

# ILANNA MARQUES GOMES DA ROCHA

Microbiota intestinal associada à inflamação e permeabilidade intestinal em pacientes com doenças inflamatórias intestinais em remissão clínica

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências em Gastroenterologia.

**Programa** – Ciências em Gastroenterologia

**Orientador:** Professor Doutor Dan Linetzky Waitzberg.

**Coorientadora:** Doutora Natália Sousa Freitas Queiroz.

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 01 de novembro de 2011.  
A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

**São Paulo**

**2023**

# ILANNA MARQUES GOMES DA ROCHA

Microbiota intestinal associada à inflamação e permeabilidade intestinal em pacientes com doenças inflamatórias intestinais em remissão clínica

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências em Gastroenterologia.

**Programa** – Ciências em Gastroenterologia

**Orientador:** Professor Doutor Dan Linetzky Waitzberg.

**Coorientadora:** Professora Doutora Natália Sousa Freitas Queiroz.

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 01 de novembro de 2011.  
A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

**São Paulo**

**2023**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Rocha, Ilanna Marques Gomes da  
Microbiota intestinal associada à inflamação e  
permeabilidade intestinal em pacientes com doenças  
inflamatórias intestinais em remissão clínica /  
Ilanna Marques Gomes da Rocha. -- São Paulo, 2023.  
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Ciências em Gastroenterologia.  
Orientador: Dan Linetzky Waitzberg.  
Coorientadora: Natália Sousa Freitas Queiroz.

Descritores: 1.Microbiota intestinal 2.Doença de  
Crohn 3.Retocolite ulcerativa 4.Inflamação  
5.Permeabilidade 6.Consumo alimentar

USP/FM/DBD-130/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

## Normalização Adotada

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

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

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

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

*Na verdade, só sabemos quão pouco sabemos - com o saber cresce a dúvida.*

Johann Goethe (1826)

## DEDICATÓRIA

Dedico esta tese ao meu esposo, Abel da Costa Neto, maior incentivador das minhas conquistas. Agradeço o companheirismo, por me inspirar e me encorajar a ser cada dia melhor.

Aos meus pais, Nazuca Marques e José Edgar, e aos meus irmãos, Lívia Marques e Vinícius Marques, por todos os ensinamentos, por investirem na minha educação, apoiarem incondicionalmente as minhas escolhas, entenderem minha ausência e se fazerem sempre presentes, ainda que geograficamente distantes, em todos os momentos.

À minha família, minha base e fortaleza, a quem eu devo tudo o que sou. Amo vocês!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força e discernimento. Por me fazer entender, nas palavras de Santa Teresa d'Ávila, que “é justo que muito custe o que muito vale” e que o valor da conquista vai muito além da vitória, mas está no caminho percorrido e nos que estiveram conosco nessa jornada.

Agradeço especialmente ao professor Doutor Dan Linetzky Waitzberg, minha maior referência como pesquisador e mentor. Expresso minha profunda gratidão por toda orientação, conselhos e acolhimento no doutorado. Estar ao lado do Dr. Dan é tornar real o sonho da graduanda da Universidade Federal do Rio Grande do Norte que, ainda que muito distante, acreditava ser possível fazer ciência com o profissional que mais inspirava sua formação. Dr. Dan, estar ao seu lado é a prova de que os nossos sonhos podem se concretizar.

À Dra. Natalia Sousa Freitas Queiroz, pela coorientação e valiosas contribuições no estudo das doenças inflamatórias intestinais. Exemplo de profissional com extrema dedicação, sua visão clínica permitiu integrar os conhecimentos do estudo à prática clínica. Muito obrigada por sua amizade e conselhos na minha trajetória profissional.

À Danielle Cristina Fonseca Candian, coordenadora do projeto VALIDYS e minha parceira de doutorado nestes anos de estudo. Dani, serei eternamente grata por sua amizade e acolhimento, desde o meu primeiro dia no grupo de pesquisa. Muito obrigada!

À Raquel Susana Torrinhas, bióloga chefe do METANUTRI e grande pesquisadora na área. Pelo incentivo à pesquisa, auxílio nas correções de relatórios, apresentações e artigos e, acima de tudo, pela disponibilidade em sempre auxiliar, muito obrigada.

Aos Doutores Gabriel Fernandes, da Universidade Federal de Minas Gerais, e John Anthony McCulloch, pesquisador do *National Institutes of Health*, por toda atenção e ajuda com as análises de bioinformática e bioestatística.

Trabalhar com os doutores foi uma experiência única para o meu crescimento científico e possibilitou compreender quão amplo é o mundo da microbiota intestinal.

A todos os amigos da equipe METANUTRI, em especial Letícia Callado, Bianca Balmant, Natalia Magalhães e Natasha Machado, pela amizade, ensinamentos e grandes momentos compartilhados.

Ao Alan Hiltner, grande entusiasta da pesquisa científica. Obrigada por me apresentar o mundo da microbiota intestinal e tanto me ensinar durante a caminhada.

À Erica Hamamura, Mariana Rezende Alves, Patrícia Bianchi e Natália Melo, que sempre me apoiaram e estiveram presentes, sendo minha família em São Paulo e tornando os meus dias muito melhores.

À Bioma4me e FQM Farma pela gentil disponibilização dos dados de sequenciamento de microbiota intestinal do projeto VALIDYS.

Aos participantes do estudo, pela disponibilidade e ensinamentos de vida no decorrer desses anos de pesquisa. Sem eles nada disso seria possível!

À equipe da Unidade de Doenças Inflamatórias Intestinais da Divisão de Gastroenterologia e Hepatologia e da Divisão de Coloproctologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), pelo respeito, acolhimento e pronta disponibilidade no decorrer da pesquisa. Pela ajuda no processo de seleção, triagem e exames dos pacientes do estudo, meu muito obrigada.

Aos professores-doutores Claudia Pinto de Oliveira, Ulysses Ribeiro Junior, José Jukemura e aos demais membros da comissão da Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia, pela dedicação à frente da nossa instituição.

Aos funcionários do Disciplina de Cirurgia do Aparelho Digestivo do HCFMUSP, em especial Vilma de Jesus Libério, por todo apoio e compromisso no atendimento com os pós-graduandos.



À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo apoio concedido ao desenvolvimento desta pesquisa, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de doutorado que permitiu a minha dedicação a esse trabalho.

Ao serviço de Biblioteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo auxílio.

Por fim, agradeço a todos aqueles que fazem ou fizeram parte da minha vida e que, direta ou indiretamente, contribuíram para minha formação.

## SUMÁRIO

**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

**LISTA DE SÍMBOLOS**

**LISTA DE TABELAS**

**LISTA DE FIGURAS**

**LISTA DE GRÁFICOS**

**RESUMO**

**ABSTRACT**

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	24
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	29
2.1 DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS .....	30
2.2 MICROBIOTA INTESTINAL: CONCEITOS GERAIS .....	32
2.3 MICROBIOTA INTESTINAL E DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS .....	33
2.4 INFLAMAÇÃO E PERMEABILIDADE INTESTINAL EM DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS .....	36
2.5 CONSUMO ALIMENTAR, ESTADO NUTRICIONAL E MICROBIOTA INTESTINAL EM DII .....	39
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	43
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	45
4.1 OBJETIVO GERAL .....	46
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	46
<b>5. CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	47
<b>5. CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	48
5.1 LOCAL E EXECUÇÃO DO ESTUDO .....	48
5.2 ASPECTOS ÉTICOS .....	48
5.3 DESENHO E PROTOCOLO DO ESTUDO .....	48
5.4 VARIÁVEIS CLÍNICAS E SOCIODEMOGRÁFICAS .....	50
5.5 AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL .....	51
5.5.1. Coleta das amostras .....	51
5.5.2 Extração do DNA .....	51
5.5.3 Preparo da biblioteca e sequenciamento 16SrRNA .....	52
5.6 BIOINFORMÁTICA DOS DADOS DE MICROBIOTA INTESTINAL .....	53

5.6.1	Processamento das sequências e classificação taxonômica .....	53
5.6.2	Caracterização de alfa e beta diversidade da microbiota intestinal...	53
5.6.3	Identificação de marcadores da microbiota .....	54
5.7	AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO INTESTINAL .....	54
5.8	AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL .....	55
5.9	AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA .....	56
5.10	AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR.....	56
5.11	AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA E COMPOSIÇÃO CORPORAL .....	59
5.12	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	60
5.12.1	Análises de consumo alimentar .....	61
5.12.2	Análise de inflamação e permeabilidade intestinal.....	62
5.12.3	Análises integradas: Microbiota, inflamação, permeabilidade e consumo alimentar. ....	62
5.12.4	Análises de recidiva de doença .....	63
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>65</b>
6.1	ANÁLISES CLÍNICAS E SOCIODEMOGRÁFICAS.....	66
6.2	MICROBIOTA INTESTINAL .....	69
6.3	INFLAMAÇÃO E PERMEABILIDADE INTESTINAL.....	79
6.3	CONSUMO ALIMENTAR.....	83
6.4.1	Composição de microbiota intestinal e modificação do hábito intestinal.....	88
6.4.2	Correlações entre microbiota intestinal, inflamação e permeabilidade intestinal.....	89
6.4.3	Correlações entre dieta, microbiota intestinal, inflamação e permeabilidade intestinal .....	94
6.5	AVALIAÇÃO DAS VARIÁVEIS PREDITORAS DE RECIDIVA DE DOENÇA.....	97
<b>7.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>102</b>
7.1	DADOS CLÍNICOS E NUTRICIONAIS .....	103
7.2	MICROBIOTA INTESTINAL EM DII .....	105
7.3	INFLAMAÇÃO E PERMEABILIDADE INTESTINAL.....	107
7.4	CONSUMO ALIMENTAR.....	109
7.5	MICROBIOTA E HÁBITO INTESTINAL EM DII.....	111
7.6	CORRELAÇÕES ENTRE MICROBIOTA, DIETA, INFLAMAÇÃO E PERMEABILIDADE INTESTINAL.....	111
7.7	IMPACTO DAS VARIÁVEIS NA RECIDIVA DE DOENÇA.....	116

7.5 LIMITAÇÕES DO ESTUDO .....	120
<b>8. CONCLUSÃO .....</b>	<b>122</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>125</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>128</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>159</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AGCC: Ácidos graxos de cadeia curta  
AI: *Adequate Intake*  
ASV: *amplicon sequence variant*  
CD: *Crohn's Disease*  
CF: Calprotectina fecal  
Cm: centímetros  
DCNT: Doenças crônicas não transmissíveis  
DII: Doenças Inflamatórias Intestinais  
DC: Doença de Crohn  
DRI: *Dietary Reference Intakes*  
DO: densidade óptica  
DP: Desvio padrão  
EAR: *Estimated Average Requirement*  
ECCO: *European Crohn and Colitis Organization*  
ELISA: *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*  
FC: *fecal calprotectin*  
FZ: *fecal zonulin (FZ)*  
GC: Grupo controle  
GI: Gastrointestinal  
IBD: *inflammatory bowel disease*  
IFN: Interferon  
IgA: Imunoglobulina A  
IgG: Imunoglobulina G  
IID: Índice inflamatório de dieta  
IC: Intervalo de confiança  
IL: Interleucina  
IMC: Índice de massa corporal  
Kcal: quilocalorias  
Kg: quilogramas  
kHz: QUILO-HERTZ.

log2Fc:Log2FoldChange

LPS: Lipopolissacarídeos

m: metros

m<sup>2</sup>: metros quadrados

mg/dL miligrama por decilitro

MI: Microbiota intestinal

PCR: Proteína C-reativa

PI: Permeabilidade intestinal

PPM: partes por milhão

P25: percentil 25

P75: percentil 75

R24: Recordatório 24h

RCU: retocolite ulcerativa

RNA: ácido ribonucleico

SII: síndrome do intestino irritável

TGI: trato gastrointestinal

TRI: tecnologia de remoção de inibidores

UC: *Ulcerative Colitis*

WHO: *World Health Organization*

WGS: *Whole Genome Sequencing*

ZF: zonulina fecal

µg/dL: Micrograma por decilitro

U/L unidades por litro

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$ : alfa

$\beta$ : beta

$\gamma$ : gama

%: por cento

%IN: percentual de inadequação

=: igual a

<: menor que

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Comparação de dados clínicos e sociodemográficos entre população controle saudável e pacientes com doenças inflamatórias intestinais em remissão clínica (n=85).....	66
<b>Tabela 2.</b> Comparação de dados clínicos e sociodemográficos entre pacientes com doença de Crohn e retocolite ulcerativa (Doenças Inflamatórias Intestinais) em remissão clínica (n=40). .....	68
<b>Tabela 3.</b> Análise da beta diversidade da microbiota, baseada nas diferenças entre ASV, comparando grupos controle saudável e doenças inflamatórias intestinais (n=85).....	70
<b>Tabela 4.</b> Análise da alfa diversidade da microbiota, com análise dos índices Shannon, Simpson e Chao, comparando grupos controle saudável e pacientes com doenças inflamatórias intestinais (n=85). .....	72
<b>Tabela 5.</b> Análise da quantidade diferencial de filos bacterianas entre grupo controle saudável e grupo doenças inflamatórias intestinais (n=85) .....	74
<b>Tabela 6.</b> Análise da quantidade diferencial de gêneros e famílias bacterianas entre grupo controle saudável e grupo doenças inflamatórias intestinais (n=85). .....	76
<b>Tabela 7.</b> Análise da quantidade diferencial de espécies bacterianas entre grupo controle saudável e grupo doenças inflamatórias intestinais (n=85). .....	77
<b>Tabela 8.</b> Correlação entre concentração de zonulina fecal, calprotectina fecal e PCR sérica com variáveis clínicas, nutricionais e bioquímicas em pacientes com doenças inflamatórias intestinais (n=40).....	81
<b>Tabela 9.</b> Associação entre variáveis clínicas e bioquímicas com níveis elevados de zonulina fecal em pacientes com doenças inflamatórias intestinais em remissão clínica (n = 40). .....	82
<b>Tabela 10.</b> Comparação da média de consumo habitual de macronutrientes e micronutrientes entre pacientes com doenças inflamatórias intestinais (DII) e grupo controle saudável (GC) em remissão clínica (n=85).....	84
<b>Tabela 11.</b> Comparação da média de consumo habitual de macronutrientes e micronutrientes entre pacientes com doença de Crohn (DC) e retocolite ulcerativa em remissão clínica (n=40).....	85
<b>Tabela 12.</b> Recomendações nutricionais diárias, consumo habitual de macronutrientes e micronutrientes e prevalência de inadequação de ingestão (%IN) por sexo e faixa etária em pacientes com doenças inflamatórias intestinais em remissão clínica (n=40). .....	86



<b>Tabela 13.</b> Características clínicas nos diferentes quartis do índice inflamatório da dieta em pacientes com doenças inflamatórias intestinais em remissão clínica (n=40).....	88
<b>Tabela 14.</b> Correlações entre microbiota intestinal em ASV, níveis de zonulina e calprotectina fecal em pacientes com Doenças Inflamatórias Intestinais (n=40). .....	93
<b>Tabela 15.</b> Correlação entre concentração de zonulina fecal, calprotectina fecal e PCR sérica com sequências bacterianas com comportamento linear para índice de inflamação na dieta em pacientes com doenças inflamatórias intestinais em remissão clínica (n=40). .....	97
<b>Tabela 16.</b> Análise comparativa da microbiota intestinal de pacientes com doenças inflamatórias intestinais que mantiveram remissão clínica, versus pacientes que tiveram recidiva de doença após 6 meses de acompanhamento (n=34).....	99
<b>Tabela 17.</b> Análise comparativa da microbiota intestinal de pacientes com doenças inflamatórias intestinais que mantiveram remissão clínica, versus pacientes que tiveram recidiva de doença após 12 meses de acompanhamento (n=31).....	100
<b>Tabela 18.</b> Preditores de recidiva da doença em pacientes com doença inflamatória intestinal em 6 meses (n = 34) e 12 meses (n = 31) de acompanhamento.....	101

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Diferenças na composição da microbiota intestinal em nível de filós, com perfil microbiano de equilíbrio (para paciente adulto saudável) e desequilíbrio (para paciente com doença de Crohn). ..... 34
- Figura 2.** Resumo dos desequilíbrios na microbiota intestinal de pacientes com Doenças Inflamatórias Intestinais, comparado à composição da microbiota de pacientes saudáveis. Fonte: Elaborado pela autora com base em literatura científica na área (23, 24, 28, 50, 59, 80-85). ..... 35
- Figura 3.** Análise de componentes principais da macroestrutura da microbiota intestinal para (A) Gênero; (B) Espécie e (C) ASV bacteriano, baseado no índice de Jensen-Shannon, comparando GC versus DC e RCU para identificação de beta diversidade e diferenças na macroestrutura da MI. .... 70
- Figura 4.** Comparação da alfa diversidade bacteriana, representada por (A) Índice de Shannon, (B) Índice de Simpson e (C) Índice Chao, do grupo controle (GC) (n=45) versus grupo retocolite ulcerativa (RCU) (n=20) e grupo doença de Crohn (DC) (n=20). Cada ponto na figura corresponde a diversidade de um paciente. Os bigodes indicam 1,5 vezes o intervalo interquartil acima do p75 e abaixo do p25. Pontos fora dos bigodes indicam outliers. .... 71
- Figura 5.** Comparação da abundância relativa para análise de filós com significância estatística ( $p < 0,05$ ) entre grupos: (A) grupo controle (n=45) versus doenças inflamatórias intestinais (n=40); (B) grupo controle (n=45) versus doença de Crohn (n=20) e (C) grupo controle (n=45) versus retocolite ulcerativa (n=20). .... 73
- Figura 6.** Comparação da abundância relativa para análise de gêneros e famílias com significância estatística ( $p < 0,05$ ) entre grupos: (A) grupo controle (n=45) versus doenças inflamatórias intestinais (n=40); (B) grupo controle (n=45) versus doença de Crohn (n=20) e (C) grupo controle (n=45) versus retocolite ulcerativa (n=20). .... 75
- Figura 7.** Comparação da abundância relativa com significância estatística ( $p < 0,05$ ) entre os subtipos das doenças inflamatórias intestinais: doença de Crohn (DC; n=20) e retocolite ulcerativa (RCU; n=20) para as análises de (A) filós, (B) famílias e (C) espécies bacterianas. .... 78
- Figura 8. Comparação da alfa diversidade com (A) Índice Chao, (B) Índice Shannon, (C) Índice Simpson, e beta diversidade (D) em pacientes com doenças inflamatórias intestinais (n=40). **Legenda:** GC: grupo controle, DII: Doenças inflamatórias intestinais. .... 89
- Figura 9.** Correlações positivas entre gêneros bacterianos e calprotectina fecal em pacientes com doenças inflamatórias intestinais em remissão clínica (n=40). Legenda: DC: doença de Crohn, RCU: retocolite ulcerativa, PPP: parte por milhão. .... 90

**Figura 10.** Correlações negativas entre gêneros bacterianos e calprotectina fecal em pacientes com doenças inflamatórias intestinais em remissão clínica (n=40).  
Legenda: DC: doença de Crohn, RCU: retocolite ulcerativa, PPP: parte por milhão..... 91

**Figura 11.** Correlações entre filos e gêneros bacterianos e zonulina fecal em pacientes com doenças inflamatórias intestinais em remissão clínica (n=40).  
Legenda: DC: doença de Crohn, RCU: retocolite ulcerativa, PPP: parte por milhão..... 92

**Figura 12.** Comparação da alfa diversidade bacteriana representada por (A) Índice Chao, (B) Índice Shannon e (C) Índice Simpson entre os quartis de índices inflamatórios da dieta de pacientes com doenças inflamatórias intestinais (n=40).  
..... 94

**Figura 13.** Análise comparativa dos índices de diversidade de Chao, Shannon e Simpson da microbiota intestinal dos pacientes estratificados em dois grupos, com base no status de atividade da doença aos 6 meses. Legenda: 1: Remissão Clínica; 2: Recidiva de Doença. .... 98

**Figura 14.** Análise comparativa dos índices de diversidade de Chao, Shannon e Simpson da microbiota intestinal dos pacientes estratificados em dois grupos, com base no status de atividade da doença aos 12 meses. Legenda: 1: Remissão Clínica; 2: Recidiva de Doença. .... 98

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Curvas ROC para avaliar acurácia das concentrações de zonulina fecal no diagnóstico de doenças inflamatórias intestinais. (A) Curva discriminatória para DII versus controles saudáveis (n=85), (B) Curva discriminatória para retocolite ulcerativa versus controles saudáveis (n=45), (C) Curva discriminatória para doença de Crohn versus controles saudáveis (n=45).  
..... 80
- Gráfico 2.** Sequências bacterianas com comportamento linear para índice de inflamação na dieta em pacientes com doenças inflamatórias intestinais em remissão clínica (n=40). ..... 95

## RESUMO

ROCHA IMG. Microbiota intestinal associada à inflamação e permeabilidade intestinal em pacientes com doenças inflamatórias intestinais em remissão clínica [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

**Introdução:** Doenças Inflamatórias Intestinais (DII), como Doença de Crohn (DC) e Retocolite Ulcerativa (RCU), são condições clínicas caracterizadas por inflamação crônica do trato gastrointestinal (TGI), associadas a desequilíbrios da microbiota intestinal (MI) e inflamação durante a fase ativa de doença, porém com escassos estudos que correlacionam marcadores microbianos e inflamatórios durante a fase de remissão clínica. **Objetivo:** Investigar em pacientes com DII em remissão clínica, em comparação com um grupo controle saudável, as modificações na composição da MI associadas à inflamação e permeabilidade intestinal e risco de recidiva. **Métodos:** Foram incluídos no estudo 40 pacientes com DII (20 DC e 20 RCU) e 45 indivíduos do grupo controle (GC), pareados por sexo. A avaliação da MI intestinal foi realizada por meio de técnica de sequenciamento do gene 16S rRNA, enquanto permeabilidade e inflamação intestinal foram medidas, respectivamente, pela avaliação da zonulina fecal (ZF) e calprotectina fecal (CF) pelo método ELISA. Dados clínicos, antropométricos, composição corporal, consumo alimentar, avaliação do índice inflamatório da dieta (DII) e exames bioquímicos foram coletados e avaliados. Dados de MI foram processadas, cortados e agrupados em variantes de sequência de Amplicon (ASVs), com análise bioinformática em DESeq2 e Phyloseq para avaliar diferenças na abundância de filos, gêneros e espécies bacterianas entre os grupos. As análises diferenciais de MI, para diversidade e abundância de táxons, entre GC e DII, foram realizadas usando o teste t de Student, teste U de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. Correlações entre MI, zonulina, calprotectina, consumo alimentar e variáveis clínicas foram testadas por meio das correlações de Spearman e Pearson. Modelos de regressão linear ajustados foram usados para prever recidiva de doença após 6 e 12 meses. **Resultados:** As análises de alfa e beta diversidade identificaram diferenças significativas na composição da MI entre pacientes DII em remissão clínica e GC, bem como dentro do grupo DII. Com relação à permeabilidade intestinal, o grupo DII apresentou níveis mais elevados de ZF em comparação ao GC, que se correlacionaram negativamente com os níveis séricos de 25(OH)D e positivamente associados com os níveis de CF. Pacientes com DII apresentaram *Lachnospiraceae* inversamente correlacionados com níveis de CF e ZF, enquanto *Veillonella* e *Suterella* foram positivamente correlacionadas com CF e ZF, respectivamente. Espécies desses gêneros foram aumentadas em participantes com DII, cujas dietas eram mais pró-inflamatórias. Desequilíbrios na composição da MI, aumento de zonulina fecal e, especialmente, aumento de calprotectina fecal foram preditores de recidiva clínica de doença em 06 meses e 12 meses de seguimento. **Conclusões:** Foram observadas diferenças significativas na composição da MI em pacientes com DII, mesmo em remissão clínica, correlacionadas com marcadores de inflamação e permeabilidade. Os pacientes com DII também apresentaram níveis elevados de ZF e consumo de

dieta pró-inflamatória. Desequilíbrios na microbiota, inflamação e permeabilidade intestinal, interconectados nesta população, foram preditores de recidiva clínica de doença os 6 meses e 12 meses de seguimento.

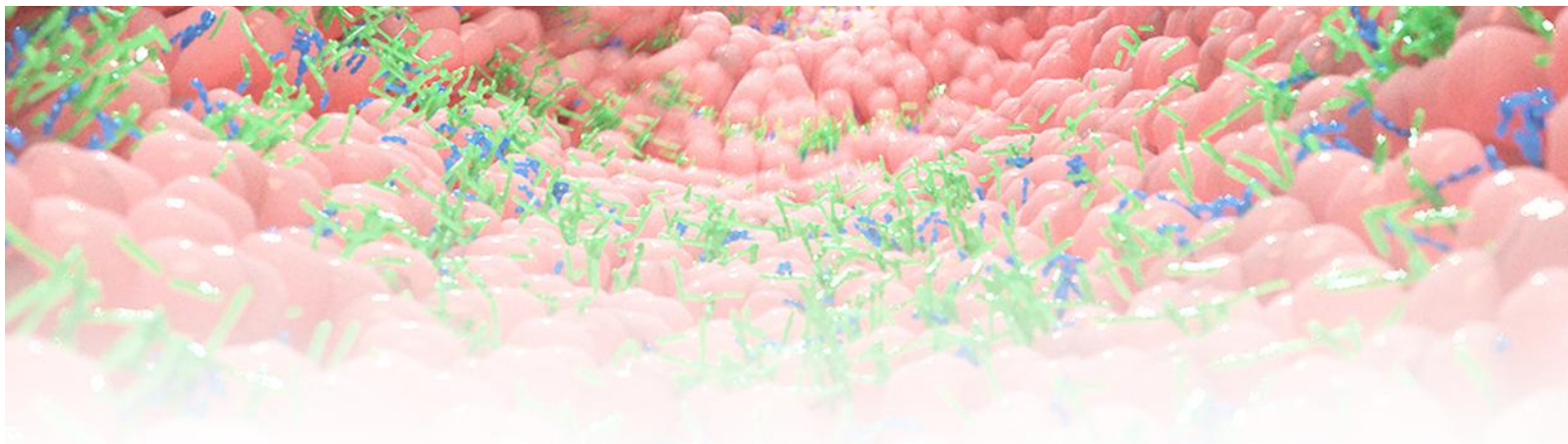
**Descritores:** Microbiota intestinal; doença de Crohn; retocolite ulcerativa; inflamação; permeabilidade; consumo alimentar.

## ABSTRACT

ROCHA IMG. Gut microbiota associated with inflammation and intestinal permeability in patients with Inflammatory Bowel Diseases in clinical remission. [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2023.

