactobacillus</i>	1,03 (1,02 – 1,05)	0,001
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Serratia</i>	1,03 (1,00 – 1,05)	0,030
<i>Bacteroidetes; [Saprospirae]; [Saprospirales]; Chitinophagaceae</i>	1,03 (1,01 – 1,04)	<0,001
<i>Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Leuconostocaceae; Fructobacillus</i>	1,03 (1,01 – 1,05)	0,013
Alteração do nível de consciência	Odds Ratio (IC 95%)	
<i>Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Enterococcaceae</i>	1,04 (1,02 – 1,06)	<0,001
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Serratia</i>	1,04 (1,02 – 1,06)	<0,001
<i>Proteobacteria; Betaproteobacteria; Neisseriales; Neisseriaceae; Neisseria</i>	1,03 (1,02 – 1,04)	<0,001
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Cardiobacteriales; Cardiobacteriaceae; Cardiobacterium</i>	1,03 (1,03 – 1,04)	<0,001
<i>Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Leuconostocaceae; Leuconostoc</i>	1,02 (1,01 – 1,03)	<0,001
Gravidade de delirium (escore do CAM-S)	Coeficiente (IC 95%)	
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Serratia</i>	0,16 (0,08 – 0,24)	0,001
<i>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Veillonellaceae;</i>	0,13 (0,05 – 0,21)	0,013
<i>Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Enterococcaceae;</i>	0,12 (0,05 – 0,20)	0,007
<i>Actinobacteria; Actinobacteria; Actinomycetales; Microbacteriaceae</i>	0,11 (0,04 – 0,18)	0,013
<i>Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Leuconostocaceae; Leuconostoc</i>	0,10 (0,05 – 0,15)	<0,001

Dados reportados como *odds ratio* para análises multivariadas por equações de estimativas generalizadas (GEE), e como coeficientes para análises por modelos lineares generalizados (GLM), com ajuste para idade, gênero, Charlson e índice de massa corpórea. O valor de P foi corrigido pelo método de Benjamini-Hochberg. CAM-S: *Confusion Assessment Method-Severity*; IC: intervalo de confiança.

Dentre as cinco associações mais fortes, observou-se a presença consistente de bactérias do gênero *Serratia* em todos os desfechos estudados. Além disso, identificamos bactérias produtoras de ácido láctico dos gêneros *Lactobacillus* e *Fructobacillus* (ocorrência de *delirium*), e do gênero *Leuconostoc* e da família *Enterococcaceae* (alteração do nível de consciência e gravidade de *delirium*).

4.6.2 Associação na amostra de baseline - por indivíduo

Na análise por indivíduo, ao considerar apenas as amostras de *baseline* sem *delirium*, observamos uma associação independente entre bactérias da família *Clostridiaceae* e *Fusobacteriaceae* com alteração do nível de consciência e gravidade máxima de *delirium* ao longo da internação. Outras associações relevantes também foram verificadas para esses desfechos (Tabela 6). Não identificamos nenhum táxon associado ao desfecho *delirium* incidente.

Tabela 6 – Principais associações entre táxons bacterianos e desfechos de interesse nas amostras de baseline (N=114)

Filo/Classe/Ordem/Família/Gênero	Tamanho de efeito
Alteração do nível de consciência	Odds Ratio (IC 95%)
<i>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae</i>	1,32
<i>Fusobacteria; Fusobacteriia; Fusobacteriales; Fusobacteriaceae</i>	1,27
<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Brucellaceae; Ochrobactrum</i>	1,09
<i>Firmicutes; Erysipelotrichi; Erysipelotrichales; Erysipelotrichaceae; RFN20</i>	1,08
<i>Actinobacteria; Coriobacteriia; Coriobacteriales.; Coriobacteriaceae</i>	1,07
Gravidade de delirium (escore do CAM-S)	Coefficiente (IC 95%)
<i>Fusobacteria; Fusobacteriia; Fusobacteriales; Fusobacteriaceae</i>	0,16
<i>Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Desulfovibrionales; Desulfovibrionaceae</i>	0,13
<i>Acidobacteria; Chloracidobacteria; RB41; Ellin6075</i>	0,12
<i>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Dehalobacteriaceae; Dehalobacterium</i>	0,11
<i>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae</i>	0,10

Dados reportados como *odds ratio* para desfecho binário e coeficientes para desfecho numérico, obtidos através de regressão LASSO com ajuste para idade, gênero, Charlson e índice de massa corpórea. O valor de P foi corrigido pelo método de Benjamini-Hochberg. CAM-S: *Confusion Assessment Method-Severity*; IC: intervalo de confiança.

4.7 Core microbiome e análise da conversão do CAM

Os resultados do *core microbiome* estão reportados como CORE 100% (presença da ASV em todas as amostras do grupo) e, em segundo lugar, como CORE 75% e 80% (presença da ASV em 75% ou 80% das amostras do grupo). Identificamos a presença de bactérias do gênero *Finnegoldia* como CORE 80% do total de amostras de *swabs* (N=257) e no grupo de amostras de pacientes sem *delirium* (N=204). No grupo de amostras de pacientes com *delirium* (N=53), observamos a família *Enterobacteriaceae* como CORE 80%.

4.7.1 Core microbiome – Conversão precoce do CAM

No subgrupo de pacientes que tiveram *delirium*, avaliamos as amostras daqueles que apresentaram mudança do CAM durante a internação (N=69) e analisamos o *core microbiome* de acordo com o momento da conversão: precoce (≤ 72 h) vs. tardio (> 72 h), com inclusão das amostras com e sem *delirium* dos mesmos pacientes.

Nos pacientes com conversão precoce do CAM, observamos a presença de seis táxons com CORE 80% e um táxon com CORE 100% (família *Enterobacteriaceae*) no grupo *delirium*, e os demais com CORE 75% no grupo sem *delirium* (Tabela 7).

Tabela 7 - *Core microbiome* das amostras de pacientes com *delirium* e conversão do CAM durante a internação (N=69)

Conversão do CAM	Subgrupo	Família/Gênero	CORE
Precoce	Sem <i>delirium</i> (N=17)	[<i>Tissierellaceae</i>]; <i>Finegoldia</i>	75%
		[<i>Tissierellaceae</i>]; <i>Anaerococcus</i>	75%
		<i>Enterobacteriaceae</i>	75%
		<i>Corynebacteriaceae</i> ; <i>Corynebacterium</i>	75%
	<i>Delirium</i> (N=16)	<i>Enterobacteriaceae</i>	100%
		[<i>Tissierellaceae</i>]; <i>Finegoldia</i>	80%
		<i>Corynebacteriaceae</i> ; <i>Corynebacterium</i>	80%
		<i>Bacteroidaceae</i> ; <i>Bacteroides</i>	80%
		<i>Methanobacteriaceae</i> ; <i>Methanobrevibacter</i>	80%
		<i>Porphyromonadaceae</i> ; <i>Parabacteroides</i>	80%
		<i>Actinomycetaceae</i> ; <i>Varibaculum</i>	80%
Tardia	Sem <i>delirium</i> (N=21)	[<i>Tissierellaceae</i>]; <i>Finegoldia</i>	80%
	<i>Delirium</i> (N=15)	<i>Porphyromonadaceae</i> ; <i>Parabacteroides</i>	80%

Representação dos táxons em nível de família ou gênero, presentes em 75%, 80% ou 100% das amostras por subgrupo. CAM: *Confusion Assessment Method*.

O gênero *Anaerococcus* foi exclusivo das amostras sem *delirium*, e os gêneros *Bacteroides*, *Methanobrevibacter*, *Parabacteroides* e *Varibaculum* foram exclusivos das amostras no momento de conversão para *delirium*.

Na mudança do estado mental de sem *delirium* para com *delirium*, houve uma flutuação da concentração de alguns táxons, mais perceptível pela redução da abundância relativa de *Corynebacterium*, e um aumento da abundância relativa dos gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides* (Figura 14).

Figura 14 - Flutuação do *core microbiome* em amostras de *swab* com e sem *delirium* nos pacientes com conversão precoce do CAM

4.7.2 Core microbiome – Conversão tardia do CAM

Nos pacientes com mudança do CAM após 72 horas, observamos a presença de apenas um táxon por grupo com CORE 80% (Tabela 7). No grupo sem *delirium*, manteve-se a presença do gênero *Finegoldia* e no grupo com *delirium*, a predominância do gênero *Parabacteroides* (Figura 15).

Figura 15 - Flutuação do *core microbiome* em amostras de *swab* com e sem *delirium* nos pacientes com conversão tardia do CAM.

4.8 Diversidade alfa e marcadores inflamatórios

Os níveis de IL-6 e IL-10 no *baseline* associaram-se aos índices médios de Shannon e Pielou ao longo da internação (Figuras 16 e 17), estando níveis de marcadores inflamatórios mais elevados relacionados a menores índices de diversidade alfa. Os níveis de TNF-alfa mostraram relação apenas com o índice de Shannon médio ($P=0,025$), mantendo o mesmo padrão de associação.

Figura 16 - Relação entre os níveis de IL-6 no *baseline* e a média das métricas de diversidade alfa na internação. **A:** Shannon ($P=0,002$); **B:** Pielou ($P=0,008$)

Figura 17 - Relação entre os níveis de IL-10 no *baseline* e a média das métricas de diversidade alfa na internação. **A:** Shannon ($P=0,002$); **B:** Pielou ($P=0,036$)

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

Em uma coorte de idosos agudamente enfermos hospitalizados, observamos que *delirium* ocorreu em 29% dos casos, associando-se de forma independente com mortalidade hospitalar. Participantes com *delirium* caracterizaram-se por idade mais elevada, pior estado nutricional e maior dependência funcional em comparação àqueles sem *delirium*, observações compatíveis com descrições de outras populações.^{46,109}

5.1 Alterações do microbioma intestinal e desfechos de interesse

Investigamos a presença de alterações estruturais (“quantitativas”: diversidades alfa e beta) e de composição específica (“qualitativas”: abundância relativa e *core microbiome*) do microbioma de nossos participantes.

No geral, observamos que a estrutura do microbioma intestinal foi diferente entre participantes com e sem *delirium*, conforme indicado por métricas de diversidade alfa e por todas as medidas de diversidade beta realizadas. As amostras de *swab* retal de pacientes com *delirium* apresentaram menor riqueza e menor abundância de microrganismos, com desequilíbrio das representações taxonômicas em comparação às amostras coletadas na ausência de *delirium*. Tais achados foram sustentados na análise multivariada, com melhores índices de diversidade associados à

menor ocorrência de *delirium*. Amostras de pacientes com alteração de nível de consciência medido pelo RASS, um marcador sensível de mudanças agudas do estado mental, também apresentaram índices de diversidade alfa numericamente menores, mas sem diferenças significativas nos testes realizados.

Na análise de abundância relativa, houve identificação de táxons bacterianos associados à ocorrência de *delirium*, gravidade de *delirium* e alteração do nível de consciência, mesmo após ajuste para fatores de confusão como idade, sexo, Charlson e IMC. Com isso, entende-se que possa existir não apenas uma diferença estrutural (quantitativa) de táxons, mas também uma composição divergente (qualitativa) entre o microbioma de cada grupo estudado.

Ao se analisarem apenas as amostras de *baseline*, excluindo aquelas correspondentes a pacientes com *delirium* na admissão (*delirium* prevalente), não houve diferença nas métricas de diversidade alfa e beta entre os grupos de indivíduos quanto aos desfechos da internação. Como essas amostras foram coletadas em menos de 24 horas da admissão hospitalar, representariam o microbioma basal de cada indivíduo advindo da comunidade, apesar da influência de uma doença aguda, e poderiam apontar características estruturais diferentes entre aqueles suscetíveis ou não à ocorrência futura de *delirium*.

Nessa mesma análise da admissão, reincluímos as amostras de indivíduos com *delirium* prevalente (N=19) para compará-las com aquelas de pacientes sem *delirium* (N=114), encontrando menores índices de Shannon

e Pielou nos pacientes com *delirium*, com achados confirmados na análise multivariada. Estes achados sugerem que o quadro vigente de *delirium*, com seus mecanismos fisiopatológicos intrínsecos e/ou condições associadas, seja importante para gerar modificações estruturais no microbioma, e não apenas a hipótese de que um microbioma menos diverso e menos abundante seria preditor da ocorrência futura de *delirium*.