**Introduction:** Inflammatory Bowel Diseases (IBD), such as Crohn's Disease (CD) and Ulcerative Colitis (UC) are clinical conditions characterized by chronic inflammation of the gastrointestinal tract, associated with imbalances in the gut microbiota (GM) and inflammation during disease exacerbation, however few studies correlating microbial and inflammatory markers during the clinical remission phase are available. **Objective:** To investigate, in patients with IBD in clinical remission, compared to a healthy control group, the changes in GM composition associated with inflammation and intestinal permeability and clinical relapse. **Methods:** The study included 40 individuals with IBD (20 CD and 20 UC) and 45 participants from the control group (CG), matched by sex. The GM evaluation was performed using the 16S rRNA gene sequencing technique, while intestinal permeability and inflammation were evaluated, respectively, through the levels of fecal zonulin (FZ) and fecal calprotectin (FC) by the ELISA method. Clinical data, type and behavior of IBD, anthropometrics measurements, body composition, food consumption, inflammation diet index, and laboratory exam results were recorded. GM data were processed, cut and pooled into Amplicon sequence variants (ASVs) with bioinformatics analysis on DESeq2 and Phyloseq to assess differences in bacterial genera abundance between groups. Comparisons between groups were tested using Student's t test, Mann-Whitney U test, and Kruskal–Wallis. Correlations between GM, zonulin, calprotectin and clinical variables were tested using the Spearman and Pearson correlation. The impacts of GM, FZ, clinical and laboratory variables on clinical relapse were assessed using the adjusted linear regression model. **Results:** Alpha and beta diversity analysis identified significant differences in the GM composition between the IBD and CG participants, as well as within the IBD group. Regarding gut permeability, the IBD group presented higher FZ levels compared to CG, which were negatively correlated to the serum levels of 25(OH)D and positively associated with FC levels. IBD individuals showed a reduction in *Lachnospiraceae* inversely correlated with FC and FZ levels. *Veillonella* and *Sutterella* genera were positively correlated with FC and FZ, respectively. Species from these genera were increased on IBD participants whose diets were most pro-inflammatory. Imbalances in the composition of the GM, pro-inflammatory diets, increased FZ and, especially, increased FC were observed to be predictors of clinical relapse at 6 months and 12 months of follow-up. **Conclusions:** Significant differences in the GM composition of IBD patients in clinical remission were observed. IBD patients also had elevated FZ levels and pro-inflammatory diet consumption. Imbalances in the GM composition, inflammation, and intestinal permeability, interconnected in this population, were predictors of clinical disease recurrence at 6 months and 12 months of follow-up.

**Descriptors:** Gut microbiota; Crohn's disease; ulcerative colitis; inflammation; permeability; food consumption.



## **1. INTRODUÇÃO**



## 1. INTRODUÇÃO

Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) compreendem um grupo de distúrbios imunomediados, de etiologia não totalmente esclarecida, caracterizados por inflamação crônica do trato gastrointestinal (TGI), com caráter remitente-recidivante de inflamação gastrointestinal (GI) e extra intestinal, e apresentação clínica heterogênea quanto à localização de doença, progressão e gravidade da inflamação (1, 2).

Os principais tipos de DII são a retocolite ulcerativa (RCU) e a doença de Crohn (DC). A RCU caracteriza-se como uma doença não transmural, geralmente com inflamação limitada à mucosa do reto ao cólon proximal (3), enquanto a DC apresenta-se como inflamação transmural, segmentar e assimétrica, capaz de afetar todo o TGI, embora seja frequentemente mais observada no íleo e cólon (4, 5).

Dados epidemiológicos contabilizam mais de seis milhões de pessoas acometidas por DII em todo o mundo (6, 7), com crescente incidência de novos casos nas últimas décadas, especialmente em países em desenvolvimento (8). A elevada incidência de DII na população ocidental, incluindo o Brasil, motivou estudos sobre variáveis genéticas e fatores ambientais (como epidemiologia nutricional e estilo de vida) associados à patogênese e prognóstico desta condição clínica (5).

Ainda que a etiologia exata das DII não seja totalmente compreendida à luz dos conhecimentos atuais, é sabido que fatores genéticos, ambientais e imunológicos podem contribuir para a sua patogênese, atuando como gatilhos para respostas imunes exacerbadas e inflamação intestinal. Dentre esses gatilhos, sugere-se que desequilíbrios na microbiota intestinal em indivíduos geneticamente suscetíveis estejam associados às causas da doença (2, 9, 10).

Fatores que modificam negativamente a MI e se relacionam à patogênese das DII incluem ocidentalização do estilo de vida, consumo alimentar inadequado, com elevada ingestão de gorduras saturadas e baixa ingestão de fibras dietéticas e compostos bioativos, estresse, etilismo, tabagismo e elevado

uso de medicamentos, em especial, antibióticos e inibidores de bomba de prótons (8, 11-15).

Compreende-se por microbiota intestinal a vasta população de microrganismos, que inclui bactérias, fungos, archaea, protozoários e vírus, que colonizam o trato gastrointestinal, com densidade populacional crescente do estômago para o cólon (16, 17).

Esta comunidade de microrganismos está longe de ser apenas uma habitante passiva do TGI, interagindo com o hospedeiro de modo bastante ativo. Uma MI saudável (condição também conhecida como normobiose ou eubiose) entrega inúmeros benefícios à saúde, tais como: metabolização de nutrientes da dieta, fermentação de fibras, biossíntese de metabólitos como triptofano e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), produção de vitaminas, secreção de compostos antimicrobianos, regulação imunológica e manutenção da barreira epitelial intestinal normal, o que auxilia na proteção contra a adesão e colonização de patógenos (18-20).

Nos últimos anos, com o desenvolvimento e aplicação prática de técnicas de sequenciamento genético de nova geração, como o sequenciamento do gene RNA ribossômico 16S (16SrRNA) e análise completa do genoma – *Whole Genome Sequencing* (WGS) ou “*shotgun*”, foi possível explorar a composição e funcionalidade da comunidade de microrganismos na MI, especialmente bactérias, e não apenas avaliar microrganismos isolados como feito anteriormente na técnica de plaqueamento (21). Estes avanços nas técnicas de mapeamento genético permitiram olhar a comunidade de microrganismos de modo integrado, com identificação de desequilíbrios na MI e a correlação do perfil de microrganismos encontrados em condições de saúde e doença, o que possibilita estudar o efeito da MI na patogênese e prognóstico das DII (22) e correlacionar os desequilíbrios na MI com alterações em permeabilidade, inflamação intestinal e atividade de doença (23, 24).

A MI de pacientes com DII em fase ativa de doença foi extensivamente estudada nos últimos anos. Nesta população, foi descrito desequilíbrio em composição e função da MI, denominado disbiose. A MI de pacientes com DII em fase ativa é geralmente caracterizada por riqueza e diversidade reduzida, alteração na proporção dos filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, enriquecimento do

filo pró-inflamatório *Proteobacteria*, distorção em gêneros com redução de grupos benéficos, como *Roseburia*, *Faecalibacterium*, *Dorea* e *Blautia*, e enriquecimento de grupos pró-inflamatórios, como *Escherichia*, *Fusobacterium*, *Enterococcus* e *Megasphaera* (25-28).

No entanto, a composição da microbiota de pacientes com DII em remissão clínica é menos explorada e ainda não se dispõe de perfil microbiano bem estabelecido.

Em pacientes com DII em remissão, estudos anteriores identificaram redução em alfa e beta diversidade e redução dos gêneros *Akkermansia* e *Coprococcus*, benéficos à saúde intestinal (29-31). Na população brasileira com doença de Crohn, Magro *et al.* (32) sugeriram a possibilidade de remissão clínica não ser acompanhada por restabelecimento do equilíbrio microbiano do TGI. Corroborando esta informação, Pisani *et al.* (29) descrevem que o estado de disbiose do paciente com DII pode persistir durante a remissão clínica, ainda que o paciente não apresente sinais clinicamente significativos de inflamação, o que poderia contribuir para a natureza recidivante e crônica das DII.

Hipóteses para a persistência de desequilíbrios na MI de pacientes com DII em remissão clínica incluem consumo alimentar inadequado - ou baixa absorção nutricional, uso crônico de medicamentos, intervenções cirúrgicas prévias, inflamação e permeabilidade intestinal persistentes (33, 34).

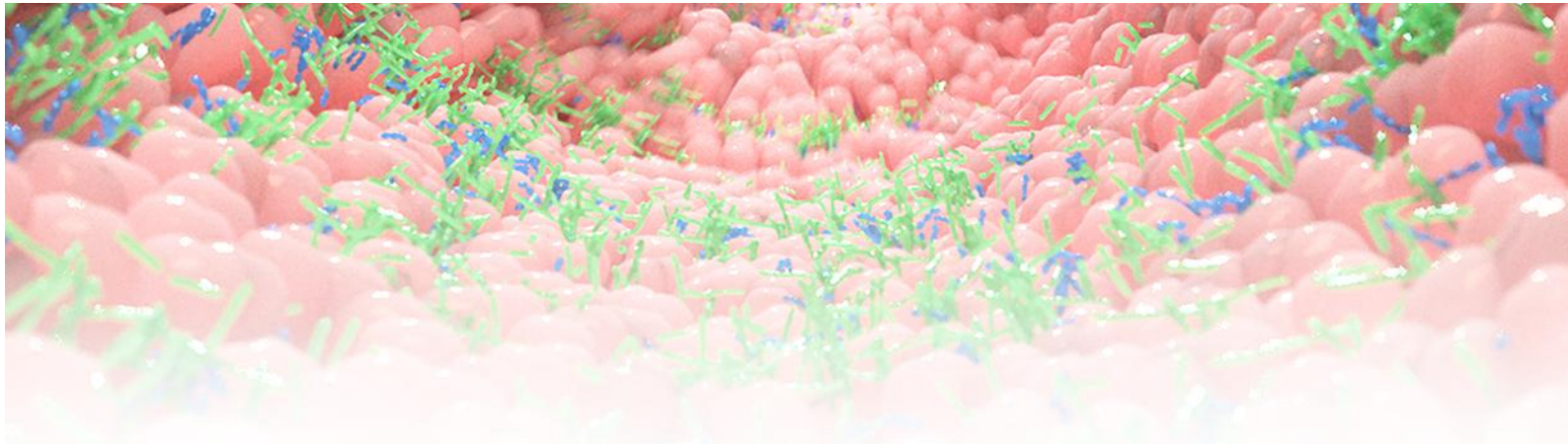
Dietas pró-inflamatórias, por exemplo, podem estar associadas a modificações da composição e funcionalidade da MI e promover inflamação intestinal nessa fase (35). Adicionalmente, mesmo em doentes com DII em remissão, observou-se aumento de zonulina (marcador de permeabilidade intestinal) e calprotectina fecal (marcador de inflamação intestinal) quando comparados à população saudável (36, 37).

As DII podem impactar aspectos físicos, psicológicos e sociais da vida do paciente, especialmente na fase ativa da doença. Com isso, a meta terapêutica atual consiste em manter o paciente em remissão profunda, que inclui clínica, laboratorial e endoscópica (38). Para esta finalidade, a abordagem convencional de tratamento se concentra principalmente na terapia medicamentosa e manejo dos sintomas e sinais intestinais e extraintestinais.

No entanto, um tratamento que visa apenas o manejo da sintomatologia pode não ser totalmente eficaz, além de comprometer o estado nutricional e a qualidade de vida do paciente. Neste cenário, novas abordagens de manejo clínico e nutricional, com estudo da MI e marcadores de inflamação, poderiam contribuir para melhor prognóstico do paciente (39). Estudar o perfil de MI de pacientes com DII em remissão clínica, comparados com o de indivíduos saudáveis, pode permitir auxiliar no manejo da doença, a partir de estratégias moduladoras da MI, melhora da função de barreira intestinal e diminuição da inflamação da mucosa intestinal (24, 40).

A fim de contribuir para maior conhecimento na área, o presente estudo tem por objetivos explorar as associações entre microbiota intestinal, inflamação e permeabilidade intestinal em pacientes com DII em remissão clínica, comparar a composição da microbiota fecal de pacientes com DII versus indivíduos saudáveis, bem como descrever o impacto do consumo alimentar e estado nutricional nessa população.

De modo a auxiliar a construção do conhecimento, conceitos mais aprofundados sobre os temas de interesse serão descritos na revisão de literatura.



## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS

As doenças inflamatórias intestinais, compreendendo a retocolite ulcerativa e a doença de Crohn, são condições clínicas crônicas e recidivantes do TGI, com manifestações intestinais e extraintestinais (9).

A prevalência de DII é crescente em todo mundo, especialmente na população ocidental, com múltiplos fatores associados à sua patogênese, incluindo aspectos genéticos e ambientais (41, 42). Uma hipótese associada à patogênese da doença é que em indivíduos geneticamente suscetíveis com MI em desequilíbrio ocorram respostas inflamatórias exacerbadas e desregulação imunológica inata e adaptativa (43). Gatilhos que afetam a MI e podem promover essa desregulação imunológica incluem agentes infecciosos, compostos químicos e alterações metabólicas mediadas por dieta ou estilo de vida (9). Acredita-se, então, que a doença seja perpetuada pela resolução deficiente da resposta inflamatória a esta lesão inicial (44).

Na relação entre resposta imune exacerbada e DII, sabe-se que em um intestino saudável danos à barreira intestinal desencadeiam o recrutamento de neutrófilos da circulação para o tecido inflamado ao longo de um gradiente quimiotático formado por citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. Os neutrófilos recrutados combatem os patógenos via fagocitose, degranulação, geração de espécies reativas de oxigênio e sofrem apoptose ao concluir suas funções, facilitando a resolução da inflamação, o reparo tecidual e o retorno à homeostase tecidual. Em indivíduos suscetíveis à DII ou com a doença já instalada, o aumento da atividade de neutrófilos pode prejudicar a função da barreira da mucosa intestinal, danificar o epitélio intestinal e promover inflamação intestinal ao aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (44-46). Assim, os neutrófilos podem atuar de modos distintos no intestino, impedindo a propagação de microrganismos, toxinas e fragmentos microbianos e estimulando a cicatrização da mucosa intestinal após lesão ou, de modo oposto, com atividade exacerbada, prejudicando a função da barreira da mucosa intestinal, danificando o epitélio intestinal e acentuando

inflamação da DII (47). Além dos neutrófilos, macrófagos e células dendríticas desempenham papéis importantes na patogênese e desenvolvimento da DII por fagocitar detritos celulares, produzir citocinas, regular o reparo tecidual e interagir com outras células (43).

Somado aos fatores genéticos, aspectos ambientais como ausência de aleitamento materno nos primeiros meses de vida, dieta inadequada, tabagismo, estresse, etilismo, inatividade física, infecções e uso de antibióticos se configuram como fatores de risco para o desenvolvimento de DII (9, 48).

Para antibióticos, a literatura aponta que sua utilização no início da vida é fator de risco para DII, especialmente em populações ocidentais (48). Um estudo canadense comparou o uso de antibióticos em população pediátrica com e sem DII e identificou que crianças com DII foram mais expostas a esta classe de medicamentos no primeiro ano de vida (49). Também foi observada a relação dose-dependente entre a utilização de antibióticos e risco para DII, com maior risco associado ao maior uso destes medicamentos (50). Na avaliação do impacto da alimentação nos primeiros anos na patogênese das DII, a metanálise examinou a relação entre amamentação e DII e identificou associação negativa para estas variáveis, indicando que crianças não amamentadas ou amamentadas em período insuficiente teriam maior risco para a condição clínica (51).

Na idade adulta, alimentação inadequada e fatores ambientais (como tabagismo, estresse, etilismo, inatividade física, etc.) podem influenciar a suscetibilidade para DII por mecanismos de alterações na composição da microbiota intestinal, aumento da permeabilidade de mucosa, inflamação intestinal e resposta imune intestinal aberrante, sugerindo que a microbiota desempenha um papel crítico na patogênese da doença (9, 34, 52-54).

No tratamento das DII, aponta-se o uso de medicamentos como primeiro passo terapêutico. O manejo medicamentoso baseia-se no uso de corticosteroides, aminossalicilato, tiopurina, imunomoduladores e drogas biológicas, a depender da localização e extensão da inflamação, da gravidade da doença, dos efeitos colaterais e da resposta do paciente à terapêutica (55-57). Nas últimas décadas, vários tratamentos medicamentosos foram desenvolvidos para DC e RCU, atuando por diferentes vias para reduzir a

inflamação e melhorar o sistema imunológico do paciente. Todavia, é observado na prática clínica que a terapia farmacológica nem sempre alcança o resultado esperado e pode aumentar a probabilidade de efeitos adversos no paciente (58). Assim, apesar das muitas opções terapêuticas, surge a necessidade de maior atenção a estratégias nutricionais e de saúde intestinal para benefício do paciente com DII (34).

Dado o importante papel da microbiota intestinal nesta população, é crescente o interesse no seu mapeamento e nas estratégias para sua modulação, utilizando-se de nutracêuticos, prebióticos, probióticos, antibióticos e transplante de microbiota fecal (59).

## 2.2 MICROBIOTA INTESTINAL: CONCEITOS GERAIS

A microbiota intestinal é uma comunidade dinâmica de microrganismos composta por bactérias, vírus, fungos e outros reinos, que abriga aproximadamente 90% de todo o microbioma humano e abrange número de genes substancialmente superior aos genes humanos (60).

Literatura recente descreve a transferência da microbiota materna para o bebê no período pré-natal (via eixo intestino-microbiota-placenta). Todavia, ainda é consenso que a primeira grande colonização ocorre no momento do nascimento, influenciada pelo tipo de parto, idade gestacional (prematureo versus nascimento a termo) e uso de antibióticos em internação hospitalar (61, 62, 63). Após a primeira grande entrega, a formação e estabilidade da MI será continuada nos primeiros anos de vida, impactada pela amamentação, alimentação complementar, uso de medicamentos e estilo de vida. Aos 5 anos de vida, a MI da criança se assemelha a de um adulto, em termos de composição, estabilidade e resiliência (64, 65).

O processo de formação microbiota intestinal nos primeiros anos de vida ocorre de modo concomitante ao desenvolvimento do sistema imunológico e é chave para os processos de saúde e doença na infância e vida adulta (66). Colonização adequada nos primeiros anos está associada à prevenção de condições clínicas como alergias, enquanto desequilíbrios na MI são associados a maior risco para doenças metabólicas e doenças inflamatórias intestinais (67, 68).



Em adultos, a composição da MI é moldada por fatores genéticos, exposição ambiental, hábitos alimentares e estilo de vida (69). A composição microbiana de um indivíduo adulto saudável tem *Bacteroidetes* e *Firmicutes* como filos mais representativos (compondo aproximadamente 90% da população bacteriana total), enquanto a presença de filos pró-inflamatórios, como *Proteobacteria* e *Fusobacteria*, é relativamente escassa (70, 71).

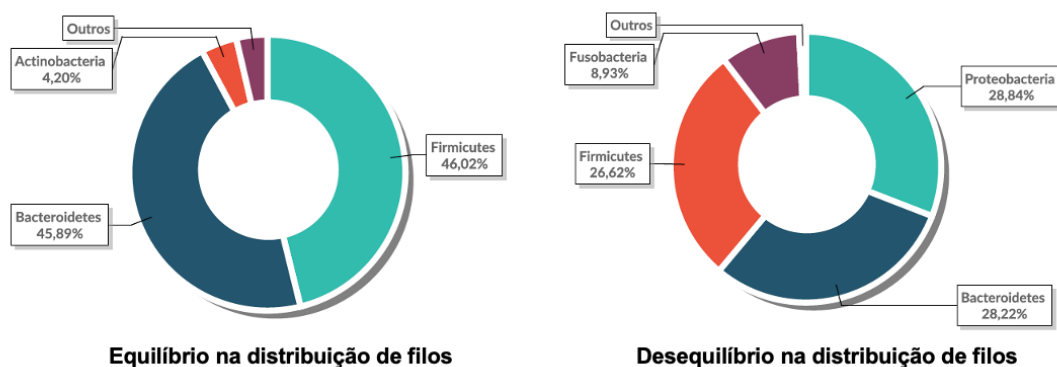
Em situações de equilíbrio, também conhecidas como normobiose ou eubiose, microrganismos da MI são capazes de atuar na digestão e metabolismo de nutrientes, além de exercerem papel na resposta imunológica, essenciais para a manutenção da imunidade intestinal (40). Em contrapartida, na disbiose, termo utilizado para descrever desequilíbrios na composição e função da MI que possam ter efeitos desfavoráveis ao hospedeiro, esses benefícios entregues pela microbiota são perdidos e ocorre disfunção em barreira intestinal, translocação de toxinas e aumento de inflamação intestinal e sistêmica. Tais alterações indesejáveis são associadas a uma ampla variedade de doenças gastrointestinais, como DII (72).

### 2.3 MICROBIOTA INTESTINAL E DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS

Pacientes com DII apresentam alterações na composição e função da microbiota intestinal. Nesta população, desequilíbrios na MI se apresentam com redução na diversidade, mudanças na composição (aumento ou diminuição da abundância de grupos específicos) e produção de metabólitos (28, 59).

O padrão de desequilíbrio mais relatado em DII apresenta como principais características a redução da diversidade bacteriana, diminuição da abundância de microrganismos do filo *Firmicutes* e *Bacteroidetes* e enriquecimento dos filos *Proteobacteria* e *Fusobacteria* (28, 73, 74). O filo *Proteobacteria*, em especial, tem grande importância no prognóstico dos pacientes com DII, uma vez que o aumento da sua abundância compromete a capacidade de manter uma comunidade microbiana intestinal equilibrada e é marcador potencial para atividade de doença (74). Na figura 1, é possível observar diferenças na composição da microbiota intestinal em nível de filos, com situação de equilíbrio

(para paciente adulto saudável) e desequilíbrio (para paciente com doença de Crohn).



**Figura 1.** Diferenças na composição da microbiota intestinal em nível de filos, com perfil microbiano de equilíbrio (para paciente adulto saudável) e desequilíbrio (para paciente com doença de Crohn).

Fonte: Bioma4me – Casos selecionados.

Distorções em gêneros na microbiota de pacientes com DII incluem enriquecimento de gêneros bacterianos pró-inflamatórios, como *Escherichia*, *Enterobacter*, *Fusobacterium*, *Enterococcus* e *Megasphaera*, bem como redução de gêneros com características comensais, como *Roseburia*, *Faecalibacterium*, *Dorea* e *Blautia* (28, 73, 75).

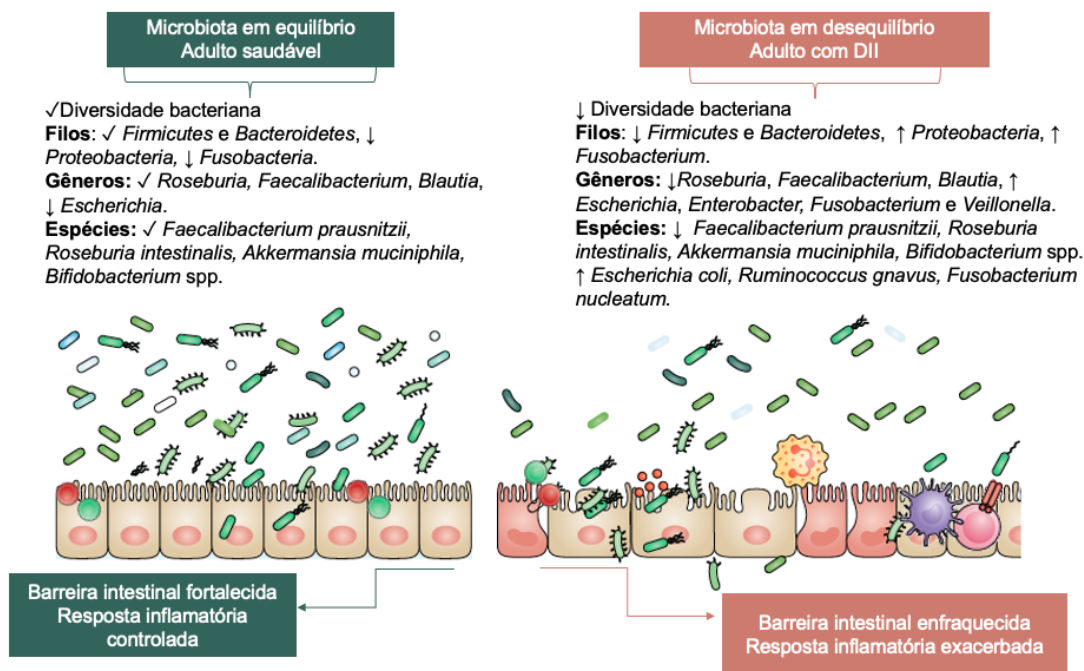
Para desequilíbrios em espécies bacterianas, destaca-se redução nas abundâncias de *Akkermansia muciniphila* e espécies produtoras de AGCC, como *Faecalibacterium prausnitzii* (23, 24, 81), além de enriquecimento de *Escherichia coli*, *Fusobacterium nucleatum*, *Ruminococcus torques* e *Ruminococcus gnavus* (76-80).

Acetato, propionato e butirato, principais AGCC da MI, são produtos da fermentação de fibras por microrganismos benéficos, com absorção e utilização por células intestinais e importante atuação na regulação da imunidade e controle da inflamação local (82). O butirato, em especial, é um AGCC de grande importância nas DII. Principal fonte de energia para os colonócitos e essencial para fortalecimento da barreira intestinal, este metabólito é reduzido em pacientes com DII em função da menor quantidade de espécies produtoras, como *Faecalibacterium prausnitzii* e *Clostridium clusters IV* e *XIVa* (30, 83). Níveis reduzidos de espécies produtoras de butirato predizem recidiva de

doença em DII, especialmente em pacientes com DC (84), enquanto níveis adequados destas espécies reduzem inflamação intestinal ao aumentarem a secreção de IL-10 e reduzir IL-12 e IFN- $\gamma$  (50).

Além da redução de bactérias produtoras de AGCC, outro mecanismo de associação entre disbiose e inflamação intestinal em DII é o enriquecimento das espécies bacterianas pró-inflamatórias *Escherichia coli* e *Fusobacterium nucleatum*, que produzem toxinas e metabólitos não desejáveis e promovem respostas inflamatórias que afetam negativamente o sistema imune (59, 85).

A figura 2 apresenta um compilado dos principais desequilíbrios na microbiota intestinal descritos na literatura científica para pacientes com doenças inflamatórias intestinais.



**Figura 2.** Resumo dos desequilíbrios na microbiota intestinal de pacientes com Doenças Inflamatórias Intestinais, comparado à composição da microbiota de pacientes saudáveis. Fonte: Elaborado pela autora com base em literatura científica na área (23, 24, 28, 50, 59, 80-85).

Uma informação importante quanto à composição da microbiota de pacientes com DII é que esta pode se modificar ao longo do curso da doença, apresentando diferentes composições em fase ativa e remissão clínica, além de diferir significativamente entre os subtipos DC e RCU. Pacientes com DC com

doença em atividade geralmente apresentam redução no filo *Firmicutes*, especialmente *Faecalibacterium prausnitzii*, e aumento na abundância de *Proteobacteria* e *Enterobacteriaceae*. Pacientes com RCU em fase ativa, por sua vez, têm a MI caracterizada por baixa diversidade bacteriana e enriquecimento do gênero *Bacteroides* (86).