Em contrapartida, na análise multivariada incluindo dados de *baseline* por indivíduo, identificamos que táxons bacterianos específicos (família *Clostridiaceae* e *Fusobacteriaceae*) associaram-se com os desfechos de gravidade de *delirium* e com alteração do nível de consciência ao longo da internação. Apesar da estrutura geral do microbioma, medida pelas diversidades alfa e beta, não ter se mostrado um preditor nessa população da ocorrência de *delirium* e dos desfechos citados acima, a presença de determinadas bactérias ou sua abundância relativa poderia sinalizar essa predisposição, conforme já identificado em outros distúrbios neurocognitivos.¹¹⁰

5.2 Associação entre *delirium* e microbioma intestinal

Este é o primeiro estudo de nosso conhecimento que investigou a associação entre *delirium* e alteração microbiana intestinal em pacientes idosos hospitalizados. Dentro de uma temática semelhante, apenas um estudo experimental publicado em 2019 explorou a possível relação entre microbioma intestinal e *delirium*, mas com uma investigação realizada em

camundongos.⁹⁸ Nesse estudo, os animais foram submetidos a cirurgia abdominal e acompanhados no pós-operatório para a detecção de comportamentos *delirium-like*. Semelhante aos achados nos idosos agudamente enfermos da nossa coorte, os camundongos com *delirium* pós-operatório tiveram menores índices de diversidade alfa, além de uma composição microbiana global diferente daqueles que não apresentaram *delirium*. Análises adicionais demonstraram que essa diferença ocorreu em seis níveis taxonômicos diferentes (desde a classificação de filos até às espécies bacterianas).⁹⁸ Esses dados experimentais suportam os achados do presente estudo, ao indicar a existência de uma composição microbiana intestinal diferente relacionada à presença de *delirium*. Apesar de ter envolvido um procedimento cirúrgico abdominal, que sabidamente altera a microbiota intestinal,¹¹¹ esta intervenção foi realizada em ambos os grupos com e sem *delirium*, minimizando a influência desse potencial fator de confusão. Em nosso estudo, também procuramos controlar a interferência de patologias abdominais nos resultados no momento da seleção dos participantes, excluindo aqueles com alterações agudas ou graves do TGI.

5.3 Disbiose intestinal e *delirium*: aspectos fisiopatológicos e clínicos

5.3.1 Papel da inflamação e de cepas bacterianas específicas

Um mecanismo plausível para fundamentar a associação encontrada entre *delirium* e disbiose intestinal é a atuação de fatores inflamatórios. *Delirium* é considerado uma síndrome aguda com forte componente

inflamatório, tanto em estudos em humanos, quanto em modelos animais.^{47,112} Níveis elevados de marcadores inflamatórios (por ex.: IL-1, IL-6, TNF-alfa) são detectados em pacientes com *delirium*, não apenas em dosagens séricas, mas também em análises de líquido cefalorraquidiano. Essa associação com inflamação também é observada em relação ao microbioma intestinal. Há evidências de alterações TNF-dependente na abundância relativa de algumas espécies microbianas, denotando a importância da inflamação na composição desse microbioma.¹³ Este fato poderia explicar, por exemplo, porque essencialmente todas as doenças inflamatórias crônicas, dentre elas doenças cardiovasculares e demência, podem estar associadas a disbiose.^{13,113} No presente estudo, verificamos níveis mais elevados de IL-6 e IL-10 em pacientes com *delirium*, já reportados em estudos anteriores¹¹⁴, e o aumento desses marcadores também esteve associado a menores índices de diversidade alfa durante a internação, sugerindo uma potencial via de associação entre as alterações de microbioma intestinal e a ocorrência de *delirium*.

Em modelos experimentais com camundongos idosos que abrigavam determinadas espécies microbianas intestinais, houve uma produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias e menor sobrevivência em comparação a camundongos livres desses microrganismos.¹¹⁵ Por outro lado, algumas cepas bacterianas (por ex.: *Lactobacillus acidophilus* ou *Bifidobacterium breve*) associaram-se a uma atividade anti-inflamatória direta, com capacidade de neutralizar insultos,¹¹⁶ e a ausência dessas cepas

“protetoras” poderia contribuir para a vulnerabilidade a distúrbios com componentes inflamatórios em sua fisiopatologia.

Apesar da inflamação ter uma participação central na fisiopatologia de *delirium*, os mediadores inflamatórios são frequentemente induzidos em condições agudas diversas, como sepse, pós-operatório e traumas. Dessa maneira, a existência de uma vulnerabilidade cerebral, por exemplo através da pré-ativação da micróglia, parece um fator crucial para determinar se a inflamação deflagrará o quadro de *delirium* ou não.¹¹⁷

Além da via inflamatória, a interface entre *delirium* e microbioma intestinal pode ser explicada por outros mecanismos fisiopatológicos. Algumas cepas bacterianas já foram relacionadas à produção de neurotransmissores com participação conhecida na fisiopatologia de *delirium*, como acetilcolina, dopamina e serotonina.³⁴ Além disso, a inoculação intraperitoneal de endotoxinas bacterianas, como o LPS, associou-se ao surgimento de alterações cognitivas e comportamentais agudas em modelos animais, com evidência de alterações cerebrais diretas e ativação microglial, com produção de IL-1 β .¹¹⁸

Em estudos com outros transtornos neuropsiquiátricos (por ex.: pacientes com autismo, ou modelos animais de doença de Alzheimer), o aumento na abundância relativa de alguns componentes da microbiota intestinal e a produção anormal de produtos bacterianos também associaram-se a ativação da micróglia e dos astrócitos, indicando a possibilidade de lesão neuronal direta ou indiretamente modulada pela microbiota intestinal.²⁸

Um dos modelos que fortalecem a hipótese de interação entre microbioma intestinal, cognição e inflamação é o da encefalopatia hepática. A presença de fatores precipitantes como aumento na produção de amônia, e a recomendação de abordagem terapêutica com prebióticos (lactulose), antibióticos, e fibras solúveis já mostravam indícios do desequilíbrio de flora intestinal como potencial colaborador em sua fisiopatologia.¹¹⁹ Uma investigação feita por Bajaj et al. (2012) em pacientes cirróticos mostrou diferenças significativas na composição bacteriana intestinal entre aqueles com e sem história de encefalopatia hepática.¹¹⁰ Houve uma associação entre microbioma intestinal, distúrbios cognitivos e inflamação apenas no grupo de encefalopatia hepática, com identificação de famílias bacterianas específicas (*Alcaligenaceae*, *Porphyromonadaceae*, e *Enterobacteriaceae*) associadas a um pior desempenho cognitivo, independentemente da gravidade da cirrose hepática medida pelo escore MELD. Nota-se que a família *Alcaligenaceae* é composta de proteobactérias capazes de degradar ureia em amônia, ressaltando a sua potencial participação na fisiopatologia da encefalopatia hepática.¹¹⁰

Em nossa amostra geral, a abundância de filos como *Bacteroidetes* e *Firmicutes* é compatível com a dominância reportada no intestino de indivíduos adultos em grandes estudos de caracterização do microbioma humano.⁷⁸ Por outro lado, a elevada prevalência de bactérias da família *Enterobacteriaceae* nas amostras de pacientes com *delirium* (CORE 80%), especialmente naqueles com conversão precoce do CAM (CORE 100%), sugerem o estado pró-inflamatório desses indivíduos, considerando o papel

que essas bactérias possuem na modulação da resposta inflamatória e na exacerbação do dano tecidual agudo.¹²⁰ Esse “táxon pro-inflamatório” foi prevalente também em uma população de pacientes admitidos em unidade de terapia intensiva, com achado de disbiose intensa associada à doença crítica.¹²¹ Em nível de gênero, a *Serratia* é um dos representantes da família *Enterobacteriaceae*, e associou-se de forma independente à ocorrência de *delirium*, gravidade de *delirium* e alteração do nível de consciência em nossa população. Bactérias do gênero *Serratia* também já foram associadas à produção de neurotransmissores envolvidos na fisiopatologia de *delirium*, como a dopamina.³⁴

Na subanálise do *core microbiome* dos pacientes com mudança do CAM durante a internação, a presença predominante do gênero *Parabacteroides* foi compartilhada nas amostras de *delirium* tanto dos pacientes com conversão precoce quanto daqueles com conversão tardia do CAM. Já o gênero *Bacteroides* estava presente na maioria das amostras (CORE 80%) de *delirium* apenas daqueles com conversão precoce, e não se mostrou representativo nas amostras sem *delirium*. Ambos os gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides*, pertencentes ao filo *Bacteroidetes*, são abundantes no intestino humano.⁷⁸ No contexto de *delirium*, uma potencial contribuição dessas cepas é a sua participação em vias de produção de GABA, uma função já demonstrada em estudo com indivíduos saudáveis.¹²² Nesta mesma população, a abundância relativa de *Bacteroides* mostrou-se inversamente relacionada à conectividade funcional de áreas ligadas ao desenvolvimento de transtorno depressivo maior, enquanto a administração

de uma cepa probiótica (*Lactobacillus rhamnosus* JB-1) em camundongos foi capaz de reduzir comportamentos depressão-*like*, junto a mudanças de expressão de GABA em receptores de diversas áreas cerebrais, como amígdala e hipocampo.¹²³ O GABA é considerado o principal neurotransmissor inibitório, e tem participação conhecida na fisiopatologia de *delirium*.

Outros táxons presentes de forma exclusiva no *core microbiome* das amostras dos pacientes com *delirium* que apresentaram conversão precoce foram os gêneros *Methanobrevibacter* e *Varibaculum*, em menor abundância que os citados anteriormente. Bactérias metanogênicas como *Methanobrevibacter* são responsáveis por converter dióxido de carbono em metano através do uso de unidades de hidrogênio e de outros substratos.¹²⁴ Elas atuam predominantemente no processo de fermentação intraluminal, contribuindo para a degradação de polissacarídeos e a produção de ácidos graxos de cadeia leve. Além disso, sua concentração mostrou-se aumentada em pacientes com consistência fecal endurecida e lentificação do trânsito intestinal¹²⁵, o que poderia trazer uma implicação para pacientes com *delirium*, já que constipação é um fator precipitante reconhecido na prática clínica e confirmado em análises recentes.¹²⁶ Apesar de ter sido avaliada como fator de exclusão, a presença de constipação não foi determinada longitudinalmente na internação, não sendo possível estabelecer sua associação com *delirium* ou com as cepas encontradas em nossa população.

Todas as associações descritas persistiram após ajuste para fatores de gravidade, como Charlson e IMC. Ainda assim, as intercorrências clínicas e outros marcadores prognósticos que frequentemente permeiam o quadro de *delirium*¹²⁷ também poderiam contribuir de forma relevante para as alterações observadas no microbioma intestinal e precisam ser consideradas ao se transpor os presentes achados para a prática clínica.

5.3.2 Aspectos clínicos da associação entre disbiose e *delirium*

Nossos achados são também instigantes por admitir que a relação entre disbiose intestinal e *delirium* pode ser bidirecional. Por um lado, os fatores precipitantes do quadro de *delirium* (por ex.: infecção, distúrbios metabólicos) ou aqueles ligados à sua fisiopatologia (por ex.: biomarcadores inflamatórios e de lesão neuronal, ou desregulação neuroendócrina) poderiam modificar o microbioma intestinal. Por outro lado, a participação direta e ativa dessas bactérias poderia modular a ocorrência de *delirium* através da produção (ou da ausência de neutralização) de citocinas próinflamatórias e de outros mediadores com ação no SNC.

Além de modelos fisiopatológicos que embasam a vulnerabilidade aguda dos pacientes com *delirium*, a evidência de disbiose intestinal em modelos clínicos de vulnerabilidade crônica em idosos, como a síndrome de fragilidade, também corroboram os achados do presente estudo. A característica mais consistente do microbioma intestinal do idoso frágil é a perda de diversidade, semelhante ao encontrado nas amostras de participantes com *delirium*. Em pacientes com fragilidade, a redução da

diversidade microbiana pode ser influenciada por fatores como mudanças dietéticas, menor capacidade de exercitar-se, uso de medicamentos, e a exposição mais frequente a antibióticos.^{128,129}

De forma geral, a redução da diversidade e da riqueza do microbioma intestinal está associada a diversas outras condições patológicas, como alterações metabólicas (por ex.: dislipidemia e aumento da resistência insulínica) e estados inflamatórios de baixo grau, enquanto altos índices de diversidade microbiana são indicativos de um bom estado de saúde.^{3,130} Conforme demonstrado em estudos prévios, a riqueza microbiana pode ser restituída após intervenções dietéticas sistematizadas, com impacto inclusive nos fenótipos clínicos associados, ainda que essa resposta seja parcial.¹³¹ Por exemplo, a administração de leite fermentado com probióticos foi capaz de modular a atividade cerebral em mulheres saudáveis submetidas a tarefas de desempenho cognitivo-emocional, em comparação àquelas que não receberam a intervenção, segundo avaliado por imagens de ressonância magnética funcional.¹³²

A correlação positiva percebida em termos de conectividade neuronal nas regiões modulatórias, como o córtex pré-frontal medial e dorsolateral, e a redução da atividade em outras áreas (por ex.: pertencentes à rede sensorial cerebral), apontam para o potencial impacto de terapias semelhantes aplicadas a condições neurológicas diversas, incluindo *delirium*. Em análises futuras, será importante esclarecer a contribuição de potenciais mediadores das diferenças encontradas entre os pacientes com e sem *delirium*, como moléculas sinalizadoras produzidas pela microbiota (por

ex.: triptofanos, GABA). Esse passo adicional será crucial na investigação de possíveis alvos de intervenções terapêuticas em indivíduos suscetíveis à ocorrência de *delirium*.