A literatura é vasta quanto ao perfil da composição de MI em pacientes com DII em fase ativa, mas poucos estudos investigaram o perfil de MI na fase de remissão clínica, especialmente em associação com variáveis de inflamação e permeabilidade intestinal. Também são reduzidos os estudos que avaliaram o impacto da MI na remissão clínica em relação ao curso da doença e prognóstico.

Dentre os achados de microbiota intestinal para pacientes com DII em remissão clínica, descreve-se menor diversidade microbiana (29, 87) e redução de *Akkermansia muciniphila*, espécie marcadora de saúde intestinal, nesta população (29, 30). Na associação entre MI, inflamação e permeabilidade intestinal, identificou-se correlação positiva entre maiores níveis de *Escherichia coli* e inflamação histológica (88, 89). Ainda que preliminares, estas informações abrem oportunidades para estudos mais aprofundados do microbioma e sua relação com inflamação e permeabilidade intestinal durante a remissão clínica das DII.

#### 2.4 INFLAMAÇÃO E PERMEABILIDADE INTESTINAL EM DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS

A integridade da barreira intestinal é vital para a manutenção das condições de saúde. Esta barreira, formada por diversas camadas de proteção que envolvem a camada mucosa, o epitélio intestinal (unido pelas junções estreitas), o sistema imune intestinal (incluindo linfócitos, macrófagos e células de Panet) e a barreira microbiana, atua na proteção contra patógenos e toxinas, enquanto permite a absorção de nutrientes. Dentro desta barreira, os complexos juncionais representam a primeira linha de defesa contra patógenos, enquanto a mucosa configura um habitat protegido para a microbiota intestinal e, particularmente, para espécies bacterianas que vivem nas proximidades das células epiteliais (90, 91).

Uma barreira intestinal fortalecida é mantida por mecanismos de defesa físicos associados à superfície da mucosa, complexos juncionais, que ligam as células epiteliais adjacentes, e células do sistema imune inato e adaptativo. Na lâmina própria subjacente são encontradas células imunes intestinais, em contato com o sistema nervoso entérico, que atuam no reconhecimento de antígenos e patógenos e liberam moléculas antimicrobianas (37, 91).

Existe uma interação contínua entre células epiteliais e MI. A microbiota influencia a modulação da função de barreira, ao induzir permeabilidade paracelular fisiológica e fortalecer a camada de muco. Em função desta interação, em situações de desequilíbrio da MI também se observam alterações na função de barreira intestinal (92). Assim, a modulação da permeabilidade intestinal é parte da maquinaria fisiológica necessária para manter a homeostase da mucosa intestinal.

Defeitos na barreira intestinal são mais prevalentes na população com DII, comparado a indivíduos saudáveis, e contribuem para a translocação de metabólitos indutores de respostas imunes exacerbadas (93). Na fase ativa de doença, esta translocação de metabólitos por disfunções em barreira pode contribuir para ativação imune com consequente inflamação histológica (91).

A permeabilidade intestinal pode ser avaliada por diferentes técnicas, como testes de absorção de açúcar com sacarose, lactulose, sucralose, eritritol e razão lactulose/manitol. Todavia, nos últimos anos, métodos alternativos para avaliação da integridade de barreira intestinal vêm sendo propostos. Dentre os novos métodos destaca-se a análise dos níveis séricos e fecais de zonulina, marcador de permeabilidade inicialmente descrito por Fasano *et al.* para pacientes com doença celíaca (94).

A zonulina é uma proteína pré-haptoglobina 2, sintetizada no fígado e células epiteliais intestinais, que compõem os complexos de membrana multiproteica (também conhecidos como junções estreitas, junções apertadas ou *tight junctions*). A zonulina é uma reguladora potente das junções estreitas intestinais e, portanto, utilizada como marcador da permeabilidade intestinal. A concentração plasmática e fecal desta proteína se correlaciona positivamente com a permeabilidade, conforme relatado anteriormente em doenças autoimunes e inflamatórias (95-97).

Pacientes com DII apresentam inúmeras alterações em lâmina própria e junções estreitas. Todavia, ainda é discutido se estas alterações em barreira intestinal são causadas por defeitos epiteliais primários, levando a processos inflamatórios locais, ou se o aumento da permeabilidade é consequência da inflamação intestinal (91). Adicionalmente, para pacientes em remissão clínica, é discutido se condições de permeabilidade intestinal podem ser medidas por zonulina, até então utilizadas apenas na fase ativa de doença (37).

Na avaliação da inflamação intestinal em DII, a calprotectina fecal é biomarcador amplamente estudado e validado, devido à sua estabilidade, caráter não invasivo, boa reprodutibilidade e baixo custo quando comparado às análises endoscópicas (98). A análise da calprotectina é muito utilizada para o diagnóstico e avaliação longitudinal de DII, pois reflete bem a doença endoscópica em atividade (99).

A calprotectina é uma proteína citosólica de neutrófilos, da família S100, expressa principalmente em células da linhagem mielóide, mediadora de inflamação crônica via recrutamento de monócitos para o local inflamatório (100). A calprotectina é liberada pelos neutrófilos em resposta a processos inflamatórios e é um marcador sensível para inflamação subclínica da mucosa intestinal, fortemente correlacionada com maior atividade de doença e preditora de recidiva da doença ativa (101).

Na prática clínica, o uso da calprotectina é embasado por importantes diretrizes e proposto como biomarcador substituto para endoscopia, padrão-ouro para monitoramento de DII, por visualizar diretamente a mucosa e avaliar a presença de inflamação, mas que apresenta alto custo e pode causar desconfortos ao paciente. Neste sentido, a calprotectina se apresenta como substituto não invasivo da infiltração de neutrófilos na mucosa intestinal, utilizado no diagnóstico diferencial entre DII e síndrome do intestino irritável (SII), e acompanhamento clínico, avaliando atividade da doença, resposta terapêutica e risco para recidiva (102-105).

Estudos apontam menores níveis de calprotectina fecal em pacientes com remissão clínica e endoscópica e valores aumentados deste marcador na fase ativa de doença (106, 107), com ponto de corte superior à 200–300 µg/g, determinando maior risco de recidiva (108, 109).

## 2.5 CONSUMO ALIMENTAR, ESTADO NUTRICIONAL E MICROBIOTA INTESTINAL EM DII

Nas últimas décadas, questões nutricionais têm recebido crescente atenção nas DII, com foco no papel da alimentação e do estado nutricional do paciente, associados à patogênese da doença e seu tratamento.

Existe alto risco nutricional em pacientes com DII nas mais diferentes fases de doença (110). Portanto, recomenda-se, na fase ativa de doença, a avaliação precisa do estado nutricional, que inclui diagnóstico de sarcopenia e obesidade sarcopênica, bem como o tratamento precoce da desnutrição energético-proteica, deficiências de macronutrientes e micronutrientes.

Segundo dados recentes, a prevalência de desnutrição na população com DII é de 20% a 85%, com maior prevalência em pacientes com doença de Crohn durante internação hospitalar e pacientes idosos (111, 112). No cenário do paciente não hospitalizado, em acompanhamento ambulatorial e remissão clínica de doença, o perfil de desnutrição cede espaço para a obesidade “pandêmica” crescente nos países ocidentais: cerca de 25% dos pacientes em remissão são obesos e 30% estão com sobrepeso (113). Para a presença de sarcopenia, a estimativa de prevalência é de 52% na doença de Crohn e 37% na retocolite ulcerativa. De forma isolada ou associada às outras condições, como desnutrição, obesidade e fragilidade, a sarcopenia implica a piora na qualidade de vida, tratamento e prognóstico do paciente (114).

O comprometimento do estado nutricional nas DII tem etiologia multifatorial e inclui inadequado consumo alimentar, má absorção nutricional por perda de nutrientes entéricos, aumento do gasto de energia basal e uso de medicamentos. (110). Com população vulnerável para risco nutricional, é inegável o papel da nutrição na patogênese e manejo destas condições (115).

Na relação dieta e estado nutricional, considera-se a dieta inadequada em macronutrientes e micronutrientes um dos determinantes mais importantes da desnutrição relacionada à DII. Além disso, ingestão proteica insuficiente pode determinar sarcopenia (116). Em contrapartida, terapia nutricional adequada pode melhorar o estado nutricional, facilitar cicatrização pós-operatória, reduzir tempo de internação hospitalar e melhorar prognóstico (111).

Nos estudos com consumo alimentar em pacientes com DII, parte do papel da nutrição na patogenia, tratamento e prognóstico das doenças é atribuído à capacidade da dieta em modular, de modo desejável ou indesejável, a microbiota intestinal. Assim, o estudo do consumo alimentar associado a microbiota, inflamação e permeabilidade é de grande interesse, uma vez que a dieta é um dos fatores-chave no tratamento dessa população (70, 117).

As evidências disponíveis sugerem que a dieta influencia a composição da MI e a inflamação intestinal por meio de diferentes mecanismos, que incluem fornecimento e restrição de substratos para o meio, regulação do pH, produção de metabólitos e interações com o sistema imune local (118, 119). Da mesma forma que nutrientes impactam a composição da microbiota e inflamação, também é descrito o impacto destes sobre a permeabilidade intestinal. Quando o substrato nutricional é escasso, as bactérias intestinais usam o muco intestinal como nutriente, o que pode levar à inflamação por meio do contato próximo entre as bactérias e a camada epitelial (120).

Nutrientes participam na regulação de inflamação crônica, risco e prognóstico de DII. Como exemplo, cita-se a associação entre consumo de alimentos ultraprocessados e fontes de ômega-6 com maior risco e pior prognóstico de DII (117, 121). São fatores protetores dietéticos o consumo de alimentos fontes de ômega-3 (122) e adequada ingestão de alimentos ricos em fibras, frutas e vegetais (123).

Destaca-se que a epidemiologia nutricional tradicional examina o papel do consumo alimentar nas DII em relação a nutrientes ou alimentos específicos. Entretanto, essa abordagem tem limitações conceituais e metodológicas. As pessoas não consomem nutrientes isolados, mas, sim, combinações complexas de nutrientes que provavelmente terão efeito sinérgico. Dessa forma, os estudos epidemiológicos mais recentes estão direcionados para análises de padrões alimentares, que descrevem grupos alimentares, sua variedade, frequência e quantidade habitualmente consumida (124).

Padrões alimentares de curto e longo prazo podem modular a composição da MI. O padrão alimentar ocidental, por exemplo, em DII, é associado com inflamação da mucosa intestinal via mecanismos de alterações da MI, com redução da diversidade microbiana intestinal (125) e disfunção de barreira



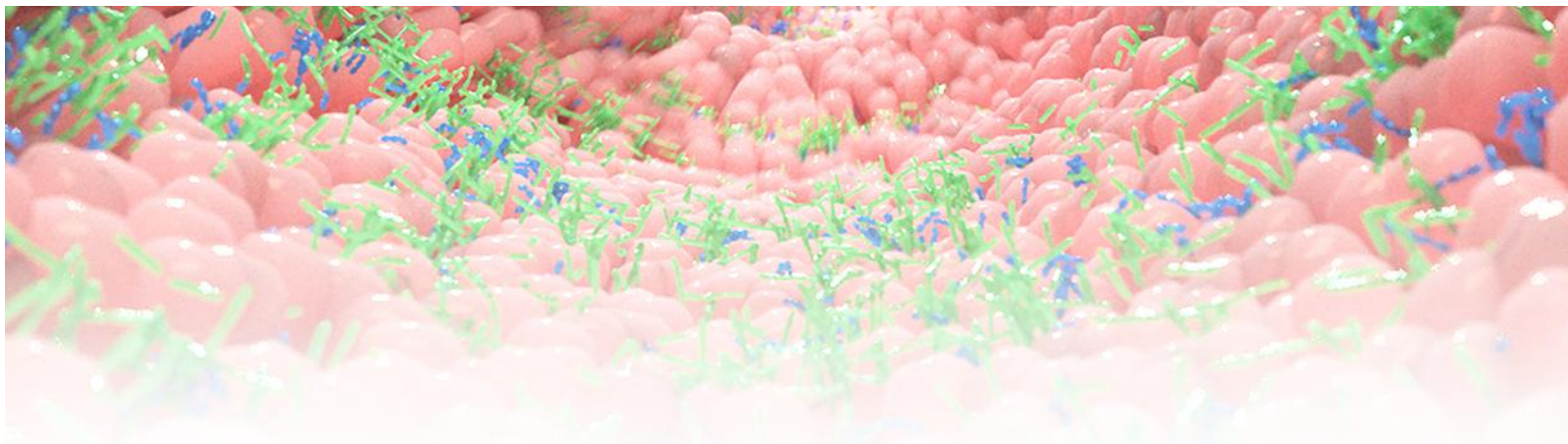
intestinal por enriquecimento de bactérias degradadoras de mucina (120). As principais características do padrão alimentar ocidental incluem dieta pobre em fibras, rica em gorduras saturadas, açúcares refinados, alimentos processados e ultraprocessados (127).

Dietas do padrão ocidental, ricas em açúcar, são capazes de promover o enriquecimento de grupos pró-inflamatórios *Sutterellaceae* e *Marinilabiliaceae* e redução de grupos com propriedades anti-inflamatórias, como *Lachnospiraceae* e *Lactobacillaceae*, produtores de butirato (128). Existe associação entre o baixo consumo de fibras em paciente em DC em remissão clínica com maior risco de recidiva clínica (129), enquanto ingestão de dieta rica em gordura se associa com aumento de *Bilophila wadsworthia* na população geral com DII e maior risco de recidiva de doença no subtipo RCU (131). No entanto, alguns componentes da dieta podem ter implicações terapêuticas e corrigir deficiências nutricionais, bem como exercer propriedades anti-inflamatórias em doentes com DII. É o caso do padrão alimentar mediterrâneo, recentemente avaliado quanto ao efeito protetor em pacientes com DC e associado com menor inflamação intestinal nesta população (117) e do padrão alimentar *plant-based*, associado a menor risco para desenvolvimento de DC (125). Em adição, certos alimentos podem apresentar componentes capazes de acentuar ou suprimir a inflamação e modificar marcadores inflamatórios (132). Estudos a respeito concentram-se na pesquisa do consumo alimentar através dos índices de qualidade e inflamação da dieta.

O índice inflamatório da dieta (do inglês: *Dietary Inflammatory Index*) consiste em um escore, com foco específico em inflamação, que determina se a dieta habitual de um indivíduo é anti-inflamatória ou pró-inflamatória (133). A determinação desse escore baseou-se na avaliação de 1.943 artigos, em que se analisou os efeitos positivos e negativos de diferentes fatores dietéticos nas concentrações séricas de seis biomarcadores inflamatórios: IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e proteína C-reativa. O compilado destas informações resultou na identificação de 45 variáveis alimentares classificadas como pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Os artigos selecionados foram pontuados da seguinte maneira: se a variável dietética aumentou (+1), diminuiu (-1) ou não teve efeito (0) sobre o estado inflamatório. Amplamente validado, este índice tem a robustez

necessária para ser utilizado em diferentes populações e distintas investigações (133).

Estudos na área identificaram o consumo de dieta pró-inflamatória em pacientes com doenças inflamatórias intestinais em fases ativa e de remissão clínica (35, 134). Todavia, ainda não foram descritas as relações entre potencial inflamatório alimentar, microbiota intestinal, calprotectina e zonulina fecal em pacientes com DII. Esta lacuna nas interações dieta-microbioma-inflamação-permeabilidade poderia auxiliar o manejo clínico destas enfermidades (28).



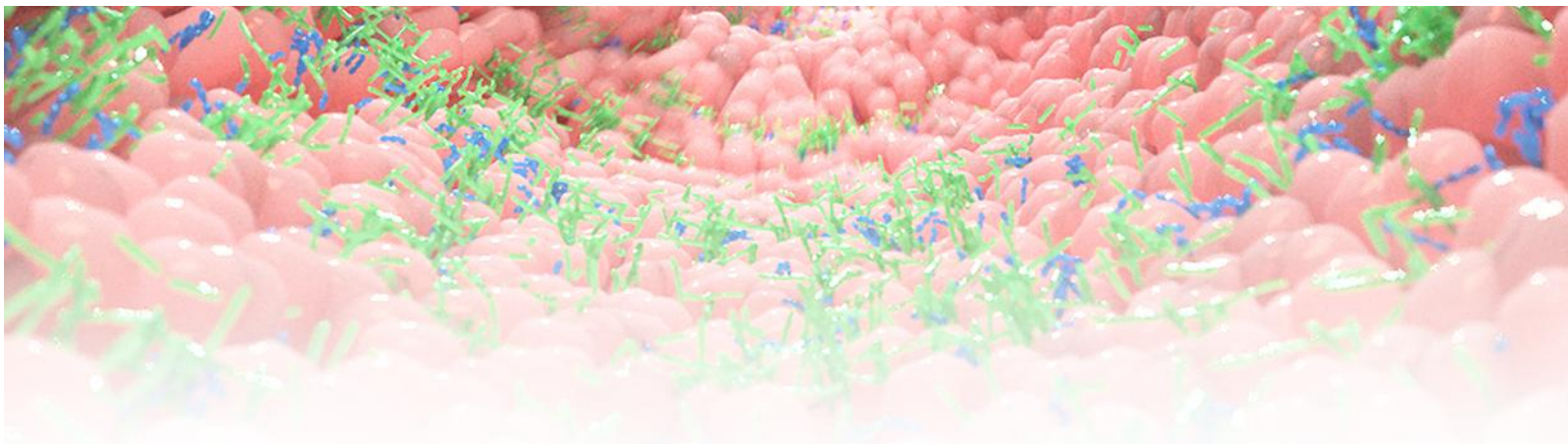
### **3. JUSTIFICATIVA**

### 3. JUSTIFICATIVA

Desequilíbrios na composição da microbiota intestinal são descritos em pacientes com DII em fase ativa da doença. Todavia, ainda são escassos os estudos nesta área para a população em remissão clínica. Estudos que correlacionem composição da MI, marcadores de inflamação e permeabilidade intestinal durante a remissão clínica também são escassos e deixam lacunas na literatura científica sobre possíveis mecanismos que expliquem a recidiva de doença.

Ao considerar que fatores nutricionais impactam a microbiota, a permeabilidade e inflamação intestinais no paciente com DII, também é oportuno avaliar de que forma o consumo alimentar, estado nutricional e marcadores bioquímicos podem interferir diretamente na MI, inflamação e permeabilidade e, assim, afetar o curso da DII.

Nossa hipótese é que existe alteração de microbiota e fatores relacionados à mucosa mesmo durante o período de remissão da doença e que tais alterações podem ser capazes de predizer recidiva de doença.



## **4. OBJETIVOS**

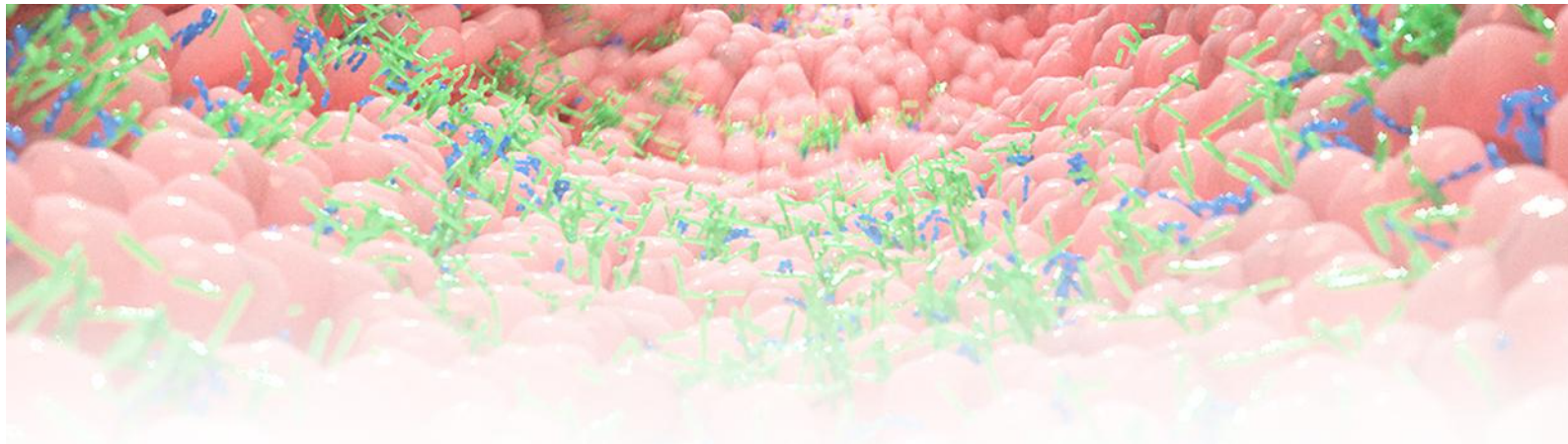
## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GERAL**

- Estabelecer associações entre microbiota intestinal, inflamação e permeabilidade intestinal em pacientes com doenças inflamatórias intestinais em remissão clínica.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Comparar o perfil de microbiota intestinal de doentes com DII com um grupo controle saudável;
- Apontar alterações na permeabilidade e inflamação intestinal, e suas associações com variáveis clínicas e nutricionais na população com DII;
- Comparar o perfil de consumo alimentar de enfermos com DII com grupo controle saudável.
- Determinar o índice inflamatório da dieta dos pacientes com DII e verificar a relação do índice inflamatório com variáveis clínicas, de microbiota, inflamação e permeabilidade intestinal.
- Identificar a relação entre variáveis de composição da microbiota intestinal, inflamação intestinal, permeabilidade intestinal e consumo alimentar com recidiva de doença.



## **5. CASUÍSTICA E MÉTODOS**

## 5. CASUÍSTICA E MÉTODOS

### 5.1 LOCAL E EXECUÇÃO DO ESTUDO

O presente estudo foi conduzido no período de Dezembro de 2018 a Janeiro de 2020 por pesquisadores do Laboratório de Nutrição e Cirurgia Metabólica do Aparelho Digestivo (LIM-35) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), em parceria com os ambulatórios de doenças inflamatórias intestinais da Divisão de Gastroenterologia e Hepatologia e da Divisão de Coloproctologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e é parte integrante do projeto de pesquisa intitulado “Estudo VALIDYS: Validação de uma ferramenta para rastreamento do risco de disbiose e caracterização da microbiota intestinal sadia e enferma”.

### 5.2 ASPECTOS ÉTICOS

O protocolo do estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Científica em Humanos do Hospital das Clínicas da FMUSP (CEP-FMUSP), sob o parecer de número 4.082.713; CAAE 01713018.0.0000.0068 (Anexo 1).

Todos os participantes do estudo foram previamente informados sobre os objetivos do projeto e tiveram a participação efetuada mediante assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice 1) pelos indivíduos que se enquadraram nos critérios de inclusão.

### 5.3 DESENHO E PROTOCOLO DO ESTUDO

O estudo apresentou delineamento prospectivo, observacional e longitudinal. Os indivíduos, provenientes do estudo VALIDYS, foram selecionados por conveniência, com uma população de 85 voluntários, sendo 40 pacientes do grupo doenças inflamatórias intestinais (20 pacientes com diagnóstico de doença de Crohn e 20 pacientes com diagnóstico de retocolite ulcerativa), sem restrição de etnia, de ambos os sexos, provenientes dos ambulatórios de Doenças Inflamatórias Intestinais da Divisão de Gastroenterologia e Hepatologia e da Divisão de Coloproctologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e 45



voluntários do grupo controle saudável, sem restrição de etnia, de ambos os sexos.

Os voluntários, dos grupos DII e controle saudável, que aceitaram participar do estudo, foram orientados a coletar, no mesmo momento, amostras de fezes para sequenciamento da MI e análise dos marcadores de inflamação e permeabilidade intestinal.

Para todos os pacientes foram aplicados três questionários de consumo alimentar, de modo a calcular o consumo alimentar habitual, bem como foram realizadas avaliações antropométricas (peso corporal e estatura) e de composição corporal, descritas no tópico 5.11 da metodologia.

Para o grupo DII, foram incluídos pacientes com diagnóstico confirmado de retocolite ulcerativa (RCU) e doença de Crohn (DC) de acordo com os critérios da *European Crohn and Colitis Organization (ECCO)* (135, 136), remissão clínica sustentada há pelo menos 1 ano e confirmada em consulta médica do último mês de acordo com o índice *Harvey-Bradshaw* para DC (com escore  $\leq 4$ ) (137) e o escore parcial de *Mayo* (pontuação de *Mayo* sem a pontuação da endoscopia que consiste no escore parcial de *Mayo*  $\leq 2$  pontos sem pontuação individual superior a 1 ponto) para RCU (138), sem cirurgia gastrointestinal prévia e adequada adesão ao tratamento clínico - com uso regular do medicamento prescrito

Foram excluídos pacientes com DII portadores de doenças associadas do trato gastrointestinal, como doença celíaca, síndrome do intestino irritável e supercrescimento bacteriano no intestino delgado (sendo a exclusão para esta condição realizada por teste respiratório e/ou prova terapêutica). Também foram excluídos pacientes com doenças hepáticas, presença de ileostomia ou colostomia, uso de antibióticos nos últimos 3 meses, gestantes, pacientes com relato de ingestão de prebióticos ou probióticos nos últimos 2 meses (o consumo de laticínios e iogurte foi permitido) e uso de laxantes. Indivíduos fazendo uso de dietas especiais (por exemplo, dieta cetogênica e jejum intermitente), alimentação enteral e extremos de ingestão geral ( $<800$  ou  $>4.000$  kcal/dia para homens;  $<500$  ou  $>3.500$  kcal/dia para mulheres) também foram excluídos do estudo.

O grupo controle (GC) saudável (n=45) foi recrutado por conveniência e composto por indivíduos saudáveis voluntários com autorrelato de ausência de condição clínica aguda e crônica, sem uso regular de medicamentos (exceto anticoncepcional), ausência de cirurgia gastrointestinal prévia, índice de massa corporal inferior a 30 kg/m<sup>2</sup>.

Foram excluídos os voluntários saudáveis com condições que comprovadamente cursem com modificação da MI, como: abuso de drogas ou álcool, déficits cognitivos, gestação e amamentação.

#### 5.4 VARIÁVEIS CLÍNICAS E SOCIODEMOGRÁFICAS

Para os pacientes dos grupos DII e GC, foi aplicado questionário semiestruturado por pesquisador treinado, para coleta das seguintes informações clínicas e demográficas: idade, sexo, etnia autodeclarada, estado civil, escolaridade, profissão/ocupação, hábito intestinal (frequência de evacuações diárias e escala de Bristol), etilismo social e tabagismo.

Exclusivamente para o grupo DII, foram coletadas do prontuário eletrônico informações clínicas quanto ao tempo de diagnóstico da doença (em anos), terapia médica anterior e atual e tratamento com esteroides no último ano.