5.4 Pontos fortes e limitações

Este trabalho apresenta limitações. Foi realizado em único centro de um hospital universitário terciário, cujo pronto-socorro recebe apenas pacientes referenciados. Além disso, para minimizar potenciais confundidores, especialmente em relação ao preditor de interesse (microbioma intestinal), optamos por impor critérios de elegibilidade mais restritos, o que poderia comprometer a validade externa de nossos resultados. Como um estudo de prova de conceito da associação entre microbioma intestinal e *delirium*, os critérios de seleção mais rigorosos foram prioritários em relação à representatividade de participantes em termos epidemiológicos. Ainda assim, foi possível alcançar um tamanho amostral adequado e com uma população de características clínicas semelhantes a de outros estudos com idosos agudamente enfermos.^{133,134} Apesar de pacientes em uso de antibióticos por mais de 24 horas na admissão terem sido excluídos do estudo, não foi possível determinar se houve uso nas semanas anteriores. Ainda assim, a exclusão de pacientes institucionalizados ou com hospitalização nos últimos 30 dias minimiza a chance de exposição a antimicrobianos de amplo espectro nesse período. Portanto, não esperamos

um efeito significativo desse potencial fator de confusão em nossos resultados finais.

A análise do microbioma intestinal limitou-se a cepas bacterianas já identificadas e registradas em bancos de dados validados, sem a possibilidade de explorar a presença de cepas desconhecidas ou determinar a função das comunidades bacterianas existentes, dados esses obtidos através das análises de sequenciamento genômico completo (tipo *shotgun*) e de metatranscriptômica.⁸ No entanto, as informações taxonômicas fornecidas pela análise do gene 16S rRNA são aceitas como suficientes para estudos como o nosso, centrados no objetivo de prova de conceito e de geração de novas hipóteses de pesquisa. É importante ressaltar que, apesar da detecção de determinada cepa bacteriana em um ambiente não significar que ela esteja exercendo ali uma função específica, sua identificação contribui para a construção do conhecimento sobre o assunto, e pode apontar para novos caminhos de investigação fisiopatológica. Portanto, é fundamental que estudos subsequentes nessa área explorem potenciais alterações funcionais e interferências metabólicas das cepas bacterianas implicadas na associação entre *delirium* e microbioma intestinal.

Diversos pontos fortes também devem ser destacados. Em primeiro lugar, foi realizada uma investigação inédita da associação entre microbioma intestinal e *delirium* em indivíduos idosos. Essa linha de pesquisa poderá abrir caminhos para a identificação de novos biomarcadores e novas abordagens direcionadas a uma condição com elevada morbimortalidade e poucas intervenções eficazes para sua prevenção e tratamento. A detecção

de *delirium* foi realizada duas vezes ao dia e por profissionais de saúde treinados, aumentando a chance de detecção de alterações agudas do estado mental entre os participantes. Além disso, foi possível coletar mais de uma amostra de *swab* retal por paciente, permitindo a avaliação seriada do microbioma intestinal durante a internação, com perda mínima de dados. Potenciais fatores de confusão da associação entre cepas bacterianas específicas e *delirium*, como uso de antibióticos prévio, uso de antibióticos de amplo espectro na internação, e admissão na unidade de terapia intensiva, que poderiam favorecer a disbiose intestinal e a colonização por germes multirresistentes, foram avaliados em todos os pacientes e mostraram-se semelhantes entre os grupos de comparação, minimizando o seu impacto em nossas inferências principais. Também foi possível quantificar níveis de marcadores inflamatórios séricos e os correlacionar com a ocorrência de *delirium* e com as métricas de diversidade microbiana, permitindo-se explorar uma potencial via de mediação da associação entre microbioma intestinal e *delirium*.

6 Conclusões

6 CONCLUSÕES

Ao estudar o microbioma intestinal de idosos agudamente enfermos hospitalizados, concluímos que:

- Houve uma associação significativa entre a composição do microbioma intestinal e a ocorrência de *delirium*.
- As diferenças encontradas entre os grupos sugerem um microbioma intestinal mais pobre (menor abundância, menor diversidade) em pacientes com *delirium* em comparação com aqueles sem *delirium*.
- Observamos que as amostras de pacientes apenas com alteração do nível de consciência, um marcador sensível de mudança aguda do estado mental, apresentaram menor diversidade beta em comparação com aquelas de pacientes com nível de consciência normal, indicando uma composição divergente entre os grupos e corroborando os achados encontrados para o desfecho primário.
- Na análise de abundância relativa, identificamos táxons bacterianos associados à ocorrência de *delirium*, gravidade de *delirium* e alteração do nível de consciência, que se confirmou

também na análise das amostras do *baseline*, com exceção do desfecho de *delirium* incidente.

- As diferenças de estrutura e de composição do microbioma intestinal entre os grupos de desfecho persistiram mesmo após ajuste para fatores de confusão relevantes, como idade, sexo, Charlson e IMC.
- O *core microbiome* de pacientes com *delirium* mostrou-se diferente daqueles sem *delirium*, com predominância de bactérias do gênero *Bacteroides*, *Parabacteroides*, e *Methanobrevibacter* no primeiro grupo, e dos gêneros *Anaerococcus* e *Finnegoldia* no segundo grupo.
- A elevação de citocinas inflamatórias mostrou-se associada tanto à ocorrência de *delirium* quanto às métricas de diversidade alfa microbiana, indicando um potencial mecanismo fisiopatológico de mediação entre microbioma intestinal e *delirium*.
- A ocorrência de *delirium* associou-se de forma independente com maior mortalidade hospitalar.

7 Trabalhos futuros

7 TRABALHOS FUTUROS

Perspectivas futuras de trabalhos na área incluem:

- A investigação da associação entre fatores precipitantes de *delirium* com as alterações de microbioma intestinal, explorando a influência de condições clínicas específicas (por ex.: sepse) na disbiose intestinal relacionada a *delirium*.
- A aplicação de análises de metagenômica (tipo *shotgun*) e metatranscriptômica numa população semelhante à do presente estudo, para explorar a presença de cepas desconhecidas ou determinar a função de cepas bacterianas existentes, com potencial delineamento de vias metabólicas implicadas na associação entre *delirium* e microbioma intestinal.
- A avaliação da associação entre microbioma intestinal e *delirium* em diferentes cenários de cuidado (por ex.: pós-operatório de cirurgia eletiva, instituição de longa permanência). Sabendo que o ambiente hospitalar é colonizado por bactérias mais resistentes e com perfis patogênicos específicos, esta investigação permitiria identificar

as particularidades dos perfis de composição bacterianas nesses locais em sua associação com a ocorrência de *delirium*.

- A realização de ensaios clínicos (fase 1 e 2) de tratamento e prevenção de *delirium* com a administração de prébióticos ou probióticos selecionados, com o objetivo de avançar no conhecimento na área e oferecer suporte para a construção de uma potencial relação causal entre as características do microbioma intestinal e *delirium*.

8 Referências

8 REFERÊNCIAS

1. Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol.* 1977;31(1):107-33.
2. de la Cuesta-Zuluaga J, Kelley ST, Chen Y, Escobar JS, Mueller NT, Ley RE, et al. Age- and sex-dependent patterns of gut microbial diversity in human adults. *mSystems.* 2019;4(4):1-12.
3. Lynch S V., Pedersen O. The human intestinal microbiome in health and disease. Phimister EG, editor. *N Engl J Med.* 2016;375(24):2369-79.
4. Bedani R, Rossi EA. Microbiota intestinal e probióticos: Implicações sobre o câncer do cólon. *J Port Gastrenterol.* 2009;16:19-28.
5. Marchesi JR, Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome.* 2015;3(1):31.
6. Hillman ET, Lu H, Yao T, Nakatsu CH. Microbial ecology along the gastrointestinal tract. *Microbes Environ.* 2017;32(4):300-13.
7. Kundu P, Blacher E, Elinav E, Pettersson S. Our gut microbiome: The evolving inner self. *Cell.* 2017;171(7):1481-93.
8. D'Argenio V. Human microbiome acquisition and bioinformatic challenges in metagenomic studies. *Int J Mol Sci.* 2018;19(2):383.
9. Fujimura KE, Sitarik AR, Havstad S, Lin DL, Levan S, Fadrosch D, et al. Neonatal gut microbiota associates with childhood multisensitized atopy and T cell differentiation. *Nat Med.* 2016;22(10):1187-91.

10. Nishida A, Inoue R, Inatomi O, Bamba S, Naito Y, Andoh A. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clin J Gastroenterol*. 2018;11(1):1-10.
11. Pedersen HK, Gudmundsdottir V, Nielsen HB, Hyotylainen T, Nielsen T, Jensen BAH, et al. Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature*. 2016;535(7612):376-81.
12. O'Toole PW, Jeffery IB. Gut microbiota and aging. *Science* (80-). 2015;350(6265):1214-5.
13. DeJong EN, Surette MG, Bowdish DME. The gut microbiota and unhealthy aging: disentangling cause from consequence. *Cell Host Microbe*. 2020;28(2):180-9.
14. Cabreiro F, Gems D. Worms need microbes too: microbiota, health and aging in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO Mol Med*. 2013;5(9):1300-10.
15. Smith P, Willemsen D, Popkes M, Metge F, Gandiwa E, Reichard M, et al. Regulation of life span by the gut microbiota in the short-lived African turquoise killifish. *Elife*. 2017;6:e27014.
16. Vaiserman AM, Koliada AK, Marotta F. Gut microbiota: A player in aging and a target for anti-aging intervention. *Ageing Res Rev*. 2017;35:3-45.
17. Salazar N, Valdés-Varela L, González S, Gueimonde M, de los Reyes-Gavilán CG. Nutrition and the gut microbiome in the elderly. *Gut Microbes*. 2017;8(2):82-97.
18. Derrien M, van Passel MWJ, van de Bovenkamp JHB, Schipper R, de Vos W, Dekker J. Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract. *Gut Microbes*. 2010;1(4):254-68.

-
19. Li H, Qi Y, Jasper H. Preventing age-related decline of gut compartmentalization limits microbiota dysbiosis and extends lifespan. *Cell Host Microbe*. 2016;19(2):240-53.
 20. Wilms E, Troost FJ, Elizalde M, Winkens B, de Vos P, Mujagic Z, et al. Intestinal barrier function is maintained with aging – a comprehensive study in healthy subjects and irritable bowel syndrome patients. *Sci Rep*. 2020;10(1):475.
 21. Biagi E, Nylund L, Candela M, Ostan R, Bucci L, Pini E, et al. Through ageing, and beyond: Gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. *PLoS One*. 2010;5(5):e10667.
 22. Kong F, Hua Y, Zeng B, Ning R, Li Y, Zhao J. Gut microbiota signatures of longevity. *Curr Biol*. 2016;26(18):R832-3.
 23. Vasto S, Rizzo C, Caruso C. Centenarians and diet: what they eat in the Western part of Sicily. *Immun Ageing*. 2012;9(1):10.
 24. Rogers GB, Keating DJ, Young RL, Wong ML, Licinio J, Wesselingh S. From gut dysbiosis to altered brain function and mental illness: Mechanisms and pathways. *Mol Psychiatry*. 2016;21(6):738-48.
 25. Dinan TG, Cryan JF. Melancholic microbes: a link between gut microbiota and depression? *Neurogastroenterol Motil*. 2013;25(9):713-9.
 26. Zhuang Z-Q, Shen L-L, Li W-W, Fu X, Zeng F, Gui L, et al. Gut microbiota is altered in patients with Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2018;63(4):1337-46.
 27. Liu P, Wu L, Peng G, Han Y, Tang R, Ge J, et al. Altered microbiomes distinguish Alzheimer's disease from amnesic mild cognitive impairment and health in a Chinese cohort. *Brain Behav Immun*. 2019;80(May):633-43.

28. Borsom EM, Lee K, Cope EK. Do the bugs in your gut eat your memories? relationship between gut microbiota and Alzheimer's disease. *Brain Sci.* 2020;10(11):814.
29. Zhuang Z, Yang R, Wang W, Qi L, Huang T. Associations between gut microbiota and Alzheimer's disease, major depressive disorder, and schizophrenia. *J Neuroinflammation.* 2020;17(1):1-9.
30. Rogers GB, Keating DJ, Young RL, Wong M-L, Licinio J, Wesselingh S. From gut dysbiosis to altered brain function and mental illness: mechanisms and pathways. *Mol Psychiatry.* 2016;21(6):738-48.
31. Maes M, Kubera M, Leunis JC. The gut-brain barrier in major depression: intestinal mucosal dysfunction with an increased translocation of LPS from gram negative enterobacteria (leaky gut) plays a role in the inflammatory pathophysiology of depression. *Neuro Endocrinol Lett.* 2008;29(1):117-24.
32. Sudo N, Chida Y, Aiba Y, Sonoda J, Oyama N, Yu X-N, et al. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J Physiol.* 2004;558(1):263-75.
33. Fond G, Boukouaci W, Chevalier G, Regnault A, Eberl G, Hamdani N, et al. The "psychomicrobiotic": Targeting microbiota in major psychiatric disorders: A systematic review. *Pathol Biol.* 2015;63(1):35-42.
34. Lyte M. Probiotics function mechanistically as delivery vehicles for neuroactive compounds: Microbial endocrinology in the design and use of probiotics. *BioEssays.* 2011;33(8):574-81.
35. Zheng P, Zeng B, Zhou C, Liu M, Fang Z, Xu X, et al. Gut microbiome remodeling induces depressive-like behaviors through a pathway mediated by the host's metabolism. *Mol Psychiatry.* 2016;21(6):786-96.

36. Caracciolo B, Xu W, Collins S, Fratiglioni L. Cognitive decline, dietary factors and gut–brain interactions. *Mech Ageing Dev.* 2014;136-137:59-69.
37. Minter MR, Hinterleitner R, Meisel M, Zhang C, Leone V, Zhang X, et al. Antibiotic-induced perturbations in microbial diversity during post-natal development alters amyloid pathology in an aged APPSWE/PS1ΔE9 murine model of Alzheimer's disease. *Sci Rep.* 2017;7(1):10411.
38. Neufeld KA, Foster JA. Effects of gut microbiota on the brain: Implications for psychiatry. *J Psychiatry Neurosci.* 2009;34(3):230-1.
39. Grenham S, Clarke G, Cryan JF, Dinan TG. Brain-gut-microbe communication in health and disease. *Front Physiol.* 2011;2 Dec:1-15.
40. Carabotti M, Scirocco A, Maselli MA, Severi C. The gut-brain axis: Interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Ann Gastroenterol.* 2015;28(2):203-9.
41. Foster JA, Rinaman L, Cryan JF. Stress & the gut-brain axis: Regulation by the microbiome. *Neurobiol Stress.* 2017;7:124-36.
42. Lach G, Schellekens H, Dinan TG, Cryan JF. Anxiety, depression, and the microbiome: a role for gut peptides. *Neurotherapeutics.* 2018;15(1):36-59.
43. Marcantonio ER. Delirium in hospitalized older adults. *N Engl J Med.* 2017;377(15):1456-66.
44. Inouye SK, Westendorp RG, Saczynski JS. Delirium in elderly people. *Lancet.* 2014;383(9920):911-22.

45. Oh ES, Fong TG, Hshieh TT, Inouye SK. Delirium in older persons: Advances in diagnosis and treatment. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2017;318(12):1161-74.
46. Inouye SK. Predisposing and precipitating factors for delirium in hospitalized older patients. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 1999;10(5):393-400.
47. Maldonado JR, Kapinos G. Pathoetiological model of delirium: a comprehensive understanding of the neurobiology of delirium and an evidence-based approach to prevention and treatment. *Crit Care Clin.* 2008;24(4):789-856.
48. Maldonado JR. Neuropathogenesis of delirium: Review of current etiologic theories and common pathways. *Am J Geriatr Psychiatry.* 2013;21(12):1190-222.
49. Maldonado JR. Delirium pathophysiology: An updated hypothesis of the etiology of acute brain failure. *Int J Geriatr Psychiatry.* 2018;33(11):1428-57.
50. Ticinesi A, Milani C, Lauretani F, Nouvenne A, Mancabelli L, Lugli GA, et al. Gut microbiota composition is associated with polypharmacy in elderly hospitalized patients. *Sci Rep.* 2017;7(1):11102.
51. Milani C, Ticinesi A, Gerritsen J, Nouvenne A, Andrea Lugli G, Mancabelli L, et al. Gut microbiota composition and *Clostridium difficile* infection in hospitalized elderly individuals: A metagenomic study. *Sci Rep.* 2016;6(March):1-12.

52. Halpin AL, de Man TJB, Kraft CS, Perry KA, Chan AW, Lieu S, et al. Intestinal microbiome disruption in patients in a long-term acute care hospital: A case for development of microbiome disruption indices to improve infection prevention. *Am J Infect Control*. 2016;44(7):830-6.
53. Ojima M, Motooka D, Shimizu K, Gotoh K, Shintani A, Yoshiya K, et al. Metagenomic analysis reveals dynamic changes of whole gut microbiota in the acute phase of intensive care unit patients. *Dig Dis Sci*. 2016;61(6):1628-34.
54. Inouye SK, Van Dyck CH, Alessi CA, Balkin S, Siegel AP, Horwitz RI. Clarifying confusion: The confusion assessment method: A new method for detection of delirium. *Ann Intern Med*. 1990;113(12):941-8.
55. Inouye SK, Kosar CM, Tommet D, Schmitt EM, Puelle MR, Saczynski JS, et al. The CAM-S: Development and validation of a new scoring system for delirium severity in 2 cohorts. *Ann Intern Med*. 2014;160(8):526-33.
56. Sessler CN, Gosnell MS, Grap MJ, Brophy GM, O'Neal P V., Keane KA, et al. The Richmond Agitation-Sedation Scale: validity and reliability in adult intensive care unit patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166(10):1338-44.
57. Fabbri RMA, Moreira MA, Garrido R, Almeida OP. Validity and reliability of the portuguese version of the confusion assessment method (CAM) for the detection of delirium in the elderly. *Arq Neuropsiquiatr*. 2001;59(2 A):175-9.
58. Grossmann FF, Hasemann W, Kressig RW, Bingisser R, Nickel CH. Performance of the modified Richmond Agitation Sedation Scale in identifying delirium in older ED patients. *Am J Emerg Med*. 2017;35(9):1324-6.

59. Chester JG, Beth Harrington M, Rudolph JL. Serial administration of a modified Richmond Agitation and Sedation Scale for delirium screening. *J Hosp Med*. 2012;7(5):450-3.
60. Garcez FB, Jacob-Filho W, Avelino-Silva TJ. Association between level of arousal and 30-day survival in acutely ill older adults. *J Am Med Dir Assoc*. 2020;21(4):493-9.
61. Calle ML. Statistical analysis of metagenomics data. *Genomics Inform*. 2019;17(1):e6.
62. Kumar R, Eipers P, Little RB, Crowley M, Crossman DK, Lefkowitz EJ, et al. Getting started with microbiome analysis: sample acquisition to bioinformatics. *Curr Protoc Hum Genet*. 2014;82(1):18.8.1-18.8.29.
63. Knight R, Vrbanac A, Taylor BC, Aksenov A, Callewaert C, Debelius J, et al. Best practices for analysing microbiomes. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(7):410-22.
64. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: Development and validation. *J Chronic Dis*. 1987;40(5):373-83.
65. Guigoz Y. The Mini Nutritional Assessment (MNA (R)) review of the literature - What does it tell us? *J Nutr Heal Aging*. 2006;10:466-87.
66. Apolinario D, Lichtenthaler DG, Magaldi RM, Soares AT, Busse AL, Das Gracas Amaral JR, et al. Using temporal orientation, category fluency, and word recall for detecting cognitive impairment: The 10-point cognitive screener (10-CS). *Int J Geriatr Psychiatry*. 2016;31(1):4-12.

-
67. Katz S, Ford AB, Moskowitz RW, Jackson BA, Jaffe MW. Studies of illness in the aged: The Index of ADL: A standardized measure of biological and psychosocial function. *JAMA*. 1963;185(12):914-9.
68. Morley JE, Malmstrom TK, Miller DK. A simple frailty questionnaire (FRAIL) predicts outcomes in middle aged African Americans. *J Nutr Health Aging*. 2012;16(7):601-8.
69. Aprahamian I, Lin SM, Suemoto CK, Apolinario D, Oiring de Castro Cezar N, Elmadjian SM, et al. Feasibility and factor structure of the FRAIL Scale in older adults. *J Am Med Dir Assoc*. 2017;18(4):367.e11-367.e18.
70. Biehl LM, Garzetti D, Farowski F, Ring D, Koeppel MB, Rohde H, et al. Usability of rectal swabs for microbiome sampling in a cohort study of hematological and oncological patients. Alekseyenko A V., editor. *PLoS One*. 2019;14(4):e0215428.
71. Avelino-Silva TJ, Farfel JM, Curiati JA, Amaral JR, Campora F, Jacob-Filho W. Comprehensive geriatric assessment predicts mortality and adverse outcomes in hospitalized older adults. *BMC Geriatr*. 2014;14(1):129.
72. Tieges Z, Brown LJE, MacLulich AMJ. Objective assessment of attention in delirium: a narrative review. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2014;29(12):1185-97.
73. Adamis D, Meagher D, Murray O, O'Neill D, O'Mahony E, Mulligan O, et al. Evaluating attention in delirium: A comparison of bedside tests of attention. *Geriatr Gerontol Int*. 2016;16(9):1028-35.
74. Inouye SK, Leo-Summers L, Zhang Y, Bogardus ST, Leslie DL, Agostini J V. A chart-based method for identification of delirium: Validation compared with interviewer ratings using the confusion assessment method. *J Am Geriatr Soc*. 2005;53(2):312-8.

-
75. Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, Mackie RI, Gaskins HR. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *J Nutr.* 2004;134(2):465-72.
76. Budding AE, Grasman ME, Eck A, Bogaards JA, Vandenbroucke-Grauls CMJE, van Bodegraven AA, et al. Rectal swabs for analysis of the intestinal microbiota. Mantis NJ, editor. *PLoS One.* 2014;9(7):e101344.
77. Carroll IM, Ringel-Kulka T, Siddle JP, Klaenhammer TR, Ringel Y. Characterization of the fecal microbiota using high-throughput sequencing reveals a stable microbial community during storage. Neufeld J, editor. *PLoS One.* 2012;7(10):e46953.
78. The Human Microbiome Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature.* 2012;486(7402):207-14.
79. Ó Cuív P, Aguirre de Cárcer D, Jones M, Klaassens ES, Worthley DL, Whitehall VLJ, et al. The effects from DNA extraction methods on the evaluation of microbial diversity associated with human colonic tissue. *Microb Ecol.* 2011;61(2):353-62.
80. Harrell L, Wang Y, Antonopoulos D, Young V, Lichtenstein L, Huang Y, et al. Standard colonic lavage alters the natural state of mucosal-associated microbiota in the human colon. Singh SR, editor. *PLoS One.* 2012;7(2):e32545.
81. Sloan LM, Uhl JR, Vetter EA, Schleck CD, Harmsen WS, Manahan J, et al. Comparison of the Roche LightCycler vanA/vanB Detection Assay and culture for detection of vancomycin-resistant enterococci from perianal swabs. *J Clin Microbiol.* 2004;42(6):2636-43.

-
82. Glisovic S, Eintracht S, Longtin Y, Oughton M, Brukner I. Rectal swab screening assays of public health importance in molecular diagnostics: Sample adequacy control. *J Infect Public Health*. 2018;11(2):234-7.
83. Zhang N, Li T-Z, Zheng K, Mou D-L, Liang L-C, Zhang T, et al. Use of rectal swab samples for analysis of the intestinal microbiome in children. *Chin Med J (Engl)*. 2018;131(4):492-4.
84. Yu S, Xiong Y, Xu J, Liang X, Fu Y, Liu D, et al. Identification of dysfunctional gut microbiota through rectal swab in patients with different severity of acute pancreatitis. *Dig Dis Sci*. 2020;65(11):3223-37.
85. Bassis CM, Moore NM, Lolans K, Seekatz AM, Weinstein RA, Young VB, et al. Comparison of stool versus rectal swab samples and storage conditions on bacterial community profiles. *BMC Microbiol*. 2017;17(1):78.
86. Van Horn KG, Audette CD, Sebeck D, Tucker KA. Comparison of the copan ESwab system with two amies agar swab transport systems for maintenance of microorganism viability. *J Clin Microbiol*. 2008;46(5):1655-8.
87. COPAN Diagnostics. ESwab(TM) - Package insert and How to use guide [Internet]. [cited 2020 Oct 4]. p. 2–5. Available from: https://www.copanusa.com/wp-content/uploads/2019/07/ESwab-Package-Insert_HPC030_eSwab_copoliestere_Rev00_Date2016.02.pdf
88. Goodman AL, Kallstrom G, Faith JJ, Reyes A, Moore A, Dantas G, et al. Extensive personal human gut microbiota culture collections characterized and manipulated in gnotobiotic mice. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108(15):6252-7.