A localização e comportamento de doença também foram colhidos do prontuário eletrônico dos pacientes com DII, com descrição médica baseada em literatura científica. A classificação de localização de doença para DC foi: L1 (confinada ao íleo distal), L2 (comprometendo exclusivamente o cólon), L3 (localização ileocolônica) ou L4 (modificador que pode ser adicionado a L1-L3 quando houver, concomitantemente, doença envolvendo o TGI superior), enquanto RCU foi classificada como E1 (proctite ulcerativa), E2 (colite do lado esquerdo) ou E3 (pancolite). Para pacientes com DC, foi coletada a classificação do comportamento da doença, subdividido em inflamatório (não estenosante e não fistulizante), estenosante e penetrante (139).

Os pacientes com DII foram acompanhados nos retornos médicos de seis meses e doze meses após a avaliação inicial. O acompanhamento ocorreu com informações colhidas em prontuário médico de modo a fornecer dados a longo prazo sobre recidiva da doença.

## 5.5 AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL

### 5.5.1. Coleta das amostras

Todos os participantes dos grupos DII e GC receberam um kit padronizado de coleta de amostras fecais do laboratório Bioma4me para autocoleta fecal em domicílio, sem necessidade de congelamento imediato.

Os participantes foram instruídos a utilizar um *swab* estéril para transferir uma pequena quantidade de amostra fecal (na quantidade similar a um grão de feijão) para o interior de microtubos plásticos de 2 mL, contendo uma solução tampão de preservação de DNA.

Foram fornecidos 3 microtubos para a coleta de amostras, sendo dois destinados para realização da caracterização da composição da microbiota intestinal pela técnica de sequenciamento do gene 16SrRNA, e um terceiro tubo, armazenado em local adequado, para necessidade eventual de repetição do sequenciamento da microbiota intestinal.

Todos os participantes foram orientados a realizar sua coleta no intervalo máximo de 24 horas antes da entrega do material fecal para os pesquisadores e para manter sua amostra em temperatura controlada (geladeira), até o momento da entrega do material.

### 5.5.2 Extração do DNA

O DNA das amostras fecais foi extraído com kit QIAamp® PowerFecal® DNA Kit, da QUIAGEN® (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com protocolo padronizado e seguindo as instruções do fabricante.

Na etapa da extração, cada amostra, com peso médio de 0,25 gramas, foi homogeneizada em tubo de 2 mL com microesferas metálicas para lisar as células do hospedeiro e microbianas e garantir a extração eficiente do DNA bacteriano.

O kit de extração de DNA bacteriano, do laboratório Bioma4me (São Paulo, SP), usa tecnologia de remoção de inibidores (TRI) para fezes. TRI é muito eficaz na remoção de substâncias inibitórias comumente encontradas em

material fecal, como polissacarídeos, heme e sais biliares que interferem na reação em cadeia polimerase.

Após obtenção do DNA genômico total, capturado em membrana sílica em formato de coluna, foram realizados os processos de lavagem e eluição, isolando-se o DNA de alta pureza para realização de sequenciamento genético da microbiota intestinal.

### 5.5.3 Preparo da biblioteca e sequenciamento 16SrRNA

Para o preparo de biblioteca, adicionou-se identificadores às amostras, de modo que cada amostra de DNA recebeu etiquetas específicas para processamento simultâneo de todas as amostras.

Neste momento, foram adicionadas as sequências específicas de *primers*, contendo regiões variáveis V3 e V4 descritos abaixo:

**16S Amplicon PCR Forward Primer = 5 '**

**TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGC  
AG**

**Primer reverso de PCR de 16S Amplicon = 5 '**

**GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATC  
TAATCC**

Os produtos foram agrupados e as bibliotecas quantificadas por reação em cadeia polimerase usando os kits *Quant-iT and Qubit DNA quantitation assays* (PICOGREEN®, Quant-iT™) e *Kapa Hifi Hotstart* (Roche®), antes de introduzir as amostras no sequenciador.

A composição da MI foi avaliada por técnica de sequenciamento genético de última geração 16S RNA ribossômico (16SrRNA), método de amplificação bem estabelecido para identificar e avaliar a abundância de bactérias em uma amostra, bem como para estudar filogenia e taxonomia de amostras de microbiomas complexos.

A seguir, as amostras de DNA bacteriano foram inseridas no sequenciador Illumina® MiSeq, que pode fornecer até 70 milhões de leituras pareadas, gerando até 15 GB de dados. Para o presente estudo, foi definido

como padrão o mínimo de 68 mil leituras por amostra, para promover a captação ótima dos microrganismos avaliados.

## 5.6 BIOINFORMÁTICA DOS DADOS DE MICROBIOTA INTESTINAL

### 5.6.1 Processamento das sequências e classificação taxonômica

As leituras de sequência bruta do gene 16SrRNA foram processadas, cortadas e agrupadas em variantes de sequência de amplicon (ASVs). Com a tabela ASV, foram atribuídas identificações taxonômicas em nível de espécie para cada ASV com DADA2, com base na correspondência exata (100% de identidade) entre ASVs e as sequências de referência no banco de dados Silva (versão 132) (140, 141).

Os iniciadores usados na amplificação foram removidos e sequências com mais do que dois erros esperados foram descartadas. As sequências remanescentes foram utilizadas para treinar um modelo de identificação e correção dos erros. As leituras diretas e reversas, já corrigidas, foram concatenadas para formação da ASVs, para a remoção de sequências quiméricas e quantificação das ASVs.

Cada ASV teve sua classificação taxonômica designada pelo pacote TAG.ME, utilizando o modelo específico para o amplicon, que corresponde à região 341F-805R (142).

### 5.6.2 Caracterização de alfa e beta diversidade da microbiota intestinal

Foram calculados os índices de Simpson, Shannon e Chao para alfa diversidade utilizando o pacote R vegan (versão 2.5-7), enquanto a beta diversidade da população foi calculada pela divergência de Jehnsen-Shannon. A análise da beta diversidade da microbiota foi realizada através do Teste Permanova, ajustado por Benjamin-Hochberg, em que o valor de R<sup>2</sup> reflete as diferenças na macroestrutura da microbiota intestinal.

### 5.6.3 Identificação de marcadores da microbiota

A tabela de quantificação de ASVs geradas a partir do processamento das sequências e classificação taxonômica, descritas no tópico 5.6.1 do presente estudo, foi filtrada pelo pacote HTSfilter no ambiente R (versão 1.30.1), que eliminou os táxons com representatividade não relevante para identificação de padrões. Este pacote utiliza o índice de dissimilaridade de Jaccard para identificar um valor de corte para o número de sequências a serem filtradas para as análises seguintes. O índice global de Jaccard aponta o valor de corte de sequências com menos de 8,34 leituras. Após a filtragem de amostras inferiores ao número de leituras supracitado, utilizou-se o pacote DESeq2 (Versão 1.30.1) para avaliar as diferenças estatisticamente significativas na abundância de grupos bacterianos, incluindo filós, gêneros e espécies nas populações em estudo (composta pelos grupos DII, e seus subgrupos RCU e DC, e GC).

## 5.7 AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO INTESTINAL

A análise da inflamação intestinal, exclusiva ao grupo DII, consistiu na quantificação da concentração de calprotectina fecal, avaliada pelo método Calprotectina Quantum Blue® Calprotectina High Range, LF-CHR pela medição seletiva de antígeno de calprotectina por ELISA (BÜHLMANN® fCAL, Suíça), no laboratório Bioma4me.

Para o procedimento de extração foi utilizado 1g de amostra de fezes. As amostras fecais foram coletadas em tubos lisos, sem qualquer adição química ou biológica no dispositivo de coleta, armazenadas a temperatura ambiente e analisadas até 24h pós-colheita.

Na análise, o extrato de amostra fecal sedimentado foi diluído em sobrenadante 1:16 com tampão de extração, homogeneizado por 5 minutos com temperatura controlada, entre 18-28°C, e posteriormente colocado em cassetes para leitura dos resultados, com tempo de varredura de 12 minutos (720 segundos).

Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g/g}$  com faixa de medição entre 20-8000  $\mu\text{g/g}$ . Os dados foram interpretados de acordo com a referência do fabricante, que determina (143):

- **Calprotectina <250  $\mu\text{g/g}$ :** Não indicativo de inflamação no trato gastrointestinal, sugestivo de provável remissão endoscópica.
- **Calprotectina >250  $\mu\text{g/g}$ :** Indicativo de doença ativa com provável atividade endoscópica e inflamação no trato gastrointestinal.

Uma vez que outros diferentes pontos de corte são descritos na literatura para calprotectina fecal (98, 144, 145) esta variável também foi avaliada de forma contínua para correlações com variáveis clínicas, dietéticas e de microbiota intestinal.

## 5.8 AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL

A avaliação da permeabilidade intestinal, realizada nos grupos DII e controle saudável, ocorreu pela medição da zonulina fecal. Para esta análise, os participantes do estudo foram orientados a coletar a amostra fecal em ambiente domiciliar e acondicionar o material em temperatura ambiente até a devolução ao nosso laboratório de pesquisa (LIM-35), respeitando tempo máximo de 24h entre a coleta e entrega ao laboratório. Em nosso laboratório de pesquisa, as amostras foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior quantificação, conforme instruções do fabricante.

As concentrações de zonulina fecal foram avaliadas por meio de ensaio imunoenzimático competitivo (ELISA, Elabscience® Biotechnology Inc, Estados Unidos), com as seguintes etapas: um marcador de zonulina foi adicionado às amostras, padrões e controles. Em seguida, alíquotas das amostras tratadas, padrões e controles foram transferidos e incubados em poços de placas de microtítulo, revestidos com anticorpos policlonais antizonulina; o antígeno alvo livre nas amostras fecais compete com o marcador de zonulina para a ligação dos anticorpos policlonais antizonulina nos poços da placa de microtitulação e os componentes não ligados vão sendo removidos por lavagens até finalizar a

reação. Ao final da reação, observou-se mudança da coloração do meio (de azul para amarelo), medida por absorvância em fotômetro.

A densidade óptica (DO), proporcional à concentração de zonulina humana, foi medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 450 nm±2nm. A concentração de zonulina fecal foi então obtida comparando a DO das amostras de fezes com a DO da curva padrão – sendo a intensidade da cor amarela inversamente proporcional à concentração de zonulina na amostra expressa em ng/mL, com sensibilidade de 0,47 ng/mL (Faixa de detecção: 0,78-50 ng/mL).

### 5.9 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA

Os dados de variáveis bioquímicas foram obtidos exclusivamente do grupo DII, colhidos do prontuário eletrônico do ICHC, com a averiguação, quando disponível, dos seguintes exames: concentrações séricas de vitamina D [25(OH)D] e proteína C-reativa (PCR).

Para o presente estudo, os níveis séricos de vitamina D foram classificados como deficientes quando inferior a 30 µg/dL, enquanto valores de PCR maiores que 5,0 mg/dL foram considerados elevados, conforme padrão de referência utilizado nos ambulatórios.

### 5.10 AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR

O consumo alimentar da população DII e grupo controle saudável foi avaliado por meio de recordatório alimentar de 24 horas (R24) (Apêndice 2) em três dias não consecutivos, incluindo dois registros em dias de semana e um registro alimentar de fim de semana, conforme preconizado por Fisberg, Marchioni e Slater (147) para estimativa do consumo alimentar habitual. Ressalta-se que nenhum participante (do grupo com DII ou grupo controle saudável) recebeu orientação nutricional prévia à coleta dos recordatórios.

Os recordatórios foram preenchidos por pesquisadores treinados em entrevista estruturada e semi-dirigida com questionamentos sobre o alimento consumido, preparações e horários das refeições (147). Na aplicação do R24,



para evitar erros nas etapas posteriores de padronização de gramaturas e cálculo de nutrientes, foi questionado aos participantes os seguintes tópicos: medidas caseiras utilizadas, registro detalhado dos ingredientes e forma de preparo; marca de alimentos industrializados; detalhes como adição de sal, açúcar, óleos e molhos, questionamento do uso de alimentos diet e light, uso de suplementos alimentares e multivitamínicos.

Os registros de consumo alimentar obtidos na aplicação dos R24 foram tabulados em planilha Excel® (Microsoft, Pacote Office, versão 2013), com conversão e padronização das medidas caseiras referidas para quantidade de alimentos em gramas.

Para a etapa de padronização e gramatura foram utilizadas informações disponíveis nas tabelas da Pesquisa de Orçamento Familiar (POF) (148) e Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TBCA) (149). Na ausência de informações nas tabelas descritas, foram elaboradas fichas técnicas de preparações (com registro detalhado do nome da preparação, ingredientes que a compõem, quantidades utilizadas, forma de preparo e valor em gramas equivalente à medida caseira relatada pelo participante ou conforme padronizado em Pinheiro *et al.* (150). Para alimentos industrializados foi consultado o rótulo do produto no site da indústria fornecedora.

Após a etapa de padronização das medidas caseiras em gramaturas, os dados das dietas foram inseridos e analisados no ambiente virtual do *software* Easy Diet® para cálculo do valor energético da dieta e conteúdo de nutrientes. O software utilizou como referência para cálculo nutricional os bancos de dados de composição de alimentos da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) (151) e do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) (152).

Após a verificação dos valores dos nutrientes obtidos pelo software EasyDiet® foi realizada pesquisa de recordatórios que apresentassem extremos de consumo alimentar (<800 ou >4.000 kcal/dia para homens; <500 ou >3.500 kcal/dia para mulheres) para necessária exclusão, conforme definido nos critérios da pesquisa. Como nenhum participante apresentou estes extremos de consumo, seguiu-se para a próxima etapa, em que os dados de nutrientes foram transferidos para planilha Excel® (Microsoft, Pacote Office, versão 2013),

convertidos para o formato csv (*comma-separated values*), e processados no programa estatístico MSM (do inglês: *Multiple Source Method*) (<https://msm.dife.de>), que estima o consumo alimentar habitual individual com base em variáveis de ajuste, variância interpessoal de um grupo, probabilidade de consumo e quantidade consumida nos dias investigados, atenuando a variância intrapessoal (153). Mais descrições deste método são apresentadas no tópico 5.12.2 da tese.

A determinação da prevalência de inadequação do consumo de micronutrientes foi estimada com base nas referências de consumo dietético diário [do inglês, *Dietary Reference Intakes (DRI)*], utilizando o parâmetro de “Necessidade Média Estimada” (ou *Estimated Average Requirement – EAR*) (154). Utilizou-se como meta para percentual de adequação o consumo de valores maiores que EAR – valor de referência que corresponde à mediana da distribuição das necessidades de um nutriente em um grupo de indivíduos do mesmo sexo e estágio de vida. Para os nutrientes que não apresentavam valores de EAR foram utilizados como parâmetro os valores de AI (*Adequate Intake*) – valor de consumo recomendável, baseado em levantamentos, determinações ou aproximações de dados experimentais, ou ainda de estimativas de ingestão de nutrientes para grupos de pessoas saudáveis. A prevalência de inadequação de cada nutriente foi determinada a partir do percentual de indivíduos, cujo consumo habitual encontrava-se inferior ao EAR ou AI adequado para sexo e faixa etária.

O índice inflamatório da dieta foi calculado individualmente utilizando os dados R24 ajustados pelo MSM, conforme indicado por Shivappa *et al.* (133). A partir dos 45 componentes dietéticos definidos no estudo base (Tabela suplementar 1 – Apêndice), foram selecionados 28 parâmetros alimentares, incluindo energia, proteína, carboidratos, gordura total, colesterol, fibra, sódio, cálcio, ferro, zinco, vitamina A, vitamina B1, vitamina C, vitamina E, vitamina B6, vitamina D, potássio, magnésio, selênio, folato, fósforo, cobre, vitamina B3, vitamina B12, manganês e cinco classes de flavonoides (flavonas, flavan-3-ol, flavonóis, flavononas e antocianidinas) para análise neste estudo. Para avaliação do consumo habitual de flavonóides utilizados no cálculo do índice inflamatório da dieta foram utilizados os valores nutricionais da tabela da USDA, específica para mensuração da quantidade de flavonóides em diferentes

alimentos (155), uma vez que esta informação não foi disponível nas tabelas utilizadas para avaliação do consumo de macro e micronutrientes (151, 152).

Foi realizada a subtração da ingestão dos componentes alimentares e dietéticos encontrados no nosso estudo com o consumo médio global obtido por Shivappa *et al.* (133). O resultado dessa subtração foi dividido pelo desvio-padrão do consumo global observado pelos autores (Tabela suplementar 1 – Apêndice), obtendo como resultado o z-escore do consumo individual do componente dietético.

Com o objetivo de diminuir o efeito do desvio à direita da distribuição de consumo da população, o z-escore foi convertido em um percentil, com base em tabela de distribuição normal padronizada. Em seguida, com a finalidade de se obter uma distribuição simétrica com valores centrados em zero e delimitados entre -1 (maximamente anti-inflamatório) e +1 (maximamente pró-inflamatório), cada percentil foi multiplicado por 2 e o valor resultante da multiplicação foi subtraído de 1. O resultado dessa subtração foi multiplicado pelo escore inflamatório do componente específico (Tabela suplementar 1 – Apêndice), resultando nos escores inflamatórios de cada componente específico.

Com a soma dos 28 escores alimentares de cada indivíduo, foi obtido o índice inflamatório individual total. Como interpretação deste índice, números negativos refletiam dietas anti-inflamatórias, enquanto números positivos refletiam dietas pró-inflamatórias.

#### 5.11 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA E COMPOSIÇÃO CORPORAL

As avaliações antropométricas e de composição corporal foram realizadas em todos os participantes do estudo (grupos DII e GC).

O exame antropométrico foi realizado no período da manhã, com os participantes em jejum para registro das seguintes variáveis:

- Peso corporal (kg): medido em balança de plataforma eletrônica (BOD POD® *Body Composition System; Life Measurement Instruments, Concord, CA, EUA*), com os sujeitos vestindo roupas leves e descalços;
- Estatura corporal (m): medida por meio de um estadiômetro (Sanny; American Medical do Brasil, São Paulo, Brasil) com o indivíduo em pé,

descalço, com calcanhares unidos, coluna ereta e braços estendidos junto ao corpo;

- Índice de massa corporal (IMC): calculado como peso corporal (kg) dividido pelo valor da altura ao quadrado ( $m^2$ ). Classificado como baixo peso ( $<18,5$   $kg/m^2$ ), peso normal ( $18,5-24,9$   $kg/m^2$ ), sobrepeso ( $25-29,9$   $kg/m^2$ ) e obesidade ( $>30$   $kg/m^2$ ), de acordo com a definição da Organização Mundial da Saúde (156).

A composição corporal foi mensurada utilizando um aparelho de bioimpedância elétrica portátil de quatro frequências (5, 50, 100, 200 kHz) (QuadScan4000; Bodystat, Douglas, Ilha de Man, Ilhas Britânicas). Nas 24 horas antecedentes à avaliação da BIA, os participantes foram orientados a evitar consumo de cafeína e a prática de atividade física.

O exame foi realizado com o participante em jejum, com a bexiga esvaziada, sem objetos metálicos no corpo, em repouso de 15 minutos na posição supina, com braços e pernas em abdução de  $30^\circ$ . Para a execução da bioimpedância foram colocados eletrodos na mão e no pé do voluntário, especificamente no calcanhar e punho do hemicorpo direito, conforme orientado no manual do fabricante, para mensurar a composição corporal. Dados referentes a sexo, idade, peso, altura e nível de atividade física foram inseridos no aparelho de bioimpedância, que estimou as medidas de composição corporal por meio da passagem de correntes elétricas imperceptíveis de 5, 50, 100 e 200 kHz.

Com esta avaliação por bioimpedância, foram obtidos valores de resistência e reactância, que permitem estimar as variáveis de massa gorda corporal e massa muscular esquelética, massa magra esquelética, água corporal total, conteúdo mineral e massa celular corporal. Para a presente tese, utilizou-se dados de massa gorda e massa muscular esquelética.

Os dados antropométricos e de composição corporal foram anotados em planilha apropriada no programa RedCap® para posterior criação de banco de dados e análises estatísticas.

## 5.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise descritiva obteve frequências (porcentagem) para variáveis categóricas e média (com desvio padrão), ou mediana (com intervalo interquartil) para variáveis contínuas. A normalidade das variáveis contínuas foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk.

As comparações entre os grupos (DII versus CG, DC versus CG, RCU versus GC e DC versus RCU) foram realizadas com o teste t de *Student* para variáveis contínuas paramétricas, e teste U de Mann-Whitney para variáveis contínuas não paramétricas. Para comparação entre dados categóricos foram utilizados os testes qui quadrado e exato de Fisher.

As análises estatísticas foram realizadas com o programa *Statistical Package for the Social Sciences for Windows* versão 23.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA), considerando nível de significância de 5%. Informações mais aprofundadas para as análises estatísticas são descritas a seguir:

#### **5.12.1 Análises de consumo alimentar**

O cálculo de consumo alimentar habitual foi realizado pelo método MSM, sigla do inglês "*Multiple Source Method*", na plataforma desenvolvida pelo Departamento de Epidemiologia do Instituto Alemão de Nutrição Humana Potsdam-Rehbrücke (DIfE)© 2008-2021 Versão 1.0.1 online (153). O método estima a probabilidade de ingestão individual de cada nutriente, seguido do cálculo da ingestão habitual individual de cada um desses nutrientes nos dias de consumo e, por fim, multiplica os valores obtidos nos passos anteriores para obter a ingestão diária habitual e reduzir as variações inter e intraindividuais.

Com a média do consumo alimentar habitual de cada participante gerada no MSM, os consumos de energia e nutrientes foram apresentados em médias e desvios-padrão ou em medianas e intervalos interquartílicos, de acordo com o sexo e a idade. Nas análises de consumo alimentar, as diferenças entre os grupos DII e GC para consumo alimentar foram testadas com o teste de Mann-Whitney.

Para as análises de índice inflamatório da dieta, os pacientes foram divididos em quartis, baseado no valor inflamatório de dieta encontrado.

As diferenças entre quartis para variáveis contínuas foram examinadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando nível de significância de 5%.

### **5.12.2 Análise de inflamação e permeabilidade intestinal**

Curvas características de operação do receptor (ROC) foram geradas para avaliar a precisão das concentrações fecais de zonulina fecal, de modo a discriminar pacientes com DII de controles saudáveis.

Os valores de sensibilidade, especificidade e área sob a curva foram utilizados para determinar a capacidade de predição deste biomarcador. O poder da curva ROC foi baseado no ponto de corte proposto por Hosmer e Lemeshow (157), que sugerem como modelos aceitáveis os que apresentarem área sob a curva acima de 0,7. Os gráficos de curva ROC foram criados usando GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

As correlações entre as variáveis contínuas de zonulina, calprotectina e PCR com variáveis clínicas e bioquímicas foram testadas pelos métodos de Spearman e Pearson.

Análise de regressão logística binária foi realizada para determinar preditores clínicos, bioquímicos e nutricionais para altas concentrações de zonulina. Para definição do ponto de corte da regressão logística binária, a zonulina fecal foi categorizada em mediana com quartis inferior e superior [25Q–75Q], sendo utilizado o percentil 75 para a análise.

### **5.12.3 Análises integradas: Microbiota, inflamação, permeabilidade e consumo alimentar.**

Para as análises de correlação com marcadores de inflamação, permeabilidade e dieta, a composição da microbiota intestinal foi comparada no nível de família, gênero, espécie e sequência bacteriana, utilizando os testes de correlação de Spearman e Pearson e os testes de associação de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

Os dados de microbiota intestinal utilizados para estas análises foram provenientes do pacote Phyloseq R, para filós, gêneros e espécies, e pacote R DESeq2, para nível de sequência bacteriana (ASV).

Nas análises de associação entre alfa diversidade, escala de Bristol e índice inflamatório da dieta, as diferenças nos índices de diversidade Chao, Simpson e Shannon foram avaliadas por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Nas análises de associação entre os quartis de inflamação da dieta e táxons bacterianos, utilizou-se o teste de Mann-Whitney com ajuste do valor de p de acordo com o procedimento de Benjamini-Hochberg.

#### **5.12.4 Análises de recidiva de doença**

Para identificar se a microbiota intestinal foi capaz de prever recidiva de doença em seis e doze meses de acompanhamento, os 40 pacientes do grupo DII foram subdivididos em dois grupos com base no status de atividade da doença (remissão clínica versus recidiva de doença).

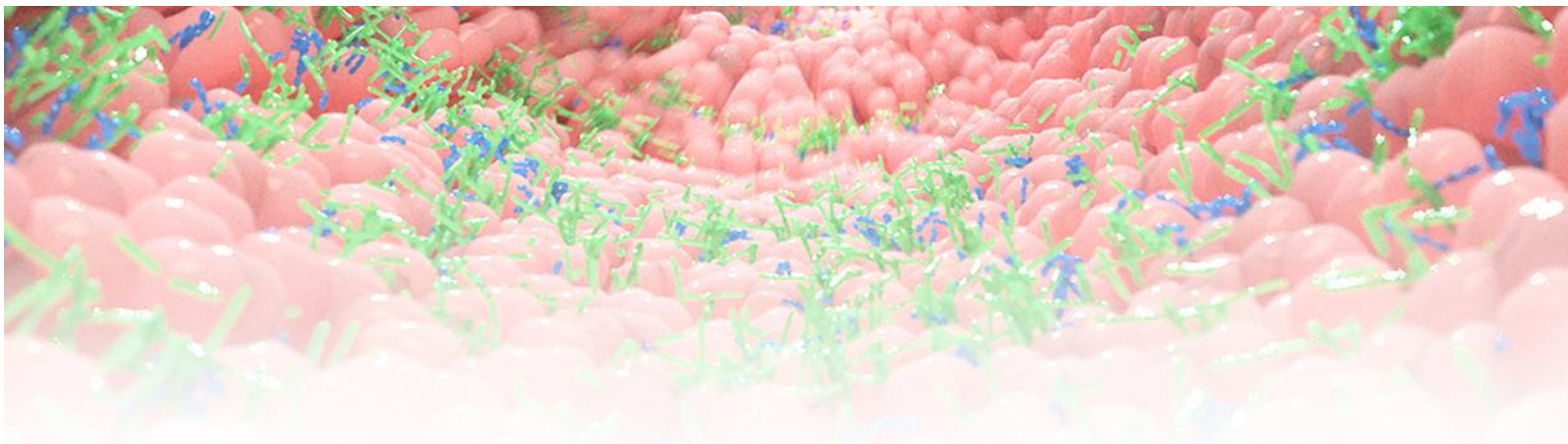
A MI dos pacientes foi comparada em nível de sequência bacteriana por meio de métodos de análise de expressão diferencial gênica pelo uso de modelos lineares generalizados binomiais negativos (pacote DESeq2 do R). As diferenças entre variantes bacterianas, bem como a diferença entre os índices de diversidade Chao, Simpson e Shannon dos pacientes que tiveram recidiva de doença versus os que mantiveram remissão clínica, foram medidas pelo teste de Mann-Whitney.

O efeito das variáveis de calprotectina, zonulina, PCR, localização da doença, vitamina D e índice inflamatório da dieta na probabilidade de recidiva de doença nos pacientes em seis e doze meses foi avaliado através de modelos de regressão logística.

Para esta regressão foram testados 22 modelos individuais que avaliaram o efeito que cada uma das variáveis tinha no status de remissão da doença. A análise de qualidade do ajuste geral desses modelos ocorreu por meio da curva de ajuste sigmóide dos dados e dos indicadores de dispersão gaussiana, Pseudo  $R^2$  por Cox e Snell, frequência de acertos em relação aos dados de referência

(acurácia) e área sob a curva característica de operação do receptor (ROC). O nível de significância adotado para esta análise foi de 5%.





## **6. RESULTADOS**

## 6. RESULTADOS

### 6.1 ANÁLISES CLÍNICAS E SOCIODEMOGRÁFICAS

A comparação das características clínicas e sociodemográficas entre os pacientes com DII e o grupo controle saudável encontra-se na **Tabela 1**.

Em comparação com controles saudáveis, os pacientes com DII exibiram maior média de idade ( $p=0,013$ ) embora a média para ambos os grupos esteja na faixa etária de adulto (média de  $38,31 \pm 15,15$  para saudáveis versus  $44,83 \pm 14,72$  para pacientes com DII).

Alterações nutricionais importantes foram observadas nos pacientes com DII. Estes, sem diferenças significativas entre os subgrupos DC e RCU, apresentaram maior IMC ( $p=0,048$  na avaliação contínua e  $p=0,03$  quando analisados categoricamente de acordo com as classificações nutricionais de desnutrição, eutrofia, sobrepeso e obesidade). A população DII também apresentou alterações em composição corporal, com maior índice de massa gorda ( $p<0,001$ ) e menor índice de massa magra ( $p<0,001$ ).

Na avaliação do padrão evacuatório, diferenças significativas foram observadas. O grupo DII apresentou maior número de evacuações diárias ( $p=0,007$ ) e maior número de indivíduos com escala de Bristol nas classificações 5 e 6 (que descreve formato de fezes com perfil diarreico e sugere trânsito intestinal acelerado) ( $p=0,022$ ).

Na avaliação da permeabilidade intestinal, medida pela concentração de zonulina fecal, observou-se que a média de zonulina foi significativamente maior em pacientes com DII comparado ao GC ( $1,20 \pm 0,19$  ng/mL vs.  $0,73 \pm 0,18$  ng/mL, respectivamente;  $p < 0,001$ ).

**Tabela 1.** Comparação de dados clínicos e sociodemográficos entre população controle saudável e pacientes com doenças inflamatórias intestinais em remissão clínica ( $n=85$ ).

Variável	GC (n = 45)	DII (n=40)	P valor
Idade (anos)	38,31 (15,15)	44,83 (14,72)	<b>0,013<sup>1</sup></b>
Etnia autodeclarada			
Caucasiano	35 (77,80%)	23 (57,00%)	0,062 <sup>2</sup>

Não-Caucasiano	10 (22,20%)	17 (43,00%)	
<b>Sexo (%)</b>			
Masculino	24 (53,30%)	16 (40,00%)	0,278 <sup>2</sup>
Feminino	21 (46,70%)	24 (60,00%)	
<b>Peso (kg)</b>	68,24 (13,54)	70,43 (14,16)	0,440 <sup>1</sup>
<b>Estatura (m)</b>	1,69 (0,09)	1,66 (0,09)	0,150 <sup>1</sup>
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	23,72 (2,88)	25,55 (4,13)	<b>0,048<sup>1</sup></b>
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>) (%)</b>			<b>0,033<sup>2</sup></b>
Desnutrição	2 (4,40%)	1 (2,50%)	
Eutrofia	25 (55,60%)	18 (45,00%)	
Sobrepeso	18 (21,20%)	14 (35,00%)	
Obesidade	0 (0,00%)	7 (17,50%)	
<b>Massa gorda (%)</b>	27,24 (7,43)	33,14 (8,15)	<b>0,001<sup>1</sup></b>
<b>Massa magra (%)</b>	72,76 (7,44)	66,86 (8,15)	<b>0,001<sup>1</sup></b>
<b>Escala de Bristol</b>			
1-2	3 (6,80%)	2 (5,00%)	
3-4	38 (86,40%)	25 (62,50%)	<b>0,022<sup>2</sup></b>
5-6	3 (6,80%)	13 (32,50%)	
<b>Frequência de evacuação diária</b>	1,2 (0,66)	1,8 (1,00)	<b>0,007<sup>3</sup></b>
<b>Tabagismo (%)</b>			
Não	45 (00,00%)	37 (92,50%)	0,100 <sup>3</sup>
Sim	0 (0,00%)	3 (7,50%)	
<b>Etilismo social (%)</b>			
Não	9 (20,00%)	26 (65,00%)	<b>&lt;0,001<sup>2</sup></b>
Sim	36 (80,00%)	14 (35,00%)	
<b>Zonulina fecal (ng/mL)</b>	0,74 (0,18)	1,20 (0,20)	<b>&lt;0,001<sup>1</sup></b>

Legenda: GC: grupo controle; DII: doenças inflamatórias intestinais; IMC: Índice de massa corporal. Análises: <sup>1</sup>Teste de Mann-Whitney; <sup>2</sup>Teste qui-quadrado, <sup>3</sup>Teste exato de Fisher.

A **tabela 2** compara as características clínicas e sociodemográficas entre os pacientes com DII, subdivididos entre retocolite ulcerativa e doença de Crohn. Para estas análises, não foram observadas diferenças significativas para as variáveis e clínicas demográficas pesquisadas, o que mostra homogeneidade entre os dois grupos.

Também não foram encontradas diferenças significativas para a localização de doença em RCU, localização e comportamento de doença em DC. Em pacientes com RCU, as localizações mais prevalentes foram E2 (colite) e E3 (pancolite), enquanto em DC, a localização mais comum foi L2 (colônica), seguida por L1 (íleo terminal) e L3 (íleocolônica).

A maioria dos pacientes exibiu níveis séricos de 25(OH)D deficientes (<30ng/mL), sem diferença significativa entre DC e RCU (respectivamente, 81,2% versus 55,5%; p=0,120).

Na avaliação de variáveis de inflamação, chama a atenção que 40,0% dos pacientes apresentaram níveis de calprotectina fecal superiores a 250 µg/g. Maiores níveis de calprotectina fecal foram encontrados no grupo DC, mas sem significância estatística (p=0,123). Da mesma forma, pacientes com DC apresentaram maiores níveis de proteína C-reativa comparado ao grupo RCU [5,01(8,69) em DC versus 3,58(4,12)], porém sem diferença estatística (p=0,8151). Valores individuais de zonulina fecal e calprotectina fecal são apresentadas no apêndice deste trabalho (Apêndice – Tabela suplementar 2).

Dentro do subgrupo de pacientes com DII, foram realizadas correlações entre parâmetros clínicos e de estado nutricional (Apêndice – Tabela suplementar 3). Como resultados, idade mais avançada e maior tempo de doença se correlacionaram negativamente com percentual de massa magra (rho=-0,372, p=0,018 e rho=-0,404, p=0,09; respectivamente) e positivamente com percentual de massa gorda (rho=0,372, p=0,018 e rho=0,404, p=0,09; respectivamente).

**Tabela 2.** Comparação de dados clínicos e sociodemográficos entre pacientes com doença de Crohn e retocolite ulcerativa (Doenças Inflamatórias Intestinais) em remissão clínica (n=40).

Variável	DC (n=20)	RCU (n=20)	P valor
<b>Idade (anos)</b>	43,15 (14,43)	46,50 (15,16)	0,607 <sup>1</sup>
<b>Etnia autodeclarada</b>			
Caucasiano	11 (55,00%)	12 (60,00%)	0,828 <sup>3</sup>
Não-Caucasiano	9 (45,00%)	8 (40,00%)	
<b>Sexo (%)</b>			
Masculino	9 (45,00%)	7 (35,00%)	0,519 <sup>3</sup>
Feminino	11 (55,00%)	13 (65,00%)	
<b>Peso (kg)</b>	69,80 (12,04)	71,08 (16,30)	1,000 <sup>1</sup>
<b>Estatura (m)</b>	1,66 (0,07)	1,65 (0,10)	0,665 <sup>1</sup>
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	25,17 (3,96)	25,93 (4,36)	0,735 <sup>1</sup>
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>) (%)</b>			
Desnutrição	1 (5,00%)	0 (0,00%)	0,699 <sup>2</sup>
Eutrofia	9 (45,00%)	9 (45,00%)	
Sobrepeso	6 (30,00%)	8 (40,00%)	
Obesidade	4 (20,00%)	3 (15,00%)	
<b>Massa gorda (%)</b>	32,95 (8,10)	33,34 (8,40)	0,829 <sup>1</sup>
<b>Massa magra (%)</b>	67,06 (8,10)	66,66 (8,40)	0,829 <sup>1</sup>

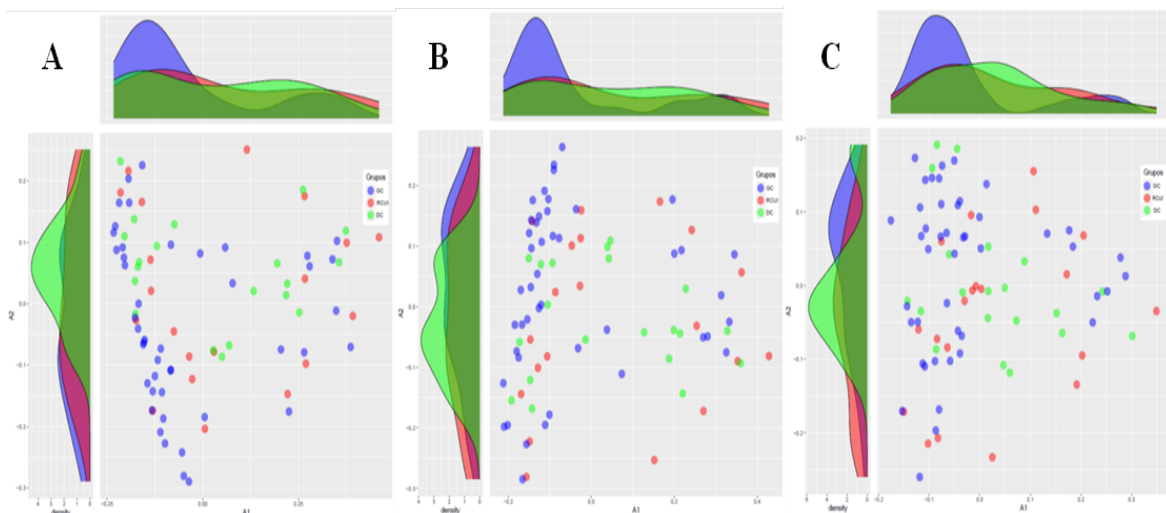
<b>Escala de Bristol</b>			
1-2	1 (5,00%)	1 (5,00%)	
3-4	12 (60,00%)	13 (65,00%)	0,924 <sup>3</sup>
5-6	7 (35,00%)	6 (30,00%)	
<b>Frequência de evacuação diária</b>	1,75 (0,78)	1,85 (1,34)	0,737 <sup>1</sup>
<b>Tabagismo (%)</b>			
Não	20 (100,00%)	17 (85,00%)	0,231 <sup>3</sup>
Sim	0 (0,00%)	3 (15,00%)	
<b>Etilismo social (%)</b>			
Não	13 (65,00%)	13 (65,00%)	1,000 <sup>2</sup>
Sim	7 (35,00%)	7 (35,00%)	
<b>Tempo de doença (anos)</b>	11,3 (9,13)	12,6 (7,12)	0,379 <sup>1</sup>
<b>Localização de doença</b>			-
Proctite (E1)	-	2 (5%)	
Colite (E2)	-	13 (32,5%)	
Pancolite (E3)	-	4 (10%)	
Íleo terminal (L1)	5 (12,5%)	-	
Colônica (L2)	8 (20%)	-	
Ileocolônica (L3)	5 (12,5%)	-	
Não classificado	3 (7,50%)	-	
<b>Comportamento de doença*</b>			-
Inflamatório		14 (70%)	
Estenosante/ Fistulizante		6 (30%)	
<b>Medicação em uso, n (%)</b>			0,073 <sup>3</sup>
Aminosalicilatos	3 (15,00%)	9 (45,00%)	
Imunossupressor	5 (25,00%)	2 (10,00%)	
Biológicos	2 (10,00%)	5 (25,00%)	
Sem tratamento	1 (5,00%)	1 (5,00%)	
<b>Zonulina fecal (ng/mL)</b>	1,26 (0,21)	1,14 (0,15)	0,120 <sup>1</sup>
<b>Calprotectina fecal(µg/g)</b>	424,8 (362,68)	257,4 (291,05)	0,123 <sup>1</sup>
<b>Proteína C-reativa (mg/L)</b>	5,01 (8,69)	3,58 (4,12)	0,815 <sup>1</sup>
<b>Vitamina D sérica (ng/mL)#</b>	24,16 (8,22)	29,48 (10,52)	0,120 <sup>1</sup>

Legenda: DC: doença de Crohn; RCU: retocolite ulcerativa; IMC: Índice de massa corporal. \*Exclusivo para pacientes com doença de Crohn; #Análise com 34 pacientes. Análises: <sup>1</sup>Teste de Mann-Whitney; <sup>2</sup>Teste qui-quadrado, <sup>3</sup>Teste exato de Fisher.

## 6.2 MICROBIOTA INTESTINAL

A análise da macroestrutura da MI (beta diversidade), com a comparação dos grupos DII versus DC e RCU é apresentada na **figura 03**, com a análise de coordenadas principais calculada com base na distância de Jaccard, enquanto a análise da beta diversidade entre grupos para ASV (variantes de sequência de Amplicon) é apresentada na **tabela 3**.

No geral, os resultados destacaram a composição da MI, do GC e grupo DII bastante heterogênea, sem agrupamento relevante, o que reflete ausência de diferença na beta diversidade da macroestrutura. Para estas análises, destaca-se como única significância estatística a diferença entre os grupos DC e GC, com 2,40% de diferença na macroestrutura da população bacteriana [Teste de Permanova; DC vs GC: R2: 0,024; p valor ajustado 0,024].



**Figura 3.** Análise de componentes principais da macroestrutura da microbiota intestinal para (A) Gênero; (B) Espécie e (C) ASV bacteriano, baseado no índice de Jensen-Shannon, comparando GC versus DC e RCU para identificação de beta diversidade e diferenças na macroestrutura da MI.

**Legenda:** Pontos em roxo indicam o grupo controle (n=45), pontos em vermelho o grupo retocolite ulcerativa (n=20) e pontos em verde indicam o grupo doença de Crohn (n=20).

**Tabela 3.** Análise da beta diversidade da microbiota, baseada nas diferenças entre ASV, comparando grupos controle saudável e doenças inflamatórias intestinais (n=85).

Comparação entre grupos	R2	P valor	P valor ajustado
RCU vs. DC	0,028252219	0,238	0,714
RCU vs. Grupo controle	0,022020957	0,024	0,072
DC vs. Grupo controle	0,024067688	0,008	<b>0,024*</b>

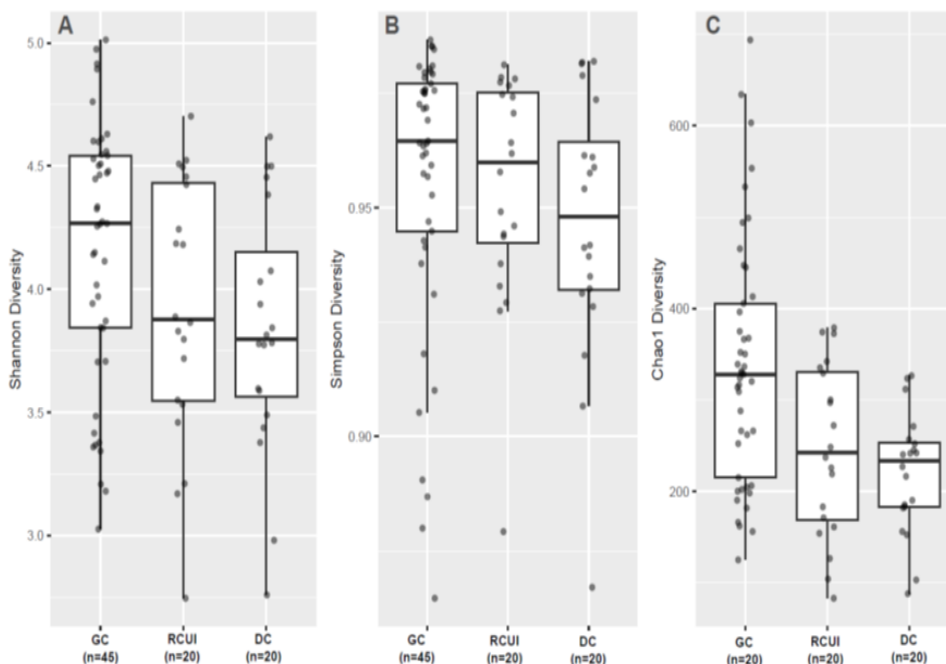
Legenda: ASV: variantes de sequência de Amplicon. GC: grupo controle; DII: Doença Inflamatória Intestinal; RCU: retocolite Ulcerativa; DC: doença de Crohn Análises: \*Teste Permanova ajustado por Benjamin- Hochberg, em que o valor de R2 reflete as diferenças na macroestrutura da microbiota intestinal.

Diferenças na alfa diversidade entre os grupos controle, DC e RCU foram medidas pela distribuição dos índices Chao, Simpson e Shannon de cada grupo e são apresentadas na **figura 4 e tabela 4**.

Os pacientes com DII apresentaram significativamente menor índice Shannon e Chao (respectivamente  $p=0,009$  e  $p<0,001$ ), comparado ao GC. Todavia, para o índice Simpson, não encontramos diferenças estatísticas entre as populações ( $p=0,06$ ).

Na comparação entre grupo controle saudável e subtipos de DII, os pacientes do grupo RCU apresentaram significativa redução para o índice Chao ( $p=0,008$ ), mas não foram encontradas diferenças significativas para o índice Shannon e Simpson ( $p=0,055$  e  $p=0,19$ ; respectivamente), enquanto o grupo DC apresentou significativamente menor diversidade para os índices de Shannon ( $p=0,015$ ) e Chao ( $p<0,01$ ).

Ao comparar os grupos DC e RCU, não foram verificadas diferenças para a alfa diversidade da microbiota segundo os Índices Shannon ( $p=0,27$ ), Simpson ( $p=0,20$ ) e Chao ( $p=0,18$ ).



**Figura 4.** Comparação da alfa diversidade bacteriana, representada por (A) Índice de Shannon, (B) Índice de Simpson e (C) Índice Chao, do grupo controle (GC) (n=45) versus grupo retocolite ulcerativa (RCU) (n=20) e grupo doença de Crohn (DC) (n=20). Cada ponto na figura corresponde a diversidade de um paciente. Os

*bigodes indicam 1,5 vezes o intervalo interquartil acima do p75 e abaixo do p25. Pontos fora dos bigodes indicam outliers.*

**Tabela 4.** Análise da alfa diversidade da microbiota, com análise dos índices Shannon, Simpson e Chao, comparando grupos controle saudável e pacientes com doenças inflamatórias intestinais (n=85).

Índice avaliado	Comparação entre grupos	95% IC	p valor
<b>Shannon</b>	GC versus RCU	0,22 a -0,01	0,06
	GC versus DC	0,37 a 0,07	<b>0,02*</b>
	GC versus DII	0,29 a 0,07	<b>0,01*</b>
	RCU versus DC	0,07 a -0,20	0,27
<b>Simpson</b>	GC versus RCU	0,00 a 0,00	0,20
	GC versus DC	0,01 a 0,00	0,06
	GC versus DII	0,01 a 0,00	0,06
	RCU versus. DC	0,01 a 0,00	0,21
<b>Chao</b>	GC versus RCU	79,22 a 27,13	<b>0,01*</b>
	GC versus DC	101,40 a 61,00	<b>0,00*</b>
	GC versus DII	92,77 a 52,00	<b>0,00*</b>
	RCU versus DC	28,95 a -22,00	0,19

Legenda: GC: grupo controle; IC: intervalo de confiança; DII: doença inflamatória intestinal; versus; RCU: retocolite ulcerativa; DC: doença de Crohn. Análises: \*Teste de Wilcoxon para comparação entre grupos.

A comparação da abundância relativa média (táxons) entre os grupos DII, e seus subgrupos DC e RCU, e GC para o nível de filo, são apresentadas na figura e na tabela 5.

Para análises de filo, em comparação com o GC, o grupo DII apresentou maior abundância de *Actinobacteria* e *Fusobacteria* (Figura 5A), o grupo DC apresentou maior abundância de *Actinobacteria* e *Proteobacteria* (Figura 5B) e o grupo RCU, maior abundância de *Actinobacteria* (Figura 5C).

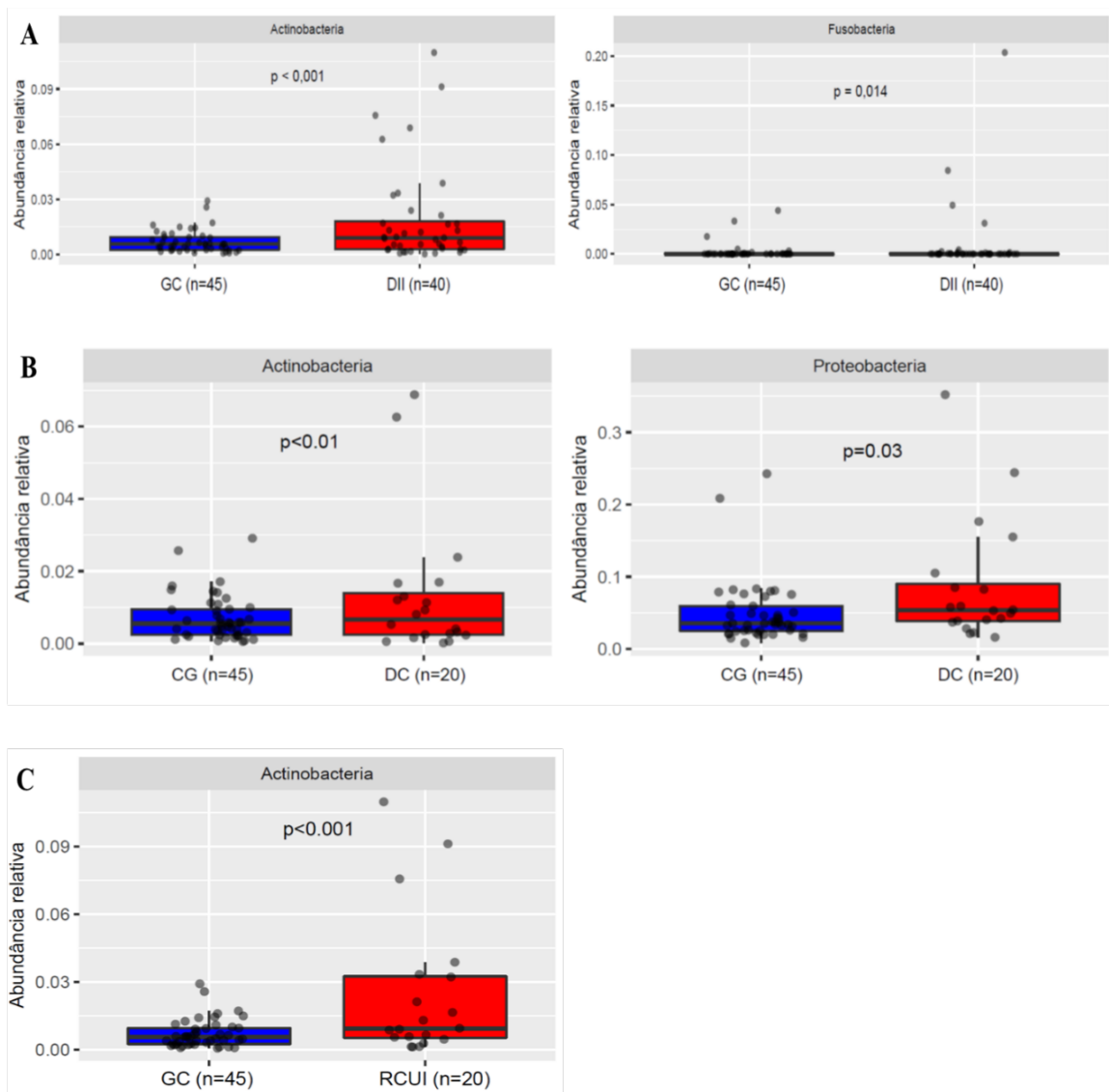
A análise da MI não mostrou mudanças significativas na abundância dos filios bacterianos mais representativos da microbiota intestinal, *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, entre os grupos DII e GC.

Nas análises de abundância diferencial entre os filios (Tabela 5), chama atenção a abundância 3 vezes maior do filo *Fusobacteria* (pró-inflamatório), no



grupo doenças inflamatórias intestinais ( $\log_2 Fc$  3,63,  $p=0,01$ ), comparado à população saudável.

Ao comparar o grupo controle saudável com os subgrupos DC e RCU, de forma isolada, os resultados apontam maior abundância de *Actinobacteria* nas duas populações, com o grupo RCU apresentando quantidades 2 vezes maior para a abundância deste filo ( $\log_2 Fc$  2,19,  $p<0,01$ ), ao comparar com o grupo controle.



**Figura 5.** Comparação da abundância relativa para análise de filós com significância estatística ( $p<0,05$ ) entre grupos: (A) grupo controle (n=45) versus doenças inflamatórias intestinais (n=40); (B) grupo controle (n=45) versus doença de Crohn (n=20) e (C) grupo controle (n=45) versus retocolite ulcerativa (n=20).