-
89. Ellermann M, Carr JS, Fodor AA, Arthur JC, Carroll IM. Characterizing and functionally defining the gut microbiota: methodology and implications. In: Floch MH, Ringel Y, Walker WA. The microbiota in gastrointestinal pathophysiology. Amsterdam: Elsevier; 2017. p. 15-25.
90. Dominguez-Bello MG, Blaser MJ, Ley RE, Knight R. Development of the human gastrointestinal microbiota and insights from high-throughput sequencing. *Gastroenterology*. 2011;140(6):1713-9.
91. Pollock J, Glendinning L, Wisedchanwet T, Watson M. The madness of microbiome: attempting to find consensus “best practice” for 16S microbiome studies. Liu S-J, editor. *Appl Environ Microbiol*. 2018;84(7).
92. Li W, Godzik A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*. 2006;22(13):1658-9.
93. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*. 2016;13(7):581-3.
94. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108(Supplement_1):4516-22.
95. Appelbaum PS. Assessment of patients’ competence to consent to treatment. *N Engl J Med*. 2007;357(18):1834-40.
96. Harris PA, Taylor R, Minor BL, Elliott V, Fernandez M, O’Neal L, et al. The REDCap consortium: Building an international community of software platform partners. *J Biomed Inform*. 2019;95:103208.

-
97. Avelino-Silva TJ, Campora F, Curiati JAE, Jacob-Filho W. Prognostic effects of delirium motor subtypes in hospitalized older adults: A prospective cohort study. *PLoS One*. 2018;13(1):1-18.
98. Zhang J, Bi J, Guo G, Yang L, Zhu B, Zhan G, et al. Abnormal composition of gut microbiota contributes to delirium-like behaviors after abdominal surgery in mice. *CNS Neurosci Ther*. 2019;25(6):685-96.
99. Korthauer K, Kimes PK, Duvallet C, Reyes A, Subramanian A, Teng M, et al. A practical guide to methods controlling false discoveries in computational biology. *Genome Biol*. 2019;20(1):118.
100. Xia Y. Correlation and association analyses in microbiome study integrating multiomics in health and disease. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Amsterdam: Elsevier; 2020. p. 309–491.
101. Hotelling H. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *J Educ Psychol*. 1933;24(6):417-41.
102. Jolliffe IT, Trendafilov NT, Uddin M. A modified principal component technique based on the LASSO. *J Comput Graph Stat*. 2003;12(3):531-47.
103. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol*. 2019;37(8):852-7.
104. Faith DP. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biol Conserv*. 1992;61(1):1-10.
105. 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.

-
106. Lozupone C, Knight R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(12):8228-35.
107. Bokulich NA, Kaehler BD, Rideout JR, Dillon M, Bolyen E, Knight R, et al. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome.* 2018;6(1):90.
108. McDonald D, Price MN, Goodrich J, Nawrocki EP, DeSantis TZ, Probst A, et al. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J.* 2012;6(3):610-8.
109. Inouye SK, Charpentier PA. Precipitating factors for delirium in hospitalized elderly persons: Predictive model and interrelationship with baseline vulnerability. *J Am Med Assoc.* 1996;275(11):852-7.
110. Bajaj JS, Ridlon JM, Hylemon PB, Thacker LR, Heuman DM, Smith S, et al. Linkage of gut microbiome with cognition in hepatic encephalopathy. *Am J Physiol Liver Physiol.* 2012;302(1):G168-75.
111. Aron-Wisnewsky J, Clement K. The effects of gastrointestinal surgery on gut microbiota: potential contribution to improved insulin sensitivity. *Curr Atheroscler Rep.* 2014;16(11):454.
112. McNeil JB, Hughes CG, Girard T, Ware LB, Ely EW, Chandrasekhar R, et al. Plasma biomarkers of inflammation, coagulation, and brain injury as predictors of delirium duration in older hospitalized patients. *PLoS One.* 2019;14(12):6-15.
113. Valentini L, Ramminger S, Haas V, Postrach E, Werich M, Fischer A, et al. Small intestinal permeability in older adults. *Physiol Rep.* 2014;2(4):e00281.

114. Khan BA, Perkins AJ, Prasad NK, Shekhar A, Campbell NL, Gao S, et al. Biomarkers of delirium duration and delirium severity in the ICU. *Crit Care Med*. 2020;353-61.
115. Thevaranjan N, Puchta A, Schulz C, Naidoo A, Szamosi JC, Verschoor CP, et al. Age-associated microbial dysbiosis promotes intestinal permeability, systemic inflammation, and macrophage dysfunction. *Cell Host Microbe*. 2017;21(4):455-466.e4.
116. Walker WA. Dysbiosis. In: Floch MH, Ringel Y, Allan Walker W. *The microbiota in gastrointestinal pathophysiology*. Boston: Academic Press; 2017. p. 227–32. Chapter 25 -
117. Wilson JE, Mart MF, Cunningham C, Shehabi Y, Girard TD, MacLulich AMJ, et al. Delirium. *Nat Rev Dis Prim*. 2020;6(1):90.
118. Cunningham C, Campion S, Lunnon K, Murray CL, Woods JFC, Deacon RMJ, et al. Systemic inflammation induces acute behavioral and cognitive changes and accelerates neurodegenerative disease. *Biol Psychiatry*. 2009;65(4):304-12.
119. Haussinger D, Schliess F. Pathogenetic mechanisms of hepatic encephalopathy. *Gut*. 2008;57(8):1156-65.
120. Menezes-Garcia Z, Do Nascimento Arifa RD, Acúrcio L, Brito CB, Gouvea JO, Lima RL, et al. Colonization by Enterobacteriaceae is crucial for acute inflammatory responses in murine small intestine via regulation of corticosterone production. *Gut Microbes*. 2020;11(6):1531-46.
121. McDonald D, Ackermann G, Khailova L, Baird C, Heyland D, Kozar R, et al. Extreme dysbiosis of the microbiome in critical illness. Green Tringe S, editor. *mSphere*. 2016;1(4):e00199-16.

-
122. Strandwitz P, Kim KH, Terekhova D, Liu JK, Sharma A, Levering J, et al. GABA-modulating bacteria of the human gut microbiota. *Nat Microbiol.* 2019;4(3):396-403.
123. Bravo JA, Forsythe P, Chew M V., Escaravage E, Savignac HM, Dinan TG, et al. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc Natl Acad Sci.* 2011;108(38):16050-5.
124. Conway de Macario E, Macario A. Methanogenic archaea in health and disease: A novel paradigm of microbial pathogenesis. *Int J Med Microbiol.* 2009;299(2):99-108.
125. 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.
126. Smonig R, Wallenhorst T, Bouju P, Letheulle J, Le Tulzo Y, Tadié JM, et al. Constipation is independently associated with delirium in critically ill ventilated patients. *Intensive Care Med.* 2016;42(1):126-7.
127. Dharmarajan K, Swami S, Gou RY, Jones RN, Inouye SK. Pathway from delirium to death: potential in-hospital mediators of excess mortality. *J Am Geriatr Soc.* 2017;65(5):1026-33.
128. Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, Power SE, O'connor EM, Cusack S, et al. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature.* 2012;488(7410):178-84.
129. Jackson MA, Jeffery IB, Beaumont M, Bell JT, Clark AG, Ley RE, et al. Signatures of early frailty in the gut microbiota. *Genome Med.* 2016;8(1):8.

130. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*. 2013;500(7464):541-6.
131. Cotillard A, Kennedy SP, Kong LC, Prifti E, Pons N, Le Chatelier E, et al. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature*. 2013;500(7464):585-8.
132. Tillisch K, Labus J, Kilpatrick L, Jiang Z, Stains J, Ebrat B, et al. Consumption of fermented milk product with probiotic modulates brain activity. *Gastroenterology*. 2013;144(7):1394-1401.e4.
133. Francis J, Kapoor WN. Prognosis after hospital discharge of older medical patients with delirium. *J Am Geriatr Soc*. 1992;40(6):601-6.
134. Bo M, Bonetto M, Bottignole G, Porrino P, Coppo E, Tibaldi M, et al. Postdischarge clinical outcomes in older medical patients with an emergency department stay-associated delirium onset. *J Am Geriatr Soc*. 2016;64(9):e18–9.

9 Anexos

9 ANEXOS

Anexo A – Formulário de Inclusão

PROJETO DELIRIUM PS
Page 1

PROTOCOLO DE INCLUSÃO

NÚMERO DO PROTOCOLO:

NUMERO DO PROTOCOLO ATRIBUIDO:

(Conforme registro da amostra no LIM)

Avaliador(a):

- ☐ Caroline
☐ Giulia
☐ Fabi
☐ Julio
☐ Flávia

CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

Proceder à aplicação do protocolo apenas após preenchimento dos critérios de inclusão e exclusão abaixo.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

(TODOS os campos deve ser marcados.)

- ☐ Idade igual ou superior a 65 anos.
☐ Admissão hospitalar < 24 horas

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO - FLÁVIA

(QUALQUER campo marcado indica exclusão do protocolo da microbiota.)

- ☐ Uso de antibióticos há mais que 24 horas;
☐ Uso recente (menos de 1 mês) ou atual de pre ou probióticos;
☐ Doenças agudas do TGI (hemorragia digestiva alta ou baixa; abdome agudo inflamatório ou obstrutivo; diarreia aguda de qualquer etiologia; suboclusão intestinal por fecaloma; doenças agudas do pâncreas e das vias biliares).
☐ Presença de alimentação artificial na admissão;
☐ Lesão estrutural aguda de SNC (acidente vascular encefálico agudo, hematomas intracranianos, traumatismo cranioencefálico grave)
☐ Recusou realização de swab retal

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO - JÚLIO:

(QUALQUER campo marcado indica exclusão de AMBOS os estudos.)

- ☐ Internação para cuidados paliativos exclusivos ou cuidados de fim de vida;
☐ Tempo esperado de internação hospitalar inferior a 48 horas;
☐ Internação hospitalar há menos de 30 dias;
☐ Recusa do paciente ou de seu representante em assinar termo de consentimento livre e esclarecido.

Razão para recusa ou não assinatura de TCLE:

- ☐ Participação em pesquisa ☐ Swab retal ☐ Coleta de sangue adicional ☐ Necessidade de ser avaliado diariamente ☐ Condição clínica instável ou grave ☐ Ausência de familiar para consentimento em tempo hábil ☐ Outros

AUTORIZAÇÃO DE USO DE DADOS CLÍNICOS

[Attachment: "tclemodelo1_v1_2.pdf"]

O(a) paciente, ou seu responsável, assinou termo de consentimento livre e esclarecido?

☐ Não ☐ Sim

DADOS DA ADMISSÃO

Data da hospitalização:

(Hospitalização em outro serviço ou admissão no PS.)

Data da avaliação:

MOTIVO DE INTERNAÇÃO:

Especialidade responsável:

☐ Clínica Médica ☐ Neurologia
☐ Cirurgia Geral ☐ Cirurgia Vascular
☐ Urologia ☐ Neurocirurgia

Origem:

☐ PS Lapa
☐ Ambulatorios
☐ HU
☐ Outro PS
☐ Outra origem
☐ Casa

IDENTIFICAÇÃO

Nome:

RGHC:

Número de atendimento:

Data de nascimento:

Idade:

(anos)

Sexo:

☐ Masculino ☐ Feminino

Cor:

☐ Branca ☐ Negra ☐ Parda ☐ Amarela ☐ Outra

Escolaridade:

(anos completos)

Profissão / ocupação principal:
(antes da aposentadoria)

Estado civil:

☐ Solteiro(a) ☐ Casado(a) / união estavel ☐ Viúvo(a) ☐ Divorciado(a) / separado(a)

O(a) paciente é o(a) informante principal?

☐ Não ☐ Sim

Telefone:

DADOS DO INFORMANTE:

Nome:

Grau de parentesco:

☐ Nenhum ☐ Esposo(a) ☐ Filho(a) ☐ Neto(a) ☐ Nora ☐ Genro ☐ Sobrinho(a)
☐ Outro

É cuidador(a)?