**Tabela 5.** Análise da quantidade diferencial de filos bacterianas entre grupo controle saudável e grupo doenças inflamatórias intestinais (n=85)

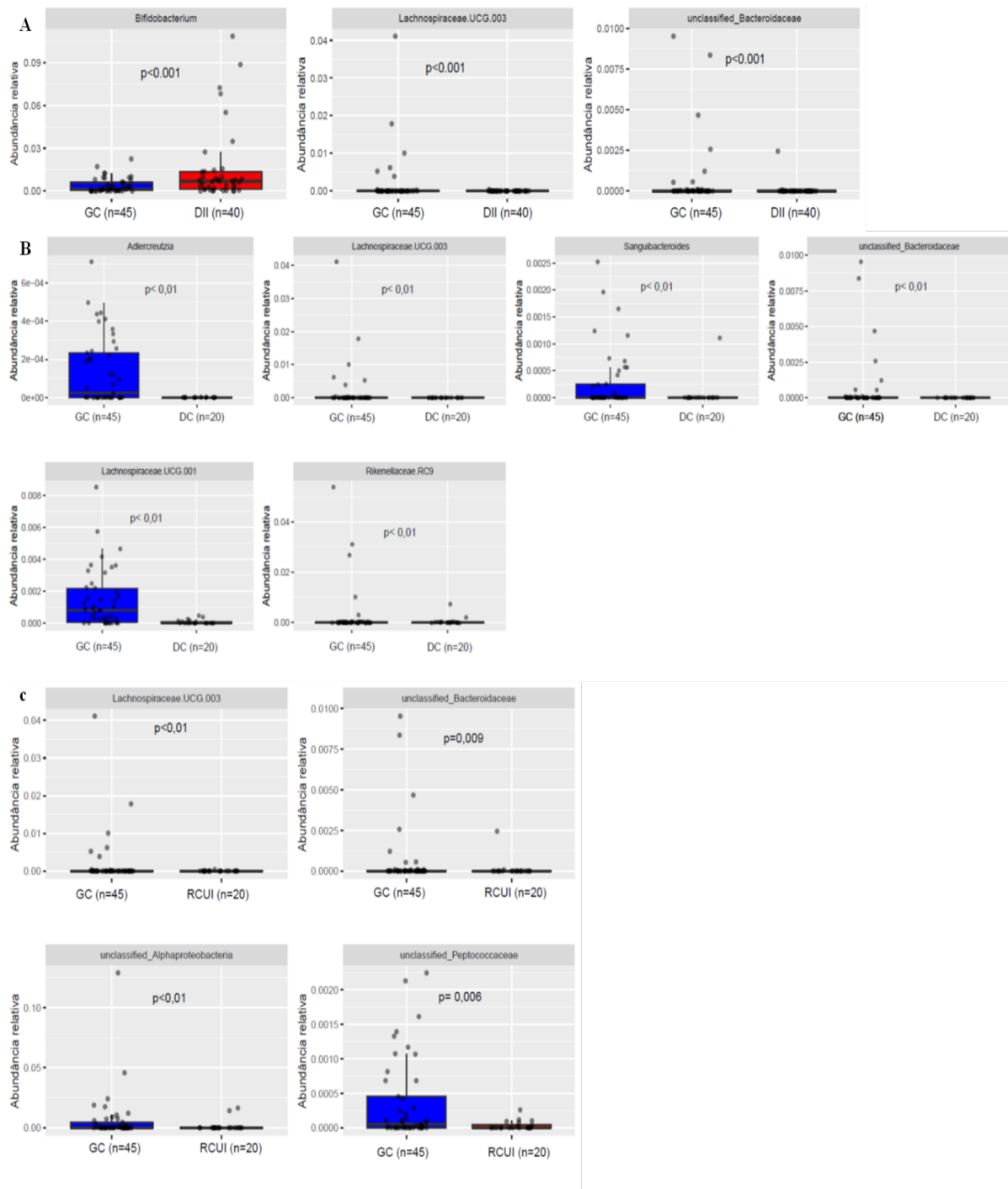
<b>Comparação entre grupos</b>	<b>log2Fc</b>	<b>P valor</b>	<b>P valor ajustado</b>
<b>DII vs. GC</b>			
<i>Actinobacteria</i>	1,93	<0,001	<b>&lt;0,001</b>
<i>Fusobacteria</i>	3,63	0,002	<b>0,01</b>
<b>DC vs. GC</b>			
<i>Actinobacteria</i>	1,60	<0,001	<b>&lt;0,001</b>
<i>Proteobacteria</i>	1,01	<0,001	<b>0,03</b>
<b>RCU vs. GC</b>			
<i>Actinobacteria</i>	2,19	<0,001	<b>&lt;0,001</b>
<b>RCU vs. DC</b>			
<i>Proteobacteria</i>	-1,57	<0,001	<b>&lt;0,001</b>
<i>Synergistetes</i>	-5,37	<0,001	<b>0,01</b>

Legenda: GC: grupo controle; DII: doenças inflamatórias intestinais; RCU: retocolite ulcerativa; DC: doença de Crohn; Fc: *Fold Change*. As mudanças entre grupos são relatadas como alterações de log2Fc.

Nas análises das abundâncias de famílias e gêneros entre grupos, foram identificados 24 grupos diferencialmente abundantes na MI dos grupos DII, ao comparar com o GC. Os gêneros *Bifidobacterium*, *Fusobacterium*, *Megasphaera* e *Dialister* foram significativamente enriquecidos em DII, enquanto as famílias *Lachnospiraceae* e *Bacteroidaceae* (Figura 6A) foram reduzidas nessa população.

Na análise de quantidade diferencial entre gêneros (tabela 6), a microbiota de pacientes com DII foi abundante nos grupos reconhecidamente pró-inflamatórios *Escherichia-Shigella* (log2Fc 890,62, p=0,04), *Fusobacterium* (log2Fc 131,02, p=0,02), *Dialister* (log2Fc 1461,18, p=0,01) e *Megasphaera* (log2Fc 696,59, p=0,01). Por outro lado, *Lachnospiraceae* UCG-001, família produtora de butirato, apresentou-se reduzida na população com DII, quando comparada ao grupo controle saudável (log2Fc -102,85, p=0,02).

Gêneros pertencentes à família *Lachnospiraceae* também se apresentaram reduzidos quando se comparou grupo controle com subgrupos da DII. Na DC, por exemplo, *Lachnospiraceae* UCG-001 foi 4 vezes menor que na população saudável (log2Fc -4,08, p=0,00). Da mesma forma, *Lachnospiraceae* UCG-003 estava 25 vezes menos abundante em DC (log2Fc -25,58, p=0,00).



**Figura 6.** Comparação da abundância relativa para análise de gêneros e famílias com significância estatística ( $p < 0,05$ ) entre grupos: (A) grupo controle ( $n=45$ ) versus doenças inflamatórias intestinais ( $n=40$ ); (B) grupo controle ( $n=45$ ) versus doença de Crohn ( $n=20$ ) e (C) grupo controle ( $n=45$ ) versus retocolite ulcerativa ( $n=20$ ).

**Tabela 6.** Análise da quantidade diferencial de gêneros e famílias bacterianas entre grupo controle saudável e grupo doenças inflamatórias intestinais (n=85).

<b>Comparação entre grupos</b>	<b>log2Fc</b>	<b>P valor</b>	<b>P valor ajustado</b>
<b>DII versus GC</b>			
<i>Bifidobacterium</i>	1116,18	0,59	<b>0,00</b>
<i>unclassified_Peptococcaceae</i>	20,37	0,84	<b>0,00</b>
<i>unclassified_Bacteroidaceae</i>	14,13	0,75	<b>0,00</b>
<i>Lactobacillus</i>	236,93	1,67	<b>0,00</b>
<i>Olsenella</i>	8,89	1,12	<b>0,01</b>
<i>Faecalitalea</i>	9,50	0,63	<b>0,01</b>
<i>Megasphaera</i>	696,59	0,99	<b>0,01</b>
<i>Dialister</i>	1461,18	1,02	<b>0,01</b>
<i>Erysipelatoclostridium</i>	17,47	1,06	<b>0,01</b>
<i>Bacillus</i>	4,12	0,57	<b>0,01</b>
<i>Lachnospiraceae UCG-001</i>	-102,85	0,80	<b>0,02</b>
<i>Acidaminococcus</i>	915,48	1,84	<b>0,02</b>
<i>unclassified_Coriobacteriales</i>	20,38	1,11	<b>0,02</b>
<i>Fusobacterium</i>	131,02	1,25	<b>0,02</b>
<i>Parabacteroides</i>	3376,74	0,24	<b>0,03</b>
<i>Christensenellaceae R-7 group</i>	720,09	0,66	<b>0,04</b>
<i>Erysipelotrichaceae UCG-003</i>	141,19	0,65	<b>0,04</b>
<i>unclassified_Ruminococcaceae</i>	696,80	0,39	<b>0,04</b>
<i>Escherichia-Shigella</i>	890,62	0,73	<b>0,04</b>
<i>Kluyvera</i>	4,34	0,54	<b>0,04</b>
<i>Ruminococcus torques group</i>	427,51	0,38	<b>0,05</b>
<i>unclassified_Lachnospiraceae</i>	-317,18	0,25	<b>0,05</b>
<i>Allisonella</i>	21,59	0,59	<b>0,05</b>
<i>Fournierella</i>	3,31	0,59	<b>0,05</b>
<b>DC versus GC</b>			
<i>Adlercreutzia</i>	-5,91	0,00	<b>0,00</b>
<i>Lachnospiraceae UCG-001</i>	-4,08	0,00	<b>0,00</b>
<i>Lachnospiraceae UCG-003</i>	-25,58	0,00	<b>0,00</b>
<i>Rikenellaceae RC9 gut group</i>	-23,80	0,00	<b>0,00</b>
<i>Sanguibacteroides</i>	-7,95	0,00	<b>0,00</b>
<i>Tyzzarella 4</i>	-22,01	0,00	<b>0,00</b>
<i>unclassified_Bacteroidaceae</i>	-23,69	0,00	<b>0,00</b>
<b>RCU versus GC</b>			
<i>unclassified_Peptococcaceae</i>	-2,94	0,00	<b>0,01</b>
<i>unclassified_Bacteroidaceae</i>	-0,06	0,00	<b>0,01</b>
<i>Bifidobacterium</i>	1,96	0,00	<b>0,01</b>
<b>RCU versus DC</b>			
<i>Mitsuokella</i>	23,33	0,00	<b>0,01</b>
<i>Rikenellaceae RC9 gut group</i>	21,83	0,00	<b>0,01</b>
<i>unclassified_Alphaproteobacteria</i>	-25,19	0,00	<b>0,01</b>

Legenda: GC: grupo controle; DII: doenças inflamatórias intestinais; RCU: retocolite ulcerativa; DC: doença de Crohn. As mudanças entre grupos são relatadas como alterações de log2Fc.

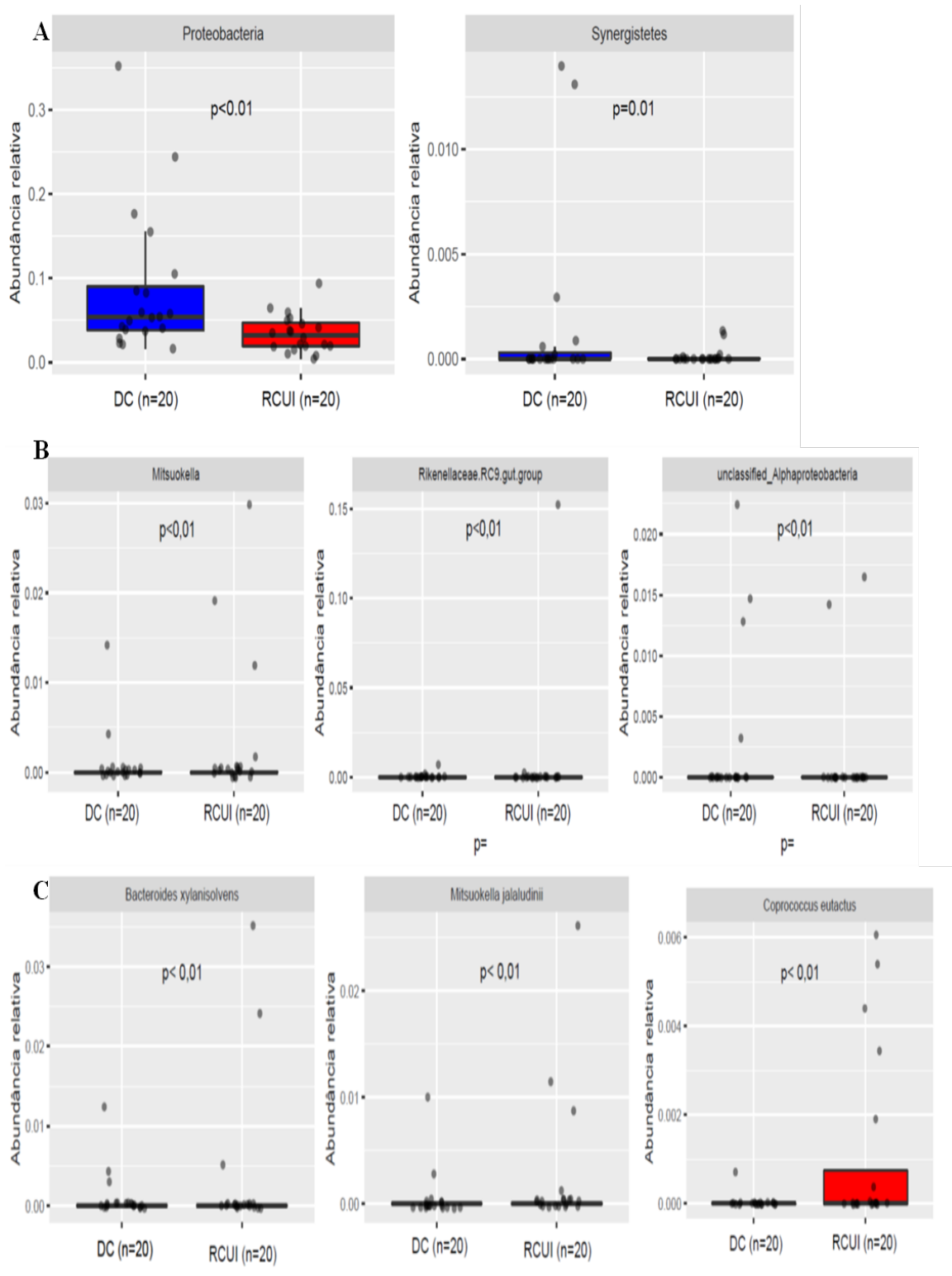
Nas análises das espécies bacterianas, *Lactobacillus mucosae* e *Ruminococcus torques* se apresentaram aumentadas em pacientes com DII no geral (log<sub>2</sub>Fc 23,85, p<0,01 e log<sub>2</sub>FC 427,51, p=0,05, respectivamente,). De modo oposto, a espécie benéfica *Coprococcus eutactus* apresentou-se reduzida na população com DC (log<sub>2</sub>Fc -23,30, p<0,01) e *Negativibacillus massiliensis* apresentou-se reduzida em RCU, quando comparado ao grupo controle (log<sub>2</sub>Fc -22,50, p<0,01) (Tabela 7).

**Tabela 7.** Análise da quantidade diferencial de espécies bacterianas entre grupo controle saudável e grupo doenças inflamatórias intestinais (n=85).

<b>Comparação entre grupos</b>	<b>log<sub>2</sub>Fc</b>	<b>P valor</b>	<b>P valor ajustado</b>
<b>DII versus GC</b>			
<i>Lactobacillus mucosae</i>	23,85	<0,001	<b>&lt;0,001</b>
<i>Ruminococcus torques</i>	427,51	0,38	<b>0,05</b>
<b>DC versus GC</b>			
<i>Adlercreutzia equolifaciens</i>	-6,06	<0,001	<b>&lt;0,001</b>
<i>Bacteroides xylanisolvens</i>	-21,96	<0,001	<b>&lt;0,001</b>
<i>Coprococcus eutactus</i>	-25,03	<0,001	<b>&lt;0,001</b>
<i>Gabonibacter massiliensis</i>	-23,30	<0,001	<b>&lt;0,001</b>
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	-23,84	<0,001	<b>&lt;0,001</b>
<b>RCU versus GC</b>			
<i>Negativibacillus massiliensis</i>	-22,57	<0,001	<b>&lt;0,001</b>
<b>RCU versus DC</b>			
<i>Bacteroides xylanisolvens</i>	23,44	<0,001	<b>&lt;0,001</b>
<i>Coprococcus eutactus</i>	23,42	<0,001	<b>&lt;0,001</b>
<i>Mitsuokella jalaludinii</i>	23,91	<0,001	<b>&lt;0,001</b>

Legenda: GC: grupo controle; DII: doença inflamatória intestinal; RCU: retocolite ulcerativa; DC: doença de Crohn. As mudanças entre grupos são relatadas como alterações de log<sub>2</sub>Fc.

Na análise diferencial da composição de MI nos subtipos de DII, houve diferenças proeminentes entre DC e RCU. A abundância de *Proteobacteria*, *Alphaproteobacteria* e *Synergistetes* foi maior no grupo DC do que no grupo RCU (Figura 7A e 7B), enquanto as espécies *Bacteroides xylanisolvens* e *Coprococcus eutactus* (Figura 7C) foram significativamente enriquecidas em RCU.



**Figura 7.** Comparação da abundância relativa com significância estatística ( $p < 0,05$ ) entre os subtipos das doenças inflamatórias intestinais: doença de Crohn (DC;  $n=20$ ) e retocolite ulcerativa (RCUI;  $n=20$ ) para as análises de (A) filós, (B) famílias e (C) espécies bacterianas.

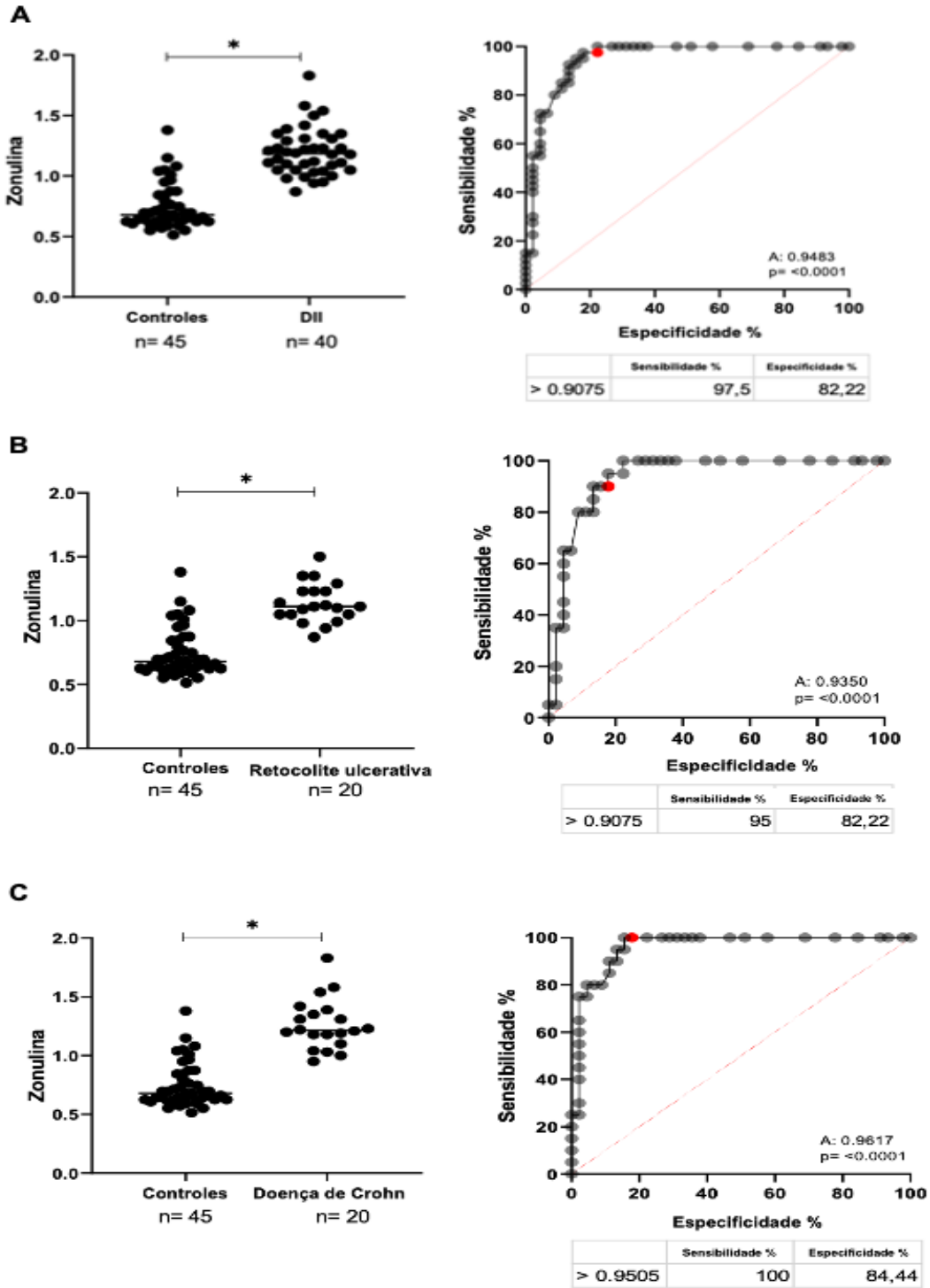
### 6.3 INFLAMAÇÃO E PERMEABILIDADE INTESTINAL

A concentração média de zonulina fecal foi significativamente maior em pacientes com DII do que na população de controles saudáveis [(1,20(0,19) ng/mL versus 0,74(0,18) ng/mL;  $p < 0,001$ ], mas não diferiu entre os subgrupos de DII [1,26 (0,21) ng/mL em DC versus 1,14 (0,15) em RCU,  $p$  valor=0,12].

Na análise da curva ROC para avaliar o poder de acurácia em discriminar pacientes com DII dos controles saudáveis, a partir das concentrações fecais de zonulina, este biomarcador mostrou excelente precisão em discriminar as duas populações (gráfico 1A), com uma área sob a curva (AUC) = 0,948, sensibilidade de 97,5% (95% IC = 87,1%–99,9%), especificidade de 82,2% (95% IC = 68,7%–90,7%) e valor de  $p < 0,010$ .

Embora o nível de precisão dos níveis fecais de zonulina para discriminar pacientes com RCU tenham sido bastante satisfatórios (Gráfico 1B), com AUC = 0,935, sensibilidade de 95,0% (95% IC = 76,4%–99,74%), especificidade de 82,2% (95% IC = 68,67%- 90,71%) e valor de  $p < 0,010$ , o mais alto nível de precisão nos níveis de zonulina fecal foi encontrado na discriminação de pacientes com DC para controles saudáveis (Gráfico 1C), com AUC = 0,962, sensibilidade de 100% (95% IC = 83,9%–100,0%), 84,44% de especificidade (95% IC = 71,2%–92,2%) e  $p < 0,010$ .

**Gráfico 1.** Curvas ROC para avaliar acurácia das concentrações de zonulina fecal no diagnóstico de doenças inflamatórias intestinais. (A) Curva discriminatória para DII versus controles saudáveis (n=85), (B) Curva discriminatória para retocolite ulcerativa versus controles saudáveis (n=45), (C) Curva discriminatória para doença de Crohn versus controles saudáveis (n=45).





As correlações entre os níveis de zonulina fecal, calprotectina fecal, PCR sérica e variáveis clínicas, nutricionais e bioquímicas em pacientes com DII estão resumidas na tabela 08. Foi identificada correlação moderada significativa negativa entre os níveis fecais de zonulina e os níveis séricos de 25 (OH) D ( $r = -0,3461$ , 95 % IC:  $-0,6126$  a  $-0,008924$ ,  $p = 0,0449$ ). Não houve diferenças significativas entre os níveis de zonulina e calprotectina fecal ( $r = 0,00526$ ;  $p = 0,974$ ), tempo de doença ( $r = -0,04815$ ;  $p = 0,768$ ) e IMC ( $r = -0,03715$ ;  $p = 0,820$ ).

Para marcadores de inflamação, foi identificada correlação significativamente positiva entre os níveis de PCR, marcador de inflamação sistêmica, e calprotectina fecal, marcador de inflamação intestinal ( $r = 0,477$ , 95 % IC:  $0,1501$  a  $0,7105$ ,  $p = 0,004$ ).

**Tabela 8.** Correlação entre concentração de zonulina fecal, calprotectina fecal e PCR sérica com variáveis clínicas, nutricionais e bioquímicas em pacientes com doenças inflamatórias intestinais (n=40).

Variáveis de correlação	Zonulina fecal		Calprotectina fecal		PCR sérica	
	rho	p valor	rho	p valor	rho	p valor
Calprotectina (µg/g)	0,005	0,974*	-	-	<b>0,477*</b>	<b>0,004</b>
Zonulina (ng/mL)	-	-	0,005	0,974*	0,05*	0,784
PCR (mg/L)	0,05*	0,784	<b>0,477*</b>	<b>0,004</b>	-	-
Vitamina D (ng/mL) <sup>1</sup>	<b>-0,346</b>	<b>0,044#</b>	0,092	0,092	0,007*	0,970
Frequência de evacuação diária (n, dia)	-0,105	0,516*	0,290	0,290	0,028*	0,875
Duração de doença (anos)	-0,048	0,768*	-0,252	-0,252	-	0,116
Peso (kg)	-0,034	0,832#	0,171	0,171	0,091*	0,615
Estatura (cm)	0,018	0,909#	0,083	0,083	0,164*	0,362
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	-0,037	0,820#	0,203	0,203	0,142*	0,429
Massa gorda (%)	-0,242	0,131#	-0,155	-0,155	-	0,452
Massa magra (%)	0,242	0,131#	0,155	0,155	0,135*	0,337

\*Correlação de Spearman #Correlação de Pearson <sup>1</sup>Análise com 34 pacientes. Mudanças significativas destacadas em negrito; valor rho mede o peso da correlação.

De acordo com o critério estabelecido para definição do ponto de corte da regressão binária (Apêndice – tabela suplementar 4), dez pacientes do grupo DII

apresentaram valores de “alta zonulina” (com valor superior a 1,31 ng/mL). No modelo de regressão, a calprotectina elevada (>250µg/g) apresentou-se como única variável preditora de níveis elevados de zonulina fecal (tabela 9).

**Tabela 9.** Associação entre variáveis clínicas e bioquímicas com níveis elevados de zonulina fecal em pacientes com doenças inflamatórias intestinais em remissão clínica (n = 40).

Variáveis	Baixos níveis de zonulina fecal ≤ P75 (n = 30)	Altos níveis de zonulina fecal > P75 (n = 10)	p valor
<b>Sexo (%)</b>			0,482*
Feminino	19 (63,30%)	5 (50,00%)	
Masculino	11(36,70%)	5 (50,00%)	
<b>Idade (anos)</b>	44,030	47,200	0,581#
<b>Etnia autodeclarada</b>			0,716*
Caucasiano	18 (60,00%)	5 (50,00%)	
Não-caucasiano	12 (40,00%)	5 (50,00%)	
<b>Subtipo de DII</b>			0,273*
RCU	17 (56,70%)	3 (30,00%)	
DC	13(43,30%)	7 (70,00%)	
<b>Tempo de doença (anos)</b>	11,30 (8,39)	13,90 (7,21)	0,357#
<b>Localização de doença</b>			0,080*
Proctite/Colite/Pancolite	2 (6,70%)	-	
Colite	10 (33,30%)	3 (30,00%)	
Pancolite	4 (13,30%)	-	
Íleo terminal	5 (16,70%)	-	
Colônica	3 (10,00%)	5 (50,00%)	
Ileocolônica	3 (10,00%)	2(20,00%)	
Não classificado	3(10,00%)	-	
<b>Comportamento de doença</b>			1,000*
Inflamatório	9 (69,20%)	5 (71,40%)	
Estenosante/ Fistulizante	4(30,80%)	2(28,60%)	
<b>Peso (kg)</b>	70,540 (15,34)	70,130 (10,49)	0,938#
<b>IMC (kg/m²)</b>	25,530 (4,41)	25,613 (30,30)	0,951#
<b>IMC (kg/m²)</b>			0,730*
Eutrofia	13 (43,30%)	5 (50,00%)	
Sobrepeso/obesidade	17 (56,7%)	5 (50,00%)	
<b>Massa gorda (%)</b>	34,067 (7,58)	30,370 (9,56)	0,210#
<b>Massa magra (%)</b>	65,933 (13,98)	69,630 (10,92)	0,286#
<b>Calprotectina (µg/g)</b>	313,800 (336,36)	423,000 (336,39)	0,388#
<b>Calprotectina &gt; 250 µg/g</b>	9 (30,00%)	7 (70,00%)	<b>0,050*</b>
<b>Medicação em uso</b>			0,195*
Aminossalicilatos	11 (39,29%)	1 (10,00%)	

Imunossupressores Biológicos + Imunossupressores	4(14,29%) 13 (46,43%)	3 (30,00%) 6 (60,00%)	
<b>Etilismo social, n (%)</b>	11 (36,70%)	3 (30,00%)	0,694*
<b>Atividade física (minutos/semana)</b>	34,330 (72,62)	51,000 (95,96)	0,623#
<b>Tabagismo, n (%)</b>	3 (10,00%)	-	0,560*
<b>Frequência de evacuação diária (n)</b>	1,900 (1,18)	1,500 (0,70)	0,210#
<b>Escala de Bristol (5-6)</b>	10 (41,40%)	1 (10,00%)	0,223*
<b>Níveis séricos de vitamina D (ng/mL) <sup>1</sup></b>	22,023 (13,98)	25,640 (10,92)	0,410#
<b>Deficiência de vitamina D <sup>1</sup></b>	18 (72,00%)	5 (55,56%)	0,425*

Legenda: RCU: retocolite ulcerativa, DC: doença de Crohn. <sup>1</sup>Análise realizada com 34 pacientes. Análises: \*Teste exato de Fisher #teste t-student.

### 6.3 CONSUMO ALIMENTAR

Os resultados do consumo alimentar dos pacientes com DII, para ingestão de macro e micronutrientes, comparados ao GC, são apresentados na tabela 10. Pacientes com DII apresentaram significativa redução no consumo de macronutrientes, com menor ingestão de carboidratos ( $p=0,033$ ), proteínas ( $p=0,0001$ ) e gordura total ( $p=0,005$ ).

Os pacientes com DII também apresentaram ingestão significativamente inferior dos micronutrientes cálcio, fósforo, cobre, potássio, zinco e folato, quando comparado ao GC.

**Tabela 10.** Comparação da média de consumo habitual de macronutrientes e micronutrientes entre pacientes com doenças inflamatórias intestinais (DII) e grupo controle saudável (GC) em remissão clínica (n=85).

<b>Energia/Nutriente</b>	<b>GC (n=45) Média (DP)</b>	<b>DII (n=40) Média (DP)</b>	<b>p valor</b>
Energia (kcal)	1893,53 (556,73)	1738,81 (385,21)	0,3877
Carboidratos (g)	214,91 (75,93)	232,63 (51,77)	<b>0,0330</b>
Fibra (g)	20,43 (7,35)	20,61 (7,32)	0,6127
Proteína (g)	91,41 (26,8)	70,09 (16,71)	<b>0,0001</b>
Gordura total (g)	73,33 (22,72)	59,43 (14,29)	<b>0,0055</b>
Gordura saturada (g)	25,8 (7,21)	21,13 (5,76)	<b>0,0023</b>
Gordura monossaturada (g)	21,85 (5,92)	17,31 (3,81)	<b>0,0003</b>
Gordura poli insaturada (g)	16,5 (5,95)	13,62 (4,94)	<b>0,0239</b>
Colesterol (g)	354,32 (185,47)	245,62 (69,21)	<b>0,0005</b>
Sódio (g)	3485,24 (966,67)	3099,25 (947,88)	0,0563
Cálcio (g)	696,74 (202,88)	561,23 (200,9)	<b>0,0003</b>
Ferro (g)	9,26 (2,83)	8,32 (2,06)	0,2730
Magnésio (mg)	257,08 (69,46)	218,12 (53,36)	0,0180
Selênio (µg)	23,72 (8,42)	24,83 (7,7)	0,1926
Vitamina C (mg)	136,27 (71,41)	104,63 (42,79)	0,0651
Vitamina B1 (mg)	0,97 (0,44)	0,81 (0,19)	0,0943
Vitamina B6 (mg)	0,63 (0,23)	0,72 (0,16)	<b>0,0135</b>
Fósforo (mg)	538,66 (173,94)	442,3 (137,33)	<b>0,0032</b>
Cobre (mg)	3,93 (7,22)	0,72 (0,7)	<b>0,0000</b>
Manganês, mg	0,88 (0,41)	1,17 (1,26)	0,5493
Potássio (mg)	2.502,89 (804,39)	2.017,79 (409)	<b>0,0057</b>
Zinco (mg)	10,06 (2,43)	8,39 (2,28)	<b>0,0022</b>
Vitamina B3 (mg)	5,78 (2,61)	4,81 (2,31)	0,0671
Folato (µg)	107,37 (37,92)	87,55 (28,76)	<b>0,0071</b>
Vitamina E (mg)	1,94 (0,47)	1,78 (0,61)	0,0917
Vitamina B12 (µg)	2,06 (1,19)	1,75 (0,7)	0,2469
Vitamina D (µg)	1,78 (0,88)	1,95 (0,71)	0,3009
Vitamina A (µg)	354,04 (222,19)	349,29 (249,2)	0,7181

Legenda: DP: desvio padrão; GC: grupo controle; DII: doenças inflamatórias intestinais. Análise: Wilcoxon (Mann-Whitney).

Na tabela 11, são apresentados os resultados do consumo alimentar habitual entre os subtipos da DII. Nesta análise, somente o nutriente fósforo apresentou diferença significativa no consumo [477,58 mg (106,22) em DC versus 407,03 (157,51) em RCU, p valor= 0,040).

**Tabela 11.** Comparação da média de consumo habitual de macronutrientes e micronutrientes entre pacientes com doença de Crohn (DC) e retocolite ulcerativa em remissão clínica (n=40).

<b>Energia/Nutriente</b>	<b>DC (n=40) Média (DP)</b>	<b>RCU (n=40) Média (DP)</b>	<b>p valor</b>
Energia (kcal)	1777,52 (379,04)	1700,09 (397,19)	0,512
Carboidratos (g)	240,58 (52,6)	224,68 (50,99)	0,369
Fibra (g)	20,44 (7,57)	20,78 (7,26)	0,779
Proteína (g)	70,21 (15,85)	69,98 (17,94)	0,841
Gordura total (g)	60,86 (14,15)	58 (14,65)	0,495
Gordura saturada (g)	22,1 (5,66)	20,16 (5,84)	0,327
Gordura monoinsaturada (g)	17,67 (3,98)	16,96 (3,71)	0,617
Gordura poli insaturada (g)	13,62 (5,22)	13,61 (4,78)	0,925
Colesterol (g)	226,92 (59,36)	264,33 (74,65)	0,157
Sódio (g)	3105,2 (991,45)	3093,31 (928)	0,947
Cálcio (g)	582,96 (165,34)	539,51 (233,49)	0,231
Ferro (g)	8,3 (2,07)	8,34 (2,11)	0,925
Magnésio (mg)	216,85 (54,82)	219,4 (53,25)	1,000
Selênio (µg)	27,01 (7,76)	22,66 (7,16)	0,086
Vitamina C (mg)	107,39 (42,29)	101,87 (44,2)	0,425
Vitamina B1 (mg)	0,84 (0,19)	0,79 (0,19)	0,365
Vitamina B6 (mg)	0,75 (0,17)	0,69 (0,15)	0,228
Fósforo (mg)	477,58 (106,22)	407,03 (157,51)	<b>0,040</b>
Cobre (mg)	0,93 (0,94)	0,51 (0,17)	0,070
Manganês, mg	1,39 (1,63)	0,94 (0,7)	0,298
Potássio (mg)	2020,51 (391,79)	2015,07 (435,72)	0,841
Zinco (mg)	8,36 (2,21)	8,43 (2,4)	0,914
Vitamina B3 (mg)	5,05 (2,31)	4,58 (2,34)	0,365
Folato (µg)	92,49 (29,75)	82,61 (27,59)	0,429
Vitamina E (mg)	1,93 (0,61)	1,62 (0,59)	0,144
Vitamina B12 (µg)	1,77 (0,83)	1,74 (0,56)	0,735
Vitamina D (µg)	2,12 (0,7)	1,78 (0,69)	0,140
Vitamina A (µg)	415,24 (315,16)	283,34 (137,78)	0,211

Legenda: DP: desvio padrão; DC: doença de Crohn; RCU: retocolite ulcerativa. Análise: Wilcoxon (Mann-Whitney).

Na tabela 12, são apresentadas as recomendações nutricionais diárias para macronutrientes e micronutrientes segundo as DRI, a média de ingestão dietética dos pacientes com doenças inflamatórias intestinais e a prevalência de inadequação da ingestão baseada nos parâmetros de referência para sexo e faixa etária.

Para estas variáveis, foi observado que o sexo masculino obteve prevalências de inadequação maiores que 80% para o consumo dos seguintes nutrientes: fibras, magnésio, selênio, vitamina B6, vitamina B3, folato, vitamina E, vitamina D e vitamina A.

Pacientes do sexo feminino apresentaram alta prevalência de inadequação para os nutrientes fibras, cálcio, vitamina B6, fósforo, vitamina B3 e vitamina D.

Também é importante destacar que, independente do sexo, houve 100% de inadequação no consumo diário das vitaminas B6, folato e vitamina E, bem como houve 100% de inadequação na ingestão diária de vitamina D para grupos específicos, como a faixa etária superior a 51 anos.

**Tabela 12.** Recomendações nutricionais diárias, consumo habitual de macronutrientes e micronutrientes e prevalência de inadequação de ingestão (%IN) por sexo e faixa etária em pacientes com doenças inflamatórias intestinais em remissão clínica (n=40).

Micronutriente	Feminino (n=24)			Masculino (n=16)		
	EAR	Média (DP)	%IN	EAR	Média (DP)	%IN
<b>Carboidrato(g)</b>						
19 a 70 anos ou mais	130	219,85 (46,77)	2,74	130	251,80 (54,39)	1,32
<b>Fibra (g)</b>						
19-50 anos*	25	18,75 (6,66)	82,38	38	21,76 (7,45)	98,50
51 anos ou mais*	21	20,96(8,77)	51,60	30	22,56 (6,73)	86,43
<b>Proteína (g)</b>						
19 anos ou mais	46	62,44 (14,56)	12,92	56	81,51 (12,98)	2,50
<b>Sódio (mg)</b>						
19 a 71 anos ou mais	2300	2600,29 (667,30)	32,64	2300	3487,69 (810,80)	2,80
<b>Cálcio (mg)</b>						
19 a 45 anos	800	514,24(105,43)	99,66	800	730,39 (279,89)	59,48
46 anos ou mais	1000	483,97(122,92)	100	1000	527,79 (194,71)	99,22
<b>Ferro (mg)</b>						
19 a 45 anos	8,1	7,89 (2,22)	53,59	6	9,81 (1,74)	1,46
46 anos ou mais	5	7,49 (1,55)	5,48	6	8,31 (2,22)	14,92
<b>Magnésio (µg)</b>						
19 a 30 anos	255	214,53 (68,80)	71,90	330	203,13 (62,51)	97,83
31 anos ou mais	265	209,44 (53,89)	79,67	350	238,77 (47,92)	98,98
<b>Selênio (µg)</b>						
19 a 71 anos ou mais	45	25,78 (8,72)	98,61	45	23,40 (5,79)	99,99
<b>Vitamina C (mg)</b>						
19 a 71 anos	60	108,34 (49,28)	16,35	75	99,07 (31,32)	22,36
<b>Vitamina B1</b>						

<b>(mg)</b>						
19 a 71 anos	0,9	0,75 (0,16)	81,06	0,9	0,89 (0,18)	52,39
<b>Vitamina B6</b>						
<b>(mg)</b>						
19 a 50 anos	1,1	0,77 (0,14)	98,54	1,1	0,83 (0,12)	98,12
51 anos ou mais	1,3	0,54 (0,07)	100	1,4	0,66 (0,10)	100
<b>Fósforo (mg)</b>						
19 a 71 anos	580	403,30(121,35)	92,65	580	500,80 (142,71)	70,88
<b>Cobre (mg)</b>						
19 a 71 anos	700	797,91(872,79)	45,00	700	606,87 (274,97)	62,93
<b>Manganês (mg)</b>						
19-71 anos*	1,8	1,36 (1,53)	61,03	2,3	0,87 (0,59)	99,13
<b>Zinco (mg)</b>						
19 a 71 anos	6,8	7,13 (1,48)	41,29	9,4	10,28 (1,92)	29,12
<b>Vitamina B3</b>						
19 a 71 anos	11	4,57 (2,52)	99,45	12	5,18 (1,96)	99,97
<b>Folato (µg)</b>						
19 a 71 anos	320	93,96 (28,25)	100	320	77,92 (27,58)	100
<b>Vitamina E</b>						
<b>(mg)</b>						
19 a 71 anos	12	1,82 (0,64)	100	12	1,69 (0,56)	100
<b>Vitamina B12</b>						
<b>(µg)</b>						
19 a 71 anos	2,0	1,54 (0,53)	79,95	2,0	2,06 (0,81)	22
<b>Vitamina D (µg)</b>						
19 a 50 anos	5	2,15 (0,79)	99,98	5	2,26 (0,52)	100
51 a 70 anos	10	1,49 (0,28)	100	10	1,60 (0,94)	100
<b>Vitamina A (µg)</b>						
19 a 71 anos	500	352,77(213,34)	75,49	625	344,06 (302,68)	82,19

Legenda: DP: Desvio padrão; %IN: Percentual de inadequação \*EAR: Requerimento médio estimado

Além das análises de prevalências de inadequação nutricional, foi pesquisado o potencial inflamatório da dieta habitual, através do IID, dos pacientes com doenças inflamatórias intestinais. A mediana do escore de IID nesta população foi de 2,97(0,89), indicando uma dieta pró-inflamatória. É importante destacar que todos os pacientes tiveram índice inflamatório positivo (>1,0), classificado como dieta pró-inflamatória.

A Tabela 13 mostra a associação entre IID e variáveis clínicas e inflamatórias dos pacientes com DII de acordo com os quartis (sendo o quartil 4 mais pró-inflamatório). No estudo, é possível observar que os indivíduos com pontuações IID mais altas (quartil 4) apresentaram maiores níveis de calprotectina fecal (p=0,013). Não foi encontrada associação significativa do índice inflamatório de dieta com

PCR, marcador de inflamação sistêmica, zonulina fecal, marcador e permeabilidade intestinal, e níveis séricos de vitamina D.

**Tabela 13.** Características clínicas nos diferentes quartis do índice inflamatório da dieta em pacientes com doenças inflamatórias intestinais em remissão clínica (n=40).

Variável	Quartil 1 (n = 10)	Quartil 2 (n = 10)	Quartil 4 (n = 10)	Quartil 4 (n = 10)	p valor
Idade (anos)	41,6 (14,2)	46,8 (16,2)	41,9 (14,7)	49 (14,6)	0,623
Tempo de doença(anos)	11 (7,1)	14,5 (5,8)	9,7 (9)	12,6 (10,2)	0,309
Calprotectina fecal (µg/g)	127,9 (111,5)	238,7(245,1)	406,8(405,6)	591 (338,1)	<b>0,013*</b>
Zonulina fecal (ng/mL)	1,20 (0,1)	1,2 (0,2)	1,2 (0,2)	1,3 (0,3)	0,890
Proteína C- reativa (mg/L)	3,2 (6,4)	7,6 (11,4)	3,3 (3,2)	3,3 (4,4)	0,629
Vitamina D (ng/mL) <sup>1</sup>	28 (12,8)	30,5 (9,8)	25,4 (7,8)	23,8 (8,5)	0,448
Atividade física (min/s)	11 (23,3)	36 (64,5)	65 (107)	42 (93)	0,830
Peso corporal (kg)	68,9 (15,9)	72,5 (14,8)	69,2 (9,7)	71,1 (17,2)	0,996
Massa gorda (%)	36,60 (9,2)	32 (9,8)	33,00 (8,3)	31,1 (4,4)	0,483
Massa magra (%)	63,40 (9,2)	68 (9,8)	67,00 (8,3)	68,9 (4,4)	0,483
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	25, 5 (5,5)	26 (3,3)	25,1 (3,5)	25,6 (4,4)	0,949

Legenda: IMC: Índice de massa corporal; min/s: minutos por semana; <sup>1</sup>Análise realizada com 34 pacientes. Análises: Análise de Kruskal-Wallys comparando os diferentes quartis, sendo o quartil 1 de menor inflamação de dieta e o quartil 4, de maior inflamação.

#### 6.4 ANÁLISES INTEGRADAS ENTRE MICROBIOTA INTESTINAL, INFLAMAÇÃO, PERMEABILIDADE INTESTINAL E CONSUMO ALIMENTAR.

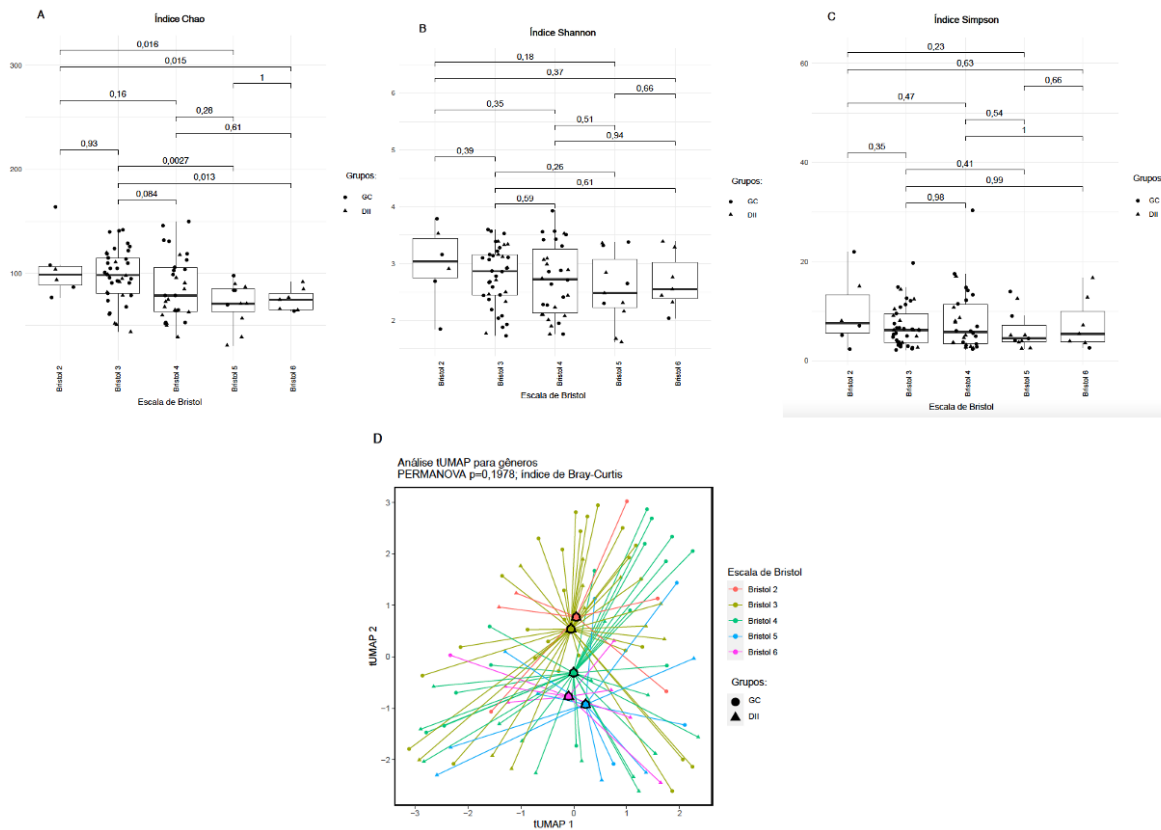
##### 6.4.1 Composição de microbiota intestinal e modificação do hábito intestinal

Diferenças na alfa e beta diversidade da microbiota intestinal de pacientes com DII com diferentes escalas de Bristol são apresentadas na figura 8.

Na análise de alfa diversidade, foi observada diferença significativa apenas no índice Chao (Figura 8A), em que pacientes com Bristol 6 apresentavam menor índice Chao, quando comparado aos com Bristol 3 (p=0,013) e Bristol 2 (p=0,015),



bem como pacientes com Bristol 5 tinham menor índice Chao que os indivíduos com Bristol 3 ( $p=0,0027$ ). Para os índices Shannon (Figura 8B) e Simpson (Figura 8C), não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. A análise da macroestrutura da MI (beta diversidade) (Figura 8D) não mostrou diferença significativa para as escalas de Bristol (Teste de Permanova;  $p= 0,197$ ).

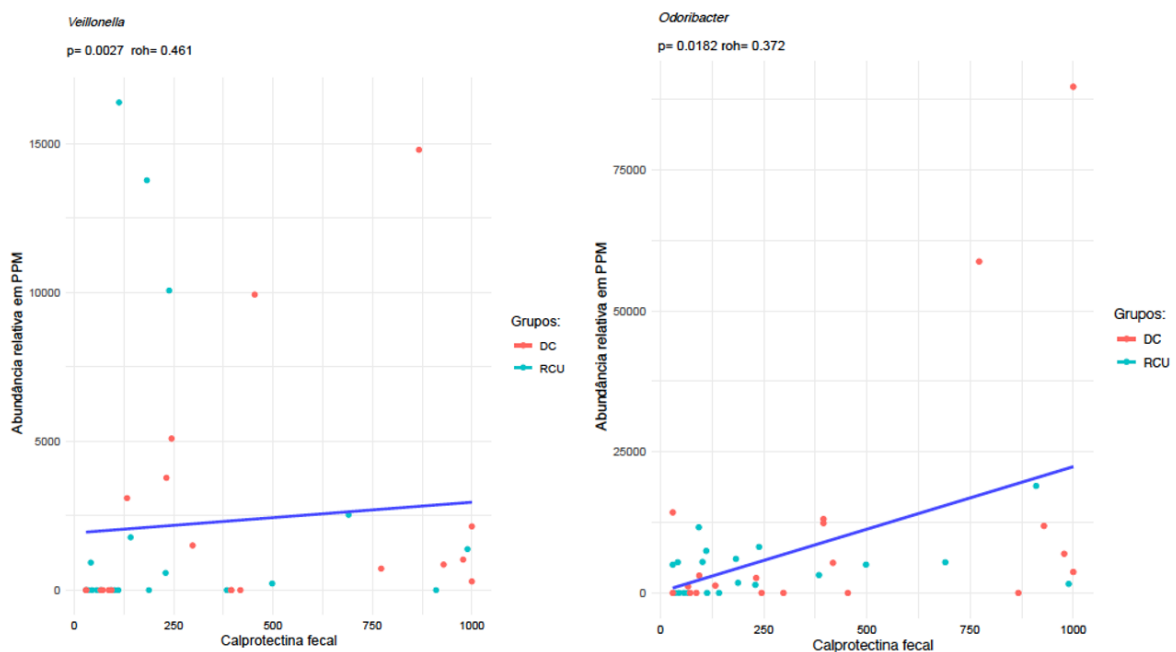


**Figura 8.** Comparação da alfa diversidade com (A) Índice Chao, (B) Índice Shannon, (C) Índice Simpson, e beta diversidade (D) em pacientes com doenças inflamatórias intestinais (n=40). Legenda: GC: grupo controle, DII: Doenças inflamatórias intestinais.

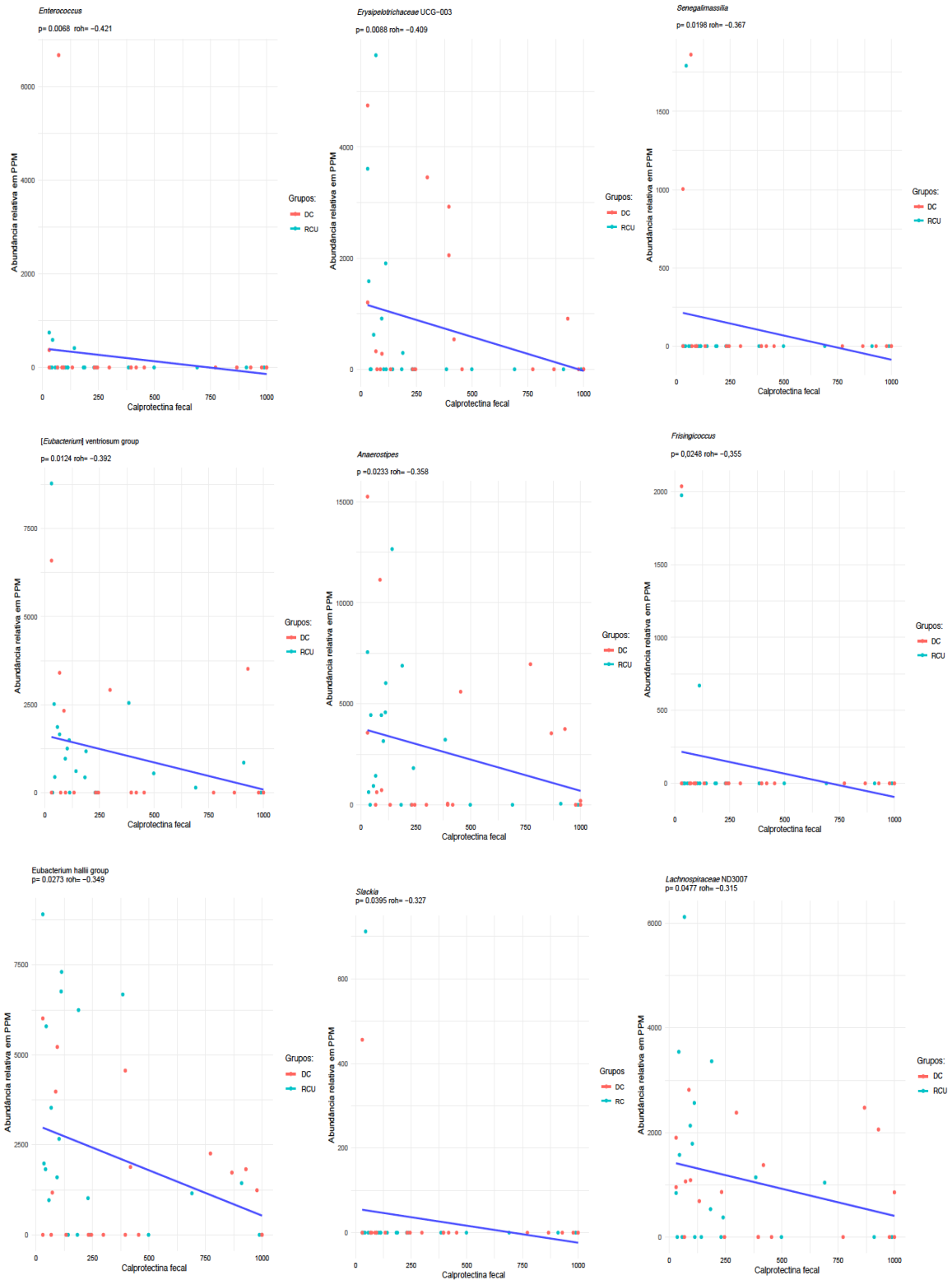
### 6.4.2 Correlações entre microbiota intestinal, inflamação e permeabilidade intestinal

As correlações entre microbiota intestinal, inflamação intestinal (medida pela calprotectina fecal) e permeabilidade intestinal (medida pela zonulina fecal) foram realizadas no grupo de pacientes com doenças inflamatórias intestinais (n=40), que apresentavam todos os dados necessários para as análises.