☐ Não ☐ Sim

Frequência de convívio:

☐ Diária ☐ 2 a 6 vezes por semana ☐ Semanal ☐ 2 a 3 vezes por mes ☐ Mensal
☐ Menor que mensal

Telefone:

ANTECEDENTES PESSOAIS:

- ☐ Nenhuma doença de base
☐ Acidente Vascular Encefálico prévio
☐ Artrite reumatoide
☐ Asma
☐ Ataque Isquêmico Transitório prévio
☐ Comprometimento Cognitivo Leve
☐ Demência
☐ Depressão
☐ Diabetes mellitus
☐ Disfunção renal
☐ Dislipidemia
☐ Doença de Parkinson
☐ Doença do Refluxo Gastro-Esofágico
☐ Doença do tecido conjuntivo
☐ Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
☐ Esofagite
☐ Fibrilação Atrial Crônica
☐ Fratura(s) prévia(s)
☐ Gastrite
☐ Hepatopatia crônica
☐ Hiperplasia Prostática Benigna
☐ Hipertensão Arterial Sistêmica
☐ Hipertireoidismo
☐ Hipotensão postural
☐ Hipotireoidismo
☐ Infarto do Miocárdio prévio
☐ Insuficiência Arterial Periférica
☐ Insuficiência Cardíaca Congestiva
☐ Insuficiência Coronariana
☐ Insuficiência Venosa Periférica
☐ Leucemia
☐ Linfoma
☐ Neoplasia
☐ Obesidade
☐ Osteoartrose
☐ Osteopenia
☐ Osteoporose
☐ SIDA
☐ Transtorno Afetivo Bipolar
☐ Transtorno de Ansiedade
☐ Úlcera péptica
☐ Cirurgia(s)
☐ Outro(s)

Acidente Vascular Encefálico - Com sequela? ☐ Não ☐ Sim

Acidente Vascular Encefálico - Qual(is) sequela(s)? _____

Demência - Qual o tipo?

☐ Alzheimer ☐ Vascular ☐ Mista ☐ Outra ☐ Em investigação

Demência - Qual outra? _____

Diabetes - Com lesão de órgão-alvo? ☐ Sim ☐ Não

Disfunção renal - Em diálise?☐ Não ☐ Sim

Doença do tecido conjuntivo - Qual(is)?

Fraturas prévias - Qual(is)?

Hepatopatia - Com presença de cirrose?☐ Não ☐ Sim

Hepatopatia - Qual a causa?

☐ Hepatite B ☐ Hepatite C ☐ Álcool ☐ Desconhecida ☐ Outra

Hepatopatia - Qual outra?

Neoplasia - Qual o sítio primário?

Neoplasia - A doença foi curada?☐ Não ☐ Sim

Neoplasia - Existe(m) metástase(s)?

☐ Não ☐ Sim

Osteoartrose - Quais articulações são acometidas?

☐ Joelho(s) ☐ Coluna ☐ Quadril ☐ Mão(s) ☐ Outra(s)

Cirurgia(s) - Qual(is)?

Outro(s) diagnóstico(s) - Qual(is)?

MEDICAMENTOS EM USO:

(Preencher um medicamento por linha)

Presença de polifarmácia (5 ou mais medicamentos)?☐ Sim ☐ Nao

Marcar todas as classes de medicação que o paciente está usando:

- ☐ Inibidores de bomba de prótons (EX: omeprazol)
- ☐ Bloqueador H2 (EX: ranitidina)
- ☐ Antidepressivo (EX: sertralina / escitalopram / amitriptilina)
- ☐ Antipsicóticos (EX: quetiapina / haloperidol)
- ☐ Estatinas (EX: sinvastatina / atorvastatina)
- ☐ Benzodiazepínicos (EX: clonazepam)
- ☐ Anticolinérgico (EX: Alzheimer / outras demências)
- ☐ Anticonvulsivantes (EX: ácido valproico / fenitoína / gabapentina)
- ☐ Antihistamínico (EX: loratadina / hidroxizina)
- ☐ Antibióticos (< 24h)

Se uso de antimicrobiano (< 24h), escrever nome(s):

OUTROS FATORES DE RISCO PARA DELIRIUM:

Déficit sensorial:

- ☐ Déficit visual ☐ Déficit auditivo
- ☐ Nenhum
- (Marcar todos os campos que se aplicam)

Faz uso de dispositivos:

- ☐ Óculos ☐ Aparelho auditivo
- ☐ Nenhum

Está usando dispositivo na internação?

- ☐ Sim ☐ Não

Uso de contenção mecânica?

- ☐ Sim ☐ Não

Uso de sonda vesical de demora:

- ☐ Sim ☐ Não

HÁBITOS E VÍCIOS:

Tabagismo:

- ☐ Nunca ☐ Atual ☐ Progresso

Etilismo:

- ☐ Nunca ☐ Atual ☐ Progresso

AVALIAÇÃO GERIÁTRICA

SUORTE SOCIAL:

Com quem mora?

- ☐ Sozinho(a) ☐ Com familiar ou cuidador
- ☐ É institucionalizado(a)

Classificação socioeconômica (IBGE):

- ☐ Classe A (Renda Familiar >20 salários mínimos)
- ☐ Classe B (Renda Familiar de 10 a 20 salários mínimos)
- ☐ Classe C (Renda Familiar de 4 a 10 salários mínimos)
- ☐ Classe D (Renda Familiar de 2 a 4 salários mínimos)
- ☐ Classe E (Renda Familiar < 2 salários mínimos)

ESCALA DE FUNCIONALIDADE DE KATZ - ATIVIDADES BÁSICAS DE VIDA DIÁRIA (ABVDs):
(Sem assistência=2 pontos / Com assistência parcial=1 ponto / Com assistência total, ou não faz(ia)=0 ponto; para continência considerar: Controla a urina completamente=2 pontos / Tem perdas ocasionais de urina=1 ponto / E incontinente, utiliza cateter, ou necessita de supervisão para controlar urina=0 ponto; comparação entre momento pré-hospitalização e momento da admissão hospitalar)

	Sem assistência	Com assistência parcial	Com assistência total / não faz(ia)
Há 3 meses, tomava banho (de esponja, chuveiro, ou banheira):	☐	☐	☐
Hoje, toma banho (de esponja, chuveiro, ou banheira):	☐	☐	☐
Há 3 meses, vestia-se (pegava as roupas no armário ou cômoda, incluindo roupas de baixo, abotoadores e acessórios):	☐	☐	☐
Hoje, veste-se (pega as roupas no armário ou cômoda, incluindo roupas de baixo, abotoadores e acessórios):	☐	☐	☐
Há 3 meses, fazia o toalete (ia ao banheiro, limpava-se, arrumava as roupas após as eliminações):	☐	☐	☐
Hoje, faz o toalete (vai ao banheiro, limpa-se, arruma as roupas após as eliminações):	☐	☐	☐
Há 3 meses, fazia sua transferência da cama ou cadeira:	☐	☐	☐
Hoje, faz sua transferência da cama ou cadeira:	☐	☐	☐
Há 3 meses, tinha continência:	☐	☐	☐
Hoje, tem continência:	☐	☐	☐
Há 3 meses, comia:	☐	☐	☐
Hoje, come:	☐	☐	☐

Total de ABVDs há 3 meses:

Total de ABVDs atual:

(totalmente dependente=0-5 pontos / parcialmente dependente=6-11 pontos / independente=12 pontos)

ESCALA FRAIL ADAPTADA

(entende-se por "sem dificuldade": sem apoio de outra pessoa, sem dispositivo (bengala), sem parar para descansar/ caso o paciente não seja capaz de responder de forma confiável, dirija as questões ao cuidador)

	Não	Sim
No último mês, conseguiu andar um quarteirão sem dificuldade? (não=1 ponto/ sim=0 ponto)	☐	☐
No último mês, conseguiu subir um lance de escada sem dificuldade? (não=1 ponto/ sim=0 ponto)	☐	☐
No último mês, sentiu-se cansado na maior parte do tempo? (não=0 ponto/ sim=1 ponto)	☐	☐
No último ano, perdeu 3kg de peso ou mais? (não=0 ponto/ sim=1 ponto)	☐	☐
Possui 5 ou mais doenças crônicas entre: artrite reumatoide, DM, disfunção renal moderada a grave, doença cerebrovascular, HAS, angina, IAM, ICC, DPOC, asma, neoplasia? (não=0 ponto/ sim=1 ponto)	☐	☐

Total na Escala FRAIL:

- ☐ 0 ponto: normal
☐ 1-2 pontos: pré-frágil
☐ 3-5 pontos: frágil

AVALIAÇÃO NEUROPSIQUIÁTRICA:

Paciente tem quadro estabelecido ou sugestivo de demência?	☐ Não ☐ Sim
Paciente tem dificuldade referida de memória?	☐ Não ☐ Sim ☐ Não consegue responder
Há quanto tempo?	<input type="text"/> (anos)
Essa dificuldade interfere nas tarefas do dia-a-dia?	☐ Não ☐ Sim
A dificuldade é confirmada por acompanhante?	☐ Não ☐ Sim ☐ Sem acompanhante / Não sabe referir

Pedir a(o) acompanhante para se lembrar de como era seu familiar/amigo(a) 10 anos atrás, e comparar com ele(a) 3 meses atrás. Comparado(a) com 10 anos atrás, assinale como era essa pessoa para:

(Melhorou muito=1 ponto / Melhorou pouco=2 pontos / Não mudou=3 pontos / Piorou pouco=4 pontos / Piorou muito=5 pontos)

	Melhorou muito	Melhorou pouco	Não mudou	Piorou pouco	Piorou muito
Lembrar do dia e do mês em que está	☐	☐	☐	☐	☐
Usar sua inteligência para entender o que acontece e os motivos das coisas	☐	☐	☐	☐	☐

Resultado:

(valores iguais ou superiores a 4 tem 88% de probabilidade de demência)

Qual a sua idade? ☐ Certo ☐ Errado

Qual a sua data de nascimento? ☐ Certo ☐ Errado

Em que local estamos? (nome do hospital ou edifício) ☐ Certo ☐ Errado ☐ Incerto/Impossível avaliar

10-POINT COGNITIVE SCREENER (10-CS):
(completar sempre, mesmo que o valor final seja 0)

Em que ano estamos? ☐ 0 (resposta incorreta)
☐ 1 (resposta correta)

Em que mês estamos? ☐ 0 (resposta incorreta)
☐ 1 (resposta correta)

Que dia do mês é hoje? ☐ 0 (resposta incorreta)
☐ 1 (resposta correta)

Agora eu vou dizer três palavras. Espere eu terminar e repita as três palavras. Tente memorizá-las, porque eu vou perguntar de novo em alguns minutos (se necessário, permita até 3 tentativas para aprendizado, esta etapa não é pontuada).
Lista A: ÓCULOS - CANETA - MARTELO | Lista C: RELÓGIO - CHAVE - VASSOURA | Ou: VASO-CARRO-TIJOLO

Agora eu vou marcar um minuto no relógio e quero que você me diga o maior número de animais que conseguir, o mais rápido possível. Vale qualquer tipo de animal ou bicho. Podemos começar?

- ☐ 0 a 5
☐ 6 a 8
☐ 9 a 11
☐ 12 a 14
☐ 15 ou mais

Agora me diga as três palavras que eu pedi para você memorizar. ☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3

Total 10-CS:

Ajuste para escolaridade (anos completos):

- ☐ 0 ponto (≥ 4 anos)
☐ +1 ponto (1-3 anos)
☐ +2 pontos (sem educação formal)

Total 10-CS-Edu:

(considerar pontuação máxima como 10; ≥ 8 pontos=normal/ 6-7 pontos=comprometimento cognitivo possível/ ≤ 5 =comprometimento cognitivo provável)

Se não foi possível realizar avaliação cognitiva, determinar motivo:

- ☐ Rebaixamento do nível de consciência
☐ Afasia ☐ Intubação orotraqueal
☐ Recusa do paciente

CONFUSION ASSESSMENT METHOD (CAM):

1a. Início Agudo - Há evidência de uma mudança aguda do estado mental de base do paciente? (levar em consideração história de confusão recente, desorientação tempo-espacial, alucinações etc.)

- ☐ Não ☐ Sim

1b. Flutuação - Se presente ou anormal, este comportamento variou durante o dia ou durante a entrevista, isto é, tendeu a surgir e desaparecer ou aumentar e diminuir de gravidade? (levar em consideração variações no nível de consciência, atenção, pensamento etc.)

- ☐ Não ☐ Sim

****ATENÇÃO:**

O início agudo e a flutuação podem ser pontuados em relação a qualquer aspecto do estado mental: ATENÇÃO, ORGANIZAÇÃO DO PENSAMENTO, NÍVEL DE CONSCIÊNCIA, MEMÓRIA, ORIENTAÇÃO TEMPOROESPACIAL, ALUCINAÇÕES OU DELÍRIOS, ATIVIDADE PSICOMOTORA (AGITAÇÃO OU LENTIFICAÇÃO), E ALTERAÇÃO DO CICLO SONO-VIGILIA.

2. Distúrbio de Atenção - LETTERS ATTENTION TEST:

Agora vou dizer uma sequência de 10 letras. Sempre que ouvir a letra "A", aperte minha mão"

S-A-V-E-A-H-A-A-R-T

((considera-se positivo o teste com >2 erros))

- ☐ Nenhum erro ☐ 1 erro ☐ 2 erros ☐ 3 erros ☐ 4 ou mais erros ☐ Não respondeu/ impossível avaliar

2. Distúrbio de Atenção - DIAS DA SEMANA INVERTIDOS

Por favor me diga os dias da semana de trás para frente, começando com domingo.

(É permitido auxiliar com: "qual é o dia que vem antes do domingo? Ou se o participante parar em determinado dia X, dizer: "qual é o dia que vem antes do dia X". Este auxílio pode ser usado 2 vezes no total. Se o participante começar a enumerar os dias na ordem habitual, repita as instruções gerais)

Correto

Incorreto

Recusou

Não sabe ou não respondeu

Domingo	☐	☐	☐	☐
Sábado	☐	☐	☐	☐
Sexta	☐	☐	☐	☐
Quinta	☐	☐	☐	☐
Quarta	☐	☐	☐	☐
Terça	☐	☐	☐	☐
Segunda	☐	☐	☐	☐

2. Desatenção presente?

- ☐ Sim (leve) - ex: não atrapalha entrevista
☐ Sim (acentuada) - ex: atrapalha a entrevista
☐ Não

2. Distúrbio de Atenção - Descrever observações a cerca da avaliação atencional, se necessário.

3. Pensamento Desorganizado - O pensamento do paciente era desorganizado ou incoerente, com a conversa dispersiva ou irrelevante, fluxo de ideias pouco claro ou ilógico, ou mudança imprevisível do assunto? Levar em consideração:

-desorientação temporoespacial;
-conhecimento da causa de hospitalização;
ou

-perguntas como "O peixe voa?" ou "Se eu jogar uma pedra na água, o que acontece com ela?".

- ☐ Não ☐ Sim ☐ Incerto/Impossível avaliar

3. Pensamento desorganizado - gravidade

- ☐ Leve (ex: não atrapalha a entrevista)
☐ Acentuado (ex: atrapalha a entrevista)

3. Pensamento desorganizado - Descrever observações a cerca da avaliação de pensamento desorganizado, se necessário.

4. Nível de consciência - Como você classificaria o nível de consciência do paciente?

- ☐ Alerta (normal)
☐ Vigilante (hiperalerta, hipersensível a estímulos ambientais, assustando-se facilmente)
☐ Letárgico (sonolento, facilmente acordável)
☐ Estupor (dificuldade para despertar)
☐ Coma

4. Nível de consciência - Descrever observações a cerca da avaliação de nível de consciência, se necessário.

Comentários adicionais sobre a avaliação de delirium:

CAM - Conclusão:

- ☐ Negativo ☐ Positivo
 (diagnóstico de delirium requer a presença dos critérios 1 ('a' ou 'b') e 2, somados ao critério 3 ou 4.)

RICHMOND AGITATION-SEDATION SCALE (RASS)

- ☐ +4: Combativo(a) - Claramente combativo(a), violento(a), representando risco para a equipe
☐ +3: Muito agitado(a) - Puxa ou remove tubos ou cateteres, agressivo(a) verbalmente
☐ +2: Agitado(a) - Movimentos despropositados frequentes
☐ +1: Inquieto(a) - Apresenta movimentos, mas que não são agressivos ou vigorosos
☐ 0: Alerta e calmo(a)
☐ -1: Sonolento(a) - Adormecido(a), mas acorda ao chamado (estímulo verbal) e mantém os olhos abertos por mais de 10 segundos
☐ -2: Sedação leve - Despertar precoce ao estímulo verbal, mantém contato visual por menos de 10 segundos
☐ -3: Sedação moderada - Movimentação ou abertura ocular ao estímulo verbal (mas sem contato visual)
☐ -4: Sedação intensa - Sem resposta ao chamado pelo nome, mas apresenta movimentação ou abertura ocular ao toque (estímulo físico)
☐ -5: Não desperta - Sem resposta ao estímulo verbal ou físico

ESCALA DE COMA DE GLASGOW

Abertura Ocular:

- ☐ 4 pontos = Espontânea
☐ 3 pontos = Ao chamado
☐ 2 pontos = Ao estímulo doloroso
☐ 1 ponto = Não abre

Melhor Resposta Verbal:

- ☐ 5 pontos = Orientado(a), conversa normalmente
☐ 4 pontos = Desorientado(a), confuso(a)
☐ 3 pontos = Pronúncia palavras desconexas
☐ 2 pontos = Emite sons incompreensíveis
☐ 1 ponto = Não emite sons

Melhor Resposta Motora:

- ☐ 6 pontos = Obedece a comandos
☐ 5 pontos = Localiza estímulos dolorosos
☐ 4 pontos = Flexão inespecífica (normal) a estímulos dolorosos
☐ 3 pontos = Flexão anormal (decorticação) a estímulos dolorosos
☐ 2 pontos = Extensão (descerebração a estímulos dolorosos)
☐ 1 ponto = Não se movimenta

Glasgow Coma Scale (GCS):

 (pontos)

APACHE II

Temperatura axilar (°C):

Frequência respiratória:

Frequência cardíaca:

SOFA

- ☐ Sim ☐ Não

Uso de droga vasoativa?

Qual droga vasoativa?

- ☐ Noradrenalina ☐ Epinefrina
☐ Dopamina ☐ Dobutamina
☐ Nitroprussiato (Niprid)
☐ Nitroglicerina (Tridil)

Dose da droga vasoativa:

Suporte ventilatório

- ☐ Ventilação mecânica invasiva
☐ Ventilação mecânica não invasiva
☐ Suporte de O₂
☐ Ar ambiente
(Marcar todos que se aplicam)

SpO₂:

FiO₂:

Anexo B – Formulário de Seguimento**AVALIAÇÃO DIÁRIA**

Page 1

NÚMERO DO PROTOCOLO:

Data da avaliação:

Avaliador(a):

- ☐ Caroline
☐ Giulia
☐ Fabi
☐ Julio
☐ Flávia

Marcar o(s) critério(s) positivo(s):

- ☐ Uso de antibióticos há mais que 24 horas;
☐ Uso de prebióticos (ex: lactulose) ou probióticos (ex: simbioflora, modulo simbiótico)?
☐ Doenças agudas do TGI (hemorragia digestiva alta ou baixa; abdome agudo inflamatório ou obstrutivo; diarreia aguda de qualquer etiologia; suboclusão intestinal por fecaloma; doenças agudas do pâncreas e das vias biliares).
☐ Presença de alimentação artificial;
☐ Lesão estrutural aguda de SNC (acidente vascular encefálico agudo, hematomas intracranianos, traumatismo cranioencefálico grave)
☐ Alta hospitalar antes 48 horas;
☐ Recusa do paciente ou de seu representante em continuar no estudo.

Data de início do antibiótico:

Nome do antibiótico:

Qual prebiótico ou probiótico?

Razão para a recusa:

- ☐ Necessidade de coletar swab retal e/ou sangue; ☐ Complicação ou piora clínica;
☐ Dúvidas sobre objetivo da pesquisa;
☐ Não deseja ser entrevistado diariamente;
☐ Outra razão

Outra razão:

Há permissão para manter o protocolo clínico (sem coleta de microbiota ou sangue)?

- ☐ Sim ☐ Não

Foi realizada avaliação nesse turno?

- ☐ Sim ☐ Não

Se não, justificar:

- ☐ Recusa do paciente ou acompanhante
☐ Centro cirúrgico ☐ Realização de exame
☐ Outros

Outra justificativa:

Qual a sua idade?	☐ Certo ☐ Errado
Qual a sua data de nascimento?	☐ Certo ☐ Errado
Em que local estamos? (nome do hospital ou edifício)	☐ Certo ☐ Errado
10-POINT COGNITIVE SCREENER (10-CS):	
Em que ano estamos?	☐ 0 (resposta incorreta) ☐ 1 (resposta correta)
Em que mês estamos?	☐ 0 (resposta incorreta) ☐ 1 (resposta correta)
Que dia do mês é hoje?	☐ 0 (resposta incorreta) ☐ 1 (resposta correta)
<p>Agora eu vou dizer três palavras. Espere eu terminar e repita as três palavras. Tente memorizá-las, porque eu vou perguntar de novo em alguns minutos (se necessário, permita até 3 tentativas para aprendizado, esta etapa não é pontuada).</p> <p>Lista A: ÓCULOS - CANETA - MARTELO Lista C: RELÓGIO - CHAVE - VASSOURA Ou: VASO-CARRO-TIJOLO</p>	
<p>Agora eu vou marcar um minuto no relógio e quero que você me diga o maior número de animais que conseguir, o mais rápido possível. Vale qualquer tipo de animal ou bicho. Podemos começar?</p> <p>☐ 0 a 5 ☐ 6 a 8 ☐ 9 a 11 ☐ 12 a 14 ☐ 15 ou mais</p>	
Agora me diga as três palavras que eu pedi para você memorizar.	☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3
Total 10-CS: _____	
Ajuste para escolaridade (anos completos):	☐ 0 ponto (≥ 4 anos) ☐ +1 ponto (1-3 anos) ☐ +2 pontos (sem educação formal)
Total 10-CS-Edu: _____	
(considerar pontuação máxima como 10; 8-10 pontos=normal/ 6-7 pontos=comprometimento cognitivo possível/ ≤ 5 =comprometimento cognitivo provável)	
Se não foi possível realizar avaliação cognitiva, determinar motivo:	☐ Rebaixamento do nível de consciência ☐ Afasia ☐ Intubação orotraqueal ☐ Recusa do paciente

CONFUSION ASSESSMENT METHOD (CAM):

1a. Início Agudo - Há evidência de uma mudança aguda do estado mental de base do paciente?
(levar em consideração história de confusão recente, desorientação têmporo-espacial, alucinações etc.)

☐ Não ☐ Sim

1b. Flutuação - Se presente ou anormal, este comportamento variou durante o dia ou durante a entrevista, isto é, tendeu a surgir e desaparecer ou aumentar e diminuir de gravidade?
(levar em consideração variações no nível de consciência, atenção, pensamento etc.)

☐ Não ☐ Sim

****ATENÇÃO:**

O início agudo e a flutuação podem ser pontuados em relação a qualquer aspecto do estado mental: ATENÇÃO, ORGANIZAÇÃO DO PENSAMENTO, NÍVEL DE CONSCIÊNCIA, MEMÓRIA, ORIENTAÇÃO TEMPOROESPACIAL, ALUCINAÇÕES OU DELÍRIOS, ATIVIDADE PSICOMOTORA (AGITAÇÃO OU LENTIFICAÇÃO), E ALTERAÇÃO DO CICLO SONO-VIGILIA.

2. Distúrbio de Atenção - LETTERS ATTENTION TEST:

Agora vou dizer uma sequência de 10 letras. Sempre que ouvir a letra "A", aperte minha mão"

S-A-V-E-A-H-A-A-R-T

((considera-se positivo o teste com >2 erros))

☐ Nenhum erro ☐ 1 erro ☐ 2 erros ☐ 3 erros ☐ 4 ou mais erros ☐ Não respondeu/ impossível avaliar

2. Distúrbio de Atenção - DIAS DA SEMANA INVERTIDOS

Por favor me diga os dias da semana de trás para frente, começando com domingo.

(É permitido auxiliar com: "qual é o dia que vem antes do domingo? Ou se o participante parar em determinado dia X, dizer: "qual é o dia que vem antes do dia X". Este auxílio pode ser usado 2 vezes no total. Se o participante começar a enumerar os dias na ordem habitual, repita as instruções gerais)

	Correto	Incorreto	Recusou	Não sabe ou não respondeu
Domingo	☐	☐	☐	☐
Sábado	☐	☐	☐	☐
Sexta	☐	☐	☐	☐
Quinta	☐	☐	☐	☐
Quarta	☐	☐	☐	☐
Terça	☐	☐	☐	☐
Segunda	☐	☐	☐	☐

2. Desatenção presente?

☐ Sim (leve) - ex: não atrapalha entrevista
☐ Sim (acentuada) - ex: atrapalha a entrevista ☐ Não

2. Distúrbio de Atenção - Descrever observações a cerca da avaliação atencional, se necessário.

3. Pensamento Desorganizado - O pensamento do paciente era desorganizado ou incoerente, com a conversa dispersiva ou irrelevante, fluxo de ideias pouco claro ou ilógico, ou mudança imprevisível do assunto? Levar em consideração:

-desorientação ttemporoespacial;
-conhecimento da causa de hospitalização;

ou

-perguntas como "O peixe voa?" ou "Se eu jogar uma pedra na água, o que acontece com ela?".

☐ Não ☐ Sim ☐ Incerto/Impossível avaliar

3. Pensamento desorganizado - gravidade

☐ Leve (ex: não atrapalha a entrevista)
☐ Acentuado (ex: atrapalha a entrevista)

3. Pensamento desorganizado - Descrever observações a cerca da avaliação de pensamento desorganizado, se necessário.

4. Nível de consciência - Como você classificaria o nível de consciência do paciente?

- ☐ Alerta (normal)
☐ Vigilante (hiperalerta, hipersensível a estímulos ambientais, assustando-se facilmente)
☐ Letárgico (sonolento, facilmente acordável)
☐ Estupor (dificuldade para despertar)
☐ Coma

4. Nível de consciência - Descrever observações a cerca da avaliação de nível de consciência, se necessário.

Comentários adicionais sobre a avaliação de delirium:

CAM - Conclusão:

☐ Negativo ☐ Positivo
(diagnóstico de delirium requer a presença dos critérios 1 ('a' ou 'b') e 2, somados ao critério 3 ou 4.)

RICHMOND AGITATION-SEDATION SCALE (RASS)

- ☐ +4: Combativo(a) - Claramente combativo(a), violento(a), representando risco para a equipe
☐ +3: Muito agitado(a) - Puxa ou remove tubos ou cateteres, agressivo(a) verbalmente
☐ +2: Agitado(a) - Movimentos despropositados frequentes
☐ +1: Inquieto(a) - Apresenta movimentos, mas que não são agressivos ou vigorosos
☐ 0: Alerta e calmo(a)
☐ -1: Sonolento(a) - Adormecido(a), mas acorda ao chamado (estímulo verbal) e mantém os olhos abertos por mais de 10 segundos
☐ -2: Sedação leve - Despertar precoce ao estímulo verbal, mantém contato visual por menos de 10 segundos
☐ -3: Sedação moderada - Movimentação ou abertura ocular ao estímulo verbal (mas sem contato visual)
☐ -4: Sedação intensa - Sem resposta ao chamado pelo nome, mas apresenta movimentação ou abertura ocular ao toque (estímulo físico)
☐ -5: Não desperta - Sem resposta ao estímulo verbal ou físico

FATORES DE RISCO DELIRIUM

****Obs: Marcar "NÃO SE APLICA" se não tiver indicação de uso de dispositivos (óculos / aparelho auditivo), ou seja, se paciente não fazia uso antes da internação.**

	Sim	Não	Não se aplica
Uso de sonda vesical de demora	☐	☐	☐
Restrição (contenção) mecânica	☐	☐	☐
Uso de óculos	☐	☐	☐
Uso de aparelho auditivo	☐	☐	☐

Temperatura axilar (°C):

Frequência respiratória:

Frequência cardíaca:

Anexo C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, HC-FMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

CONFIDENCIAL

Identificação do Estudo: Microbiota e Delirium – Modelo 2 (Ambulatório)

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL:

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.):

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:

Efeito do perfil de microbiota intestinal sobre a ocorrência de delirium em idosos agudamente enfermos hospitalizados: um estudo prospectivo de coorte

PESQUISADORES: CARGO/ FUNÇÃO: INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL:

Thiago Junqueira Avelino da Silva Principal investigador CRM-SP 116.132

Flávia Barreto Garcez Carvalho Sub-investigadora CRM-SP 164.589

UNIDADE DO HC-FMUSP: Pronto-Socorro Médico (PSM) e Ambulatório de Geriatria do HC-FMUSP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, HC-FMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

CONFIDENCIAL

Identificação do Estudo: Microbiota e Delirium – Modelo 2 (Ambulatório)

O QUE É CONSENTIMENTO?

Dar consentimento significa concordar em participar desta pesquisa. Você tem o direito de decidir se quer ou não participar deste estudo. Por favor, utilize uma parte do seu tempo para ler as informações a seguir e não hesite em nos perguntar caso haja qualquer tipo de dúvida. Você pode conversar de forma sigilosa com sua família, seus amigos e seu(sua) médico(a) particular para ajudá-lo(a) a tomar uma decisão. Você deve assinar as páginas no final deste termo e de uma 2ª via, caso decida de fato participar do estudo. Você receberá uma das vias cópia para seu registro e controle.

POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO REALIZADO?

Este estudo tem o objetivo de avaliar se a microbiota intestinal (um grupo de bactérias que habitam o nosso intestino) tem influência no surgimento de uma condição chamada *delirium*.

Na presença de doenças agudas e durante a permanência no hospital, os indivíduos idosos estão mais sujeitos a diversas complicações e a mais frequente delas é *delirium*.

Delirium é uma síndrome que se caracteriza por uma mudança repentina do comportamento e da consciência do indivíduo. Pacientes com *delirium* ficam confusos, desatentos, muitas vezes com alterações de memória e do sono, e isso pode ser chamado de “estado confusional agudo”.

Algumas pessoas ficam agitadas, agressivas, e podem sofrer de alucinações, mas muitas demonstram sonolência excessiva e lentificação do pensamento e de reações ao meio. Embora seja um quadro reversível, infelizmente muitas pessoas nunca mais recuperam sua condição plena após um episódio de *delirium*, e algumas continuam a ter mais dificuldades de memória mesmo após a alta. Esse “estado confusional agudo” é muito comum em idosos internados, e costuma sinalizar que algo grave pode estar acontecendo.

Já conhecemos algumas medidas importantes para prevenir *delirium*, como ajudar o paciente a se recordar do local onde se encontra e da data do dia, evitar interromper as horas de sono normal, garantir o acesso a óculos e próteses auditivas, e manter familiares próximos durante a internação. Além disso, sabe-se que uma das melhores formas de prevenir *delirium* é tratando as condições que fazem ele aparecer, como infecções, desidratação e constipação. No entanto, ainda não se sabe todas as causas que levam ao surgimento de *delirium* e é necessário melhorar o conhecimento sobre essas condições.

O nosso intestino abriga um grupo de bactérias que, ao invés de causarem uma doença, são responsáveis por manter o equilíbrio do organismo. Esse grupo de bactérias é chamado microbiota intestinal. Quando essa microbiota está alterada, ela pode causar problemas para alguns órgãos do nosso corpo, como por exemplo o cérebro. Esse grupo de bactérias já foi associado a condições muito comuns como doença de Alzheimer e depressão.

Dessa forma, acreditamos que a microbiota intestinal possa ter um papel importante no surgimento de *delirium*, já que ele também é uma doença que afeta o cérebro. Se essa hipótese for confirmada, poderemos implementar medidas que tratem as alterações dessa microbiota e contribuam para a prevenção do “estado confusional agudo” em idosos com doenças agudas ou internados no hospital.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, HC-FMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

CONFIDENCIAL

Identificação do Estudo: Microbiota e Delirium – Modelo 2 (Ambulatório)

QUANTOS PARTICIPANTES ESTARÃO NO ESTUDO?

Aproximadamente 110 pessoas com idade igual ou superior a 65 anos participarão desse estudo.

O QUE ESTE ESTUDO ENVOLVE?

Você pode participar desse estudo se tiver pelo menos 65 anos e fizer acompanhamento no ambulatório de Geriatria do HC-FMUSP. A participação não será possível nas seguintes situações:

- Uso de antibiótico há mais de 24 horas.
- Doenças abdominais agudas.
- Uso recente (menos de 1 mês) ou atual de probióticos.
- Suspeita de qualquer outra doença aguda no momento da avaliação.

Ao aceitar participar desse estudo, você receberá o tratamento habitual de seus problemas de saúde, sem nenhuma interferência nos cuidados da condição que o(a) trouxe até o hospital. Na momento da sua entrada no estudo, faremos uma entrevista completa para verificar o seu estado de saúde. Será realizado um swab retal, que consiste na colocação de dispositivo de plástico com uma esponja na extremidade através da região anal de forma rápida e sem ameaça à sua segurança e, se disponível, será coletada uma amostra de fezes, ambas servindo como comparação para as amostras dos participantes que serão avaliados no pronto-socorro. Essa é uma forma de avaliarmos a microbiota do intestino de pessoas que, como você, não tem doenças agudas e que estão na comunidade, ou seja, não estão internadas no hospital. Nós também iremos coletar uma amostra de sangue apenas na primeira avaliação para análise de alguns exames laboratoriais importantes, como hemoglobina e função renal.

QUE EFEITOS COLATERAIS OU RISCOS PODEM SER ESPERADOS NO ESTUDO?

Não será administrada nenhuma substância nem realizado nenhum procedimento invasivo de alto risco durante o estudo. A punção da veia ("picada") para coleta de sangue será realizada por profissionais capacitados, e apenas na primeira avaliação após inclusão no estudo. Os efeitos colaterais que podem acontecer na hora da punção da veia são: dor, ansiedade ou medo, hematoma local e punção arterial. No entanto, a capacitação dos profissionais envolvidos na coleta e a aplicação de técnicas apropriadas de punção da veia reduzem esses riscos. Não há efeitos adversos importantes associados à realização do swab retal e esse procedimento será realizado apenas por profissionais habilitados (enfermeiros e médicos).

Qualquer outra intervenção ou administração de medicamentos será decidida pela equipe médica do ambulatório de Geriatria a depender da doença que trouxe você até aqui, sem qualquer relação com a participação no estudo.

QUE BENEFÍCIOS PODEM SER ESPERADOS NO ESTUDO?

Participar do estudo pode não ter um benefício direto para você. Também não há qualquer compensação financeira por sua participação.

No entanto, como participante, você será submetido a uma avaliação global pelo(a) médico(a) relacionado(a) ao estudo e a coleta de exames laboratoriais. Qualquer problema significativo detectado durante essa avaliação será

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, HC-FMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

CONFIDENCIAL

Identificação do Estudo: Microbiota e Delirium – Modelo 2 (Ambulatório)

reportado ao(a) seu(sua) médico(a) assistente, com a sua concordância, para que as medidas apropriadas sejam tomadas.

VOCÊ DEVERÁ PERMANECER NO ESTUDO?

Sua participação é muito importante porque nos ajudará a desenvolver um tratamento potencialmente eficaz para uma condição de elevada frequência e de impacto ruim para a saúde do idoso. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as de outros pacientes, de forma confidencial, não sendo divulgada a identificação de nenhum participante do estudo.

Você pode optar por interromper a participação no estudo a qualquer momento sem dar uma explicação específica. A sua decisão não afetará o atendimento médico que você recebe normalmente fora do estudo. O(A) médico(a) do estudo pode interromper a sua participação se considerar, em determinado momento, como sendo a melhor decisão para a sua saúde e bem-estar.

Nós iremos sempre compartilhar com você novas informações que possam afetar a sua opção em permanecer no estudo, o mais rapidamente possível. Se você decidir sair do estudo, todos os dados coletados antes de o deixar ainda serão utilizados. Todas as informações relativas à segurança que sejam pertinentes e forem relatadas após você deixar o estudo serão também coletadas.

QUEM VOCÊ DEVERÁ CONTATAR SE TIVER DÚVIDAS?

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas (Principal Investigador: Dr. Thiago Avelino-Silva e Sub-investigadora: Dra. Flávia Garcez). Entre em contato conosco:

Núcleo de Apoio a Pesquisa e Ensino em Geriatria e Gerontologia (NAPEGG)
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 255, 8º andar do PAMB (Prédio dos Ambulatórios)
CEP: 05403-010, São Paulo (SP)
Telefone: (11) 2661-6639
E-mail: geriatria.ichc@hc.fm.usp.br

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com:

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HC-FMUSP (CAPPesq):
Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: (11) 2661-1548 e 2661-1549 – e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, HC-FMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

CONFIDENCIAL

Identificação do Estudo: Microbiota e Delirium – Modelo 2 (Ambulatório)

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

ID do participante: SD-_____

Eu, _____

(nome do participante ou representante legal, por extenso)

- Confirmando que li as informações escritas (ou que essas informações foram lidas em voz alta para mim) do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do estudo sobre Microbiota Intestinal e *Delirium*, em sua versão 1.1 HCFMUSP, datada de 12 de dezembro de 2018, com 5 páginas, e que os procedimentos do estudo me foram explicados pela equipe responsável durante o processo de obtenção de consentimento.
- Confirmando que tive a oportunidade de fazer perguntas a respeito desse estudo e que estou satisfeito(a) com as respostas e explicações que me foram dadas, sendo que ficaram claros para mim quais são os propósitos da pesquisa, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário.
- Entendo que eu permito o acesso aos meus dados por pessoas autorizadas descritas no formulário de informações.
- Tive tempo e oportunidade para considerar a participação nesse estudo.
- Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

Assinatura do participante/ representante legal, ou impressão digital*:

Data ____/____/____

Nome por extenso da pessoa que conduziu consentimento: _____

Assinatura da pessoa que conduziu consentimento. Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido desse(a) paciente ou representante legal para a participação nesse estudo.

Data ____/____/____

Confirmando que sou independente do estudo, que participei do processo do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, e que li as informações por escrito sobre o estudo.

*Nome por extenso da testemunha

Assinatura da testemunha

Data: ____/____/____ 20____

*A testemunha é exigida se o participante ou representante legal não puder ler.