Para gêneros bacterianos, foram encontradas duas associações positivas (Figura 09) e nove associações negativas (Figura 10) com a calprotectina fecal. Dentre as correlações negativas, destaca-se o gênero *Veillonella*, com moderada correlação com calprotectina ( $\rho=0,41$ ,  $p=0,0027$ ). Nas correlações negativas, a maior força de correlação com calprotectina ocorreu entre o gênero *Enterococcus* ( $\rho=-0,42$ ,  $p=0,0068$ ). Gêneros produtores de butirato, como *Eubacterium halli group* e *Lachnospiraceae ND3007*, também apresentaram correlações negativas com calprotectina fecal ( $\rho=-0,349$ ,  $p=0,0273$  para *Eubacterium halli group*;  $\rho=-0,315$ ,  $p=0,047$  para *Lachnospiraceae ND3007*).

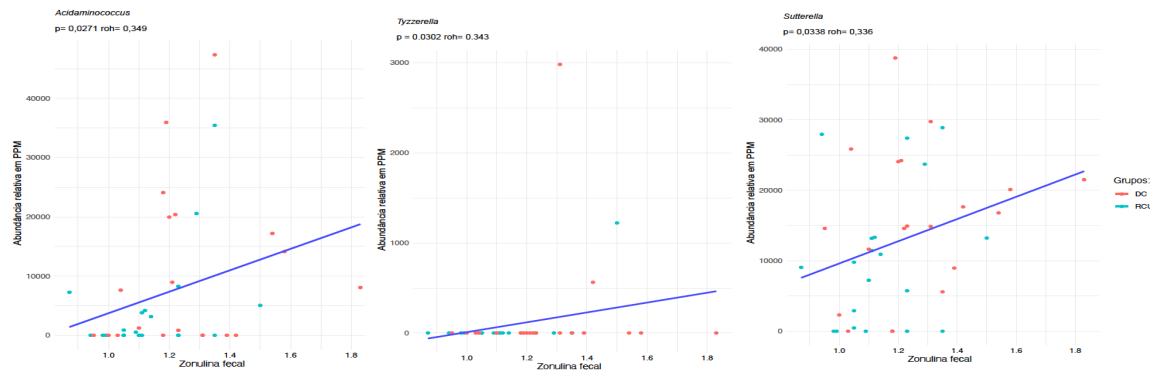


**Figura 9.** Correlações positivas entre gêneros bacterianos e calprotectina fecal em pacientes com doenças inflamatórias intestinais em remissão clínica (n=40). Legenda: DC: doença de Crohn, RCU: retocolite ulcerativa, PPP: parte por milhão.



**Figura 10.** Correlações negativas entre gêneros bacterianos e calprotectina fecal em pacientes com doenças inflamatórias intestinais em remissão clínica (n=40). Legenda: DC: doença de Crohn, RCU: retocolite ulcerativa, PPP: parte por milhão.

Nas correlações com zonulina fecal, correlações positivas foram observadas para os gêneros *Acidaminococcus* ( $\rho=0,349$ ,  $p=0,027$ ), *Tyzzarella* ( $\rho=0,343$ ,  $p=0,032$ ) e *Sutterella* ( $\rho=0,336$ ,  $p=0,0338$ ), este último pertencente ao filo *Proteobacteria*.



**Figura 11.** Correlações entre filos e gêneros bacterianos e zonulina fecal em pacientes com doenças inflamatórias intestinais em remissão clínica ( $n=40$ ). Legenda: DC: doença de Crohn, RCU: retocolite ulcerativa, PPP: parte por milhão.

Na análise das espécies bacterianas em uma rede de correlação entre inflamação intestinal (avaliada por CF), permeabilidade (avaliada por ZF) e MI, foram integrados dados de 608 espécies bacterianas com níveis fecais de calprotectina e zonulina.

Após integração dos dados, identificamos 108 correlações significativas para ZF e 113 correlações para CF, que foram ranqueadas em robustez, baseadas no valor  $\rho$ . Ao selecionar as 15 correlações mais fortes entre ZF, CF e MI, foram identificados grupos similares de sequências ASV correlacionados com inflamação e permeabilidade, com destaque para a grande quantidade de espécies pertencentes à família *Lachnospiraceae*, reconhecida produtora de butirato, negativamente associada à ZF e CF, sugerindo possível mecanismo de interação entre bactérias benéficas com inflamação e permeabilidade.

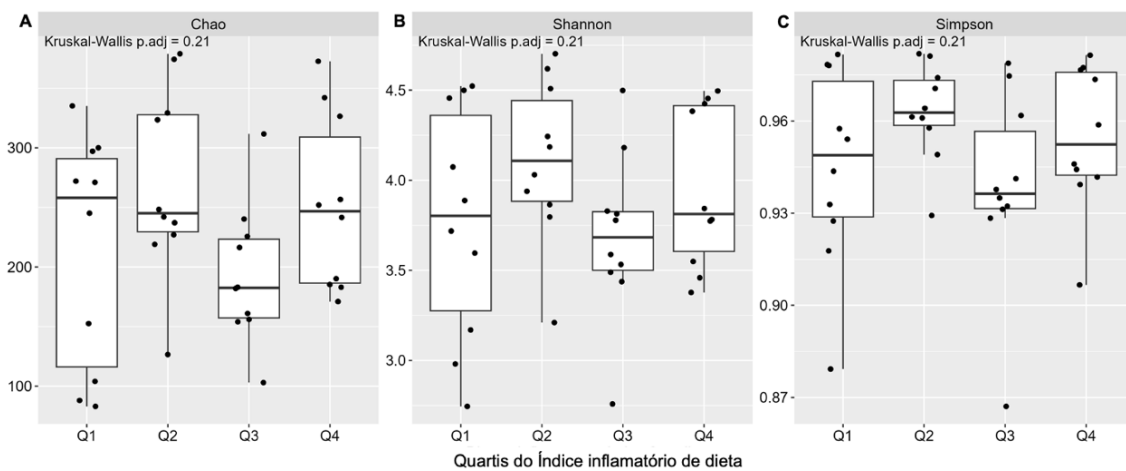
**Tabela 14.** Correlações entre microbiota intestinal em ASV, níveis de zonulina e calprotectina fecal em pacientes com Doenças Inflamatórias Intestinais (n=40).

Variável - ASV	Zonulina fecal		Calprotectina fecal	
	rho	P valor	rho	P valor
<i>Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Ruminococcaceae;g__Ruminiclostridium 6</i>	-0,4863	<b>&lt;0.0001*</b>	-0,4012	<b>0,0001*</b>
<i>Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Lachnospiraceae;g__GCA-900066575</i>	-0,4650	<b>&lt;0.0001*</b>	-0,4445	<b>&lt;0.0001*</b>
<i>Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Lachnospiraceae;g__Lachnospiraceae NK4A136</i>	-0,3975	<b>0,0002*</b>	-0,3545	<b>0,0009*</b>
<i>Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Lachnospiraceae;g__Lachnospiraceae ND3007</i>	-0,3787	<b>0,0004*</b>	-0,3682	<b>0,0005*</b>
<i>Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Clostridiales;f__Lachnospiraceae</i>	-0,3622	<b>0,0007*</b>	-0,3337	<b>0,0018*</b>
<i>Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Ruminococcaceae;g__Ruminiclostridium UCG-005</i>	-0,3561	<b>0,0008*</b>	-0,3575	<b>0,0008*</b>
<i>p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae;g__Bacteroides</i>	-0,3439	<b>0,0013*</b>	-0,3605	<b>0,0007*</b>
<i>p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Peptostreptococcaceae;g__Terrisporobacter</i>	-0,3387	<b>0,0015*</b>	-0,3000	<b>0,0053*</b>
<i>p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Marinifilaceae;g__Odoribacter</i>	-0,3355	<b>0,0017*</b>	-0,3520	<b>0,0010*</b>
<i>p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Lachnospiraceae;g__Lachnospiraceae UCG-001</i>	-0,3347	<b>0,0017*</b>	-0,2467	<b>0,0229*</b>
<i>p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Ruminococcaceae;g__Ruminococcaceae UCG-010</i>	-0,3341	<b>0,0018*</b>	-0,2389	<b>0,0277*</b>
<i>p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Lachnospiraceae;g__Lachnospiraceae NK4A136 group</i>	-0,3312	<b>0,0020*</b>	-0,3623	<b>0,0007*</b>
<i>p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Lachnospiraceae;g__Lachnoclostridium</i>	-0,2961	<b>0,0059*</b>	-0,3983	<b>0,0002*</b>
<i>Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Christensenellaceae;g__Christensenellaceae R-7 group</i>	-0,3284	<b>0,0022*</b>	-0,3413	<b>0,0014*</b>
<i>Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Ruminococcaceae;g__Eubacterium coprostanoligenes</i>	-0,3269	<b>0,0023*</b>	-0,2933	<b>0,0065*</b>

Legenda: DC: doença de Crohn, RCU: retocolite ulcerativa, ASV: *Amplicon sequence variant*. Análises: \*Correlação de Spearman, em que o valor rho mede o peso da correlação.

### 6.4.3 Correlações entre dieta, microbiota intestinal, inflamação e permeabilidade intestinal

Nas análises de associação entre índice inflamatório da dieta e microbiota intestinal não foram identificadas diferenças significativas entre os quartis de IID e a alfa diversidade da MI, medida pelos índices Chao, Shannon e Simpson (Figura 12). Médias, com os respectivos desvio padrão, destes parâmetros para cada quartil são apresentadas na tabela suplementar 5 (Apêndice).



**Figura 12.** Comparação da alfa diversidade bacteriana representada por (A) Índice Chao, (B) Índice Shannon e (C) Índice Simpson entre os quartis de índices inflamatórios da dieta de pacientes com doenças inflamatórias intestinais (n=40).

Na análise Phyloseq, nove famílias, oito gêneros e duas espécies apresentaram diferenças significativas entre os quartis de inflamação alimentar.

Na análise das famílias bacterianas (Apêndice – Figura suplementar 1), foram observadas diferenças significativas entre os quartis de IID e os grupos *Christensenellaceae* ( $p < 0,01$ ), *Enterobacteriaceae* ( $p = 0,028$ ), *Erysipelotrichaceae* ( $p = 0,028$ ), *Fusobacteriaceae* ( $p = 0,026$ ), *Lachnospiraceae* ( $p = 0,0074$ ), *Lactobacillaceae* ( $p = 0,047$ ), *Prevotellaceae* ( $p < 0,01$ ), *Ruminococcaceae* ( $p < 0,01$ ) e *Veillonellaceae* ( $p < 0,01$ ). No entanto, na análise comparativa entre quartis, apenas *Fusobacteriaceae* manteve a significância, sendo significativamente maior no quartil 3, em relação ao quartil 2 ( $p = 0,037$ ).

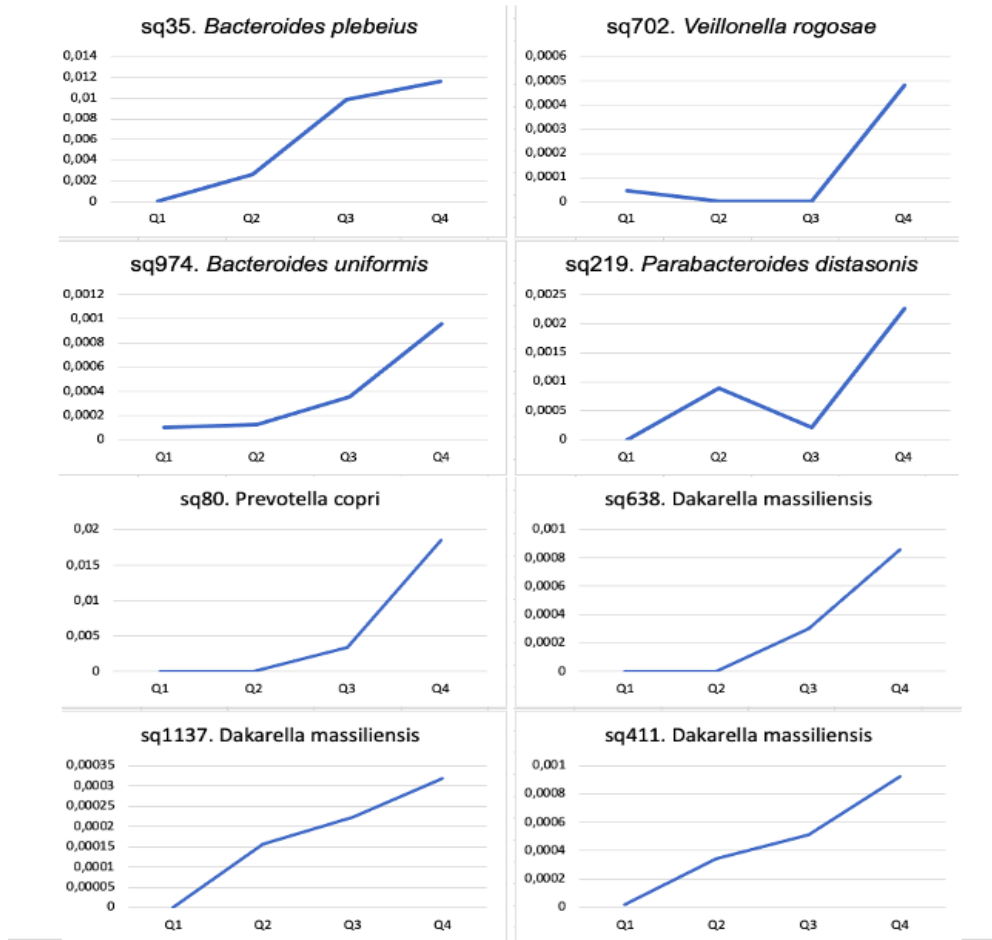
Na análise comparativa de gêneros (Apêndice – Figura suplementar 2), *Prevotella 2* foi significativamente maior no quartil 2, em comparação com o quartil

1 ( $p=0,037$ ), e *Veillonella* foi significativamente maior no quartil 4, em comparação com o quartil 2 de IID ( $p=0,042$ ).

As relações entre espécies bacterianas e IID foram medidas pelas análises Phyloseq e DESeq2. Na análise do Phyloseq (Apêndice – Figura suplementar 3), *Prevotella stercorea* foi significativamente predominante no quartil 2 ( $p=0,002$ ) e *Veillonella rogosae* foi significativamente predominante no quartil 4 ( $p=0,026$ ). Nas análises de DESeq2, 63 sequências bacterianas apresentaram diferença significativa entre os quartis (Apêndice – tabela suplementar 6), com *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Sutterella* e *Prevotella* como gêneros mais frequentes.

A partir desta análise DESeq2, foi possível observar um comportamento linear para IID e as seguintes sequências bacterianas: sq35 *Bacteroides plebeius*, sq974 *Bacteroides uniformis*, sq161 *Parabacteroides distasonis*, sq110 *Prevotella copri* e sq702 *Veillonella rogosae* (Gráfico 2).

**Gráfico 2.** Sequências bacterianas com comportamento linear para índice de inflamação na dieta em pacientes com doenças inflamatórias intestinais em remissão clínica (n=40).



As bactérias com comportamento crescente a partir do IID foram correlacionadas com os marcadores de inflamação e permeabilidade (tabela 15). Nesta análise de correlação, *Veillonella rogosae* sq702 foi positivamente correlacionada com calprotectina fecal ( $\rho=0,419$ ;  $p=0,007$ ) e três variantes de *Dakarella massiliensis* (sq411, sq638 e sq1137) foram positivamente correlacionadas com zonulina fecal.



**Tabela 15.** Correlação entre concentração de zonulina fecal, calprotectina fecal e PCR sérica com sequências bacterianas com comportamento linear para índice de inflamação na dieta em pacientes com doenças inflamatórias intestinais em remissão clínica (n=40).

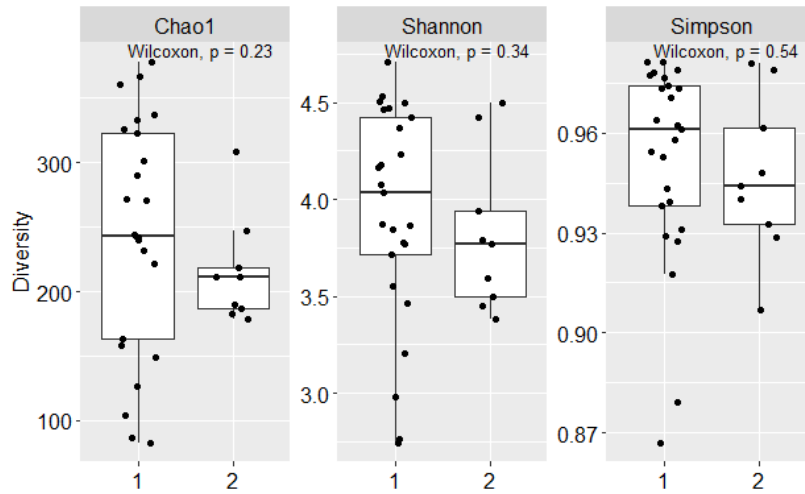
Variáveis de correlação	Zonulina fecal		Calprotectina fecal		PCR sérica	
	rho	P valor	rho	P valor	rho	P valor
sq80 <i>Prevotella copri</i>	-0,045	0,784	0,148	0,360	0,006	0,973
sq219 <i>Parabacteroides distasonis</i>	0,051	0,755	<b>0,343</b>	<b>0,030</b>	0,118	0,512
sq411 <i>Dakarella massiliensis</i>	<b>0,316</b>	<b>0,047</b>	0,142	0,383	-0,037	0,836
sq638 <i>Dakarella massiliensis</i>	<b>0,319</b>	<b>0,044</b>	0,281	0,078	-0,014	0,939
sq1137 <i>Dakarella massiliensis</i>	<b>0,486</b>	<b>0,001</b>	0,070	0,669	-0,206	0,250
sq702 <i>Veillonella rogosae</i>	0,039	0,811	<b>0,419</b>	<b>0,007</b>	-0,095	0,600
sq974 <i>Bacteroides uniformis</i>	0,068	0,677	0,113	0,486	0,098	0,588
sq35 <i>Bacteroides plebeius</i>	-0,076	0,641	-0,179	0,270	-0,087	0,629

## 6.5 AVALIAÇÃO DAS VARIÁVEIS PREDITORAS DE RECIDIVA DE DOENÇA

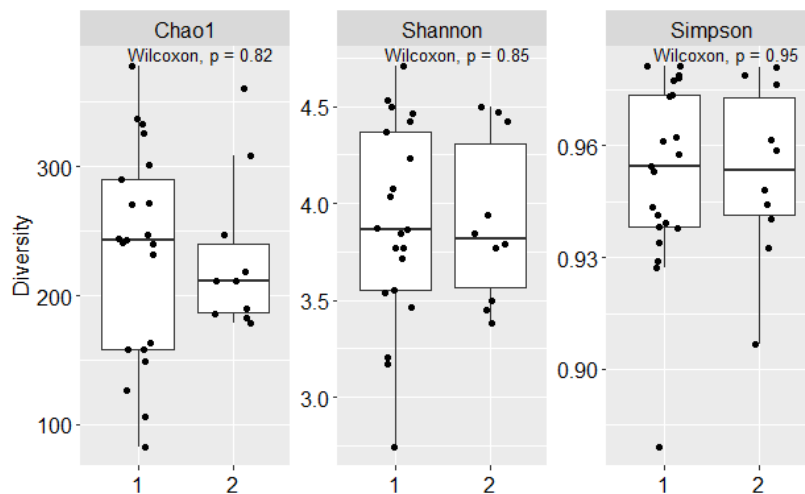
Durante o acompanhamento dos pacientes com DII, foi constatado que nove pacientes tiveram recaída de doenças em 6 meses (26,5% - 9/34) e dez pacientes recaíram em 12 meses (32,2% - 10/31). Com estas informações, buscou-se compreender se variáveis de microbiota, inflamação, permeabilidade e consumo alimentar do início do acompanhamento impactaram na recidiva da doença.

Nas análises de microbiota intestinal, não foram identificadas diferenças nos índices de diversidade Chao, Simpson e Shannon entre os pacientes que recidivaram doença ou se mantiveram em remissão clínica em seis meses (Figura 13) e doze meses (Figura 14). Médias, com os respectivos desvio padrão, destes

parâmetros para os diferentes grupos são apresentadas na tabela suplementar 7 (Apêndice).



**Figura 13.** Análise comparativa dos índices de diversidade de Chao, Shannon e Simpson da microbiota intestinal dos pacientes estratificados em dois grupos, com base no status de atividade da doença aos 6 meses. Legenda: 1: Remissão Clínica; 2: Recidiva de Doença.



**Figura 14.** Análise comparativa dos índices de diversidade de Chao, Shannon e Simpson da microbiota intestinal dos pacientes estratificados em dois grupos, com base no status de atividade da doença aos 12 meses. Legenda: 1: Remissão Clínica; 2: Recidiva de Doença.

Embora a microbiota intestinal dos pacientes com DII não tenha identificado na alfa diversidade um fator preditor para recidiva de doença, em análise comparativa das sequências bacterianas foram identificados microrganismos

significativamente distintos entre pacientes com e sem recidiva de doença durante o seguimento. De acordo com os resultados, onze sequências bacterianas apresentaram diferenças significativas entre pacientes que mantiveram remissão clínica ou tiveram recidiva de doença aos seis meses (Tabela 16).

Para os dados de recidiva de seis meses, chama atenção o papel da redução de bactérias produtoras de AGCC e marcadoras de saúde intestinal, como sq440 *Coprococcus eutactus*, sq1000 *Eubacterium ramulus*, sq384 *Eubacterium siraeum*, sq188 e *Faecalibacterium prausnitzii*, na predição de recidiva.

Chama a atenção a observação que diferentes sequências bacterianas exerceram papéis opostos dentro uma mesma espécie. Assim, para recidiva de doença, foram preditoras, no mesmo período, a redução da variante sq33 *Prevotella copri* e aumento da variante sq80 *Prevotella copri*.

**Tabela 16.** Análise comparativa da microbiota intestinal de pacientes com doenças inflamatórias intestinais que mantiveram remissão clínica, versus pacientes que tiveram recidiva de doença após 6 meses de acompanhamento (n=34).

Sequência bacteriana	RC	RD	log2Fc	p valor
sq346 <i>Bacteroides ovatus</i>	8,13 (26,34)	0 (0)	-23,617	<b>0,000</b>
sq35 <i>Bacteroides plebeius</i>	96,57 (271,86)	0,23 (0,69)	-12,082	<b>0,003</b>
sq116 <i>Bacteroides stercoris</i>	8,54 (29)	7,46 (22,39)	-24,058	<b>0,000</b>
sq440 <i>Coprococcus eutactus</i>	4,71 (13,92)	0,82 (2,47)	-23,392	<b>0,000</b>
sq1000 <i>Eubacterium ramulus</i>	3,14 (8,86)	0 (0)	-22,483	<b>0,000</b>
sq384 <i>Eubacterium siraeum</i>	11,63 (34,02)	0 (0)	-22,776	<b>0,000</b>
sq188 <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	3,14 (7,74)	0 (0)	-23,233	<b>0,000</b>
sq343 <i>Phascolarctobacterium succinatutens</i>	5,1 (16,27)	0 (0)	-22,257	<b>0,000</b>
sq 33 <i>Prevotella copri</i>	27,4 (74,96)	0 (0)	-24,065	<b>0,000</b>
sq 80 <i>Prevotella copri</i>	72,63 (362,72)	42,28 (73,7)	8,907	<b>0,045</b>
sq157 <i>Ruminococcus bromii</i>	6,35 (16,29)	4,94 (14,82)	-24,840	<b>0,000</b>

Legenda: RC: remissão clínica; RD: recidiva de doença. As mudanças entre grupos são relatadas como alterações de log2Fc. Média da abundância relativa das sequências em partes por milhão com desvio padrão entre parênteses.

Na avaliação para preditores microbianos de recidiva em 12 meses de acompanhamento, 16 sequências bacterianas apresentaram diferenças

significativas entre pacientes que mantiveram remissão clínica ou recaíram para fase ativa (Tabela 17).

Para este período, em pacientes que recidivaram, observou-se aumento da variante sq1137 *Dakarella massiliensis*, associada de forma positiva com a zonulina fecal, e níveis reduzidos de *Akkermansia muciniphila*.

**Tabela 17.** Análise comparativa da microbiota intestinal de pacientes com doenças inflamatórias intestinais que mantiveram remissão clínica, versus pacientes que tiveram recidiva de doença após 12 meses de acompanhamento (n=31).

Sequência bacteriana	RC	RD	log2Fc	p valor
sq31 <i>Akkermansia muciniphila</i>	33,21 (97,87)	0 (0)	-22,138	0,000
sq119 <i>Bacteroides caccae</i>	28,08 (76,45)	2,07 (6,55)	-24,260	0,000
sq35 <i>Bacteroides plebeius</i>	114,96 (294,06)	0,21 (0,65)	-26,077	0,000
sq202 <i>Bacteroides uniformis</i>	16,37 (56,77)	0 (0)	-21,481	0,000
sq279 <i>Bacteroides vulgatus</i>	0,57 (2,6)	9,53 (22,64)	23,807	0,000
sq130 <i>Bacteroides xylanisolvens</i>	1,44 (6,62)	25,4 (63,86)	27,434	0,000
sq1137 <i>Dakarella massiliensis</i>	0,74 (3,41)	3,19 (6,73)	23,176	0,000
sq 184 <i>Duodenibacillus massiliensis</i>	4,81 (22,02)	9,49 (21,39)	24,661	0,000
sq359 <i>Mitsuokella jalaludinii</i>	5,74 (20,09)	23,93 (52,49)	27,542	0,000
sq352 <i>Phascolarctobacterium succinatutens</i>	7,38 (19,21)	0 (0)	-21,445	0,000
sq33 <i>Prevotella copri</i>	23,39 (72,3)	19,39 (61,31)	-23,299	0,000
sq128 <i>Prevotella stercorea</i>	2,22 (8,36)	110,31 (338,3)	26,268	0,000
sq300 <i>Prevotella stercorea</i>	11,37 (43,29)	46,01 (115,49)	-22,502	0,000
sq113 <i>Prevotellamassilia timonensis</i>	7,07 (32,38)	64,27 (142,2)	26,459	0,000
sq892 <i>Turicibacter sanguinis</i>	0,41 (1,89)	1,78 (3,35)	24,262	0,000

Legenda: RC: remissão clínica; RD: recidiva de doença. As mudanças entre grupos são relatadas como alterações de log2Fc. Média da abundância relativa das sequências em partes por milhão com desvio padrão entre parênteses.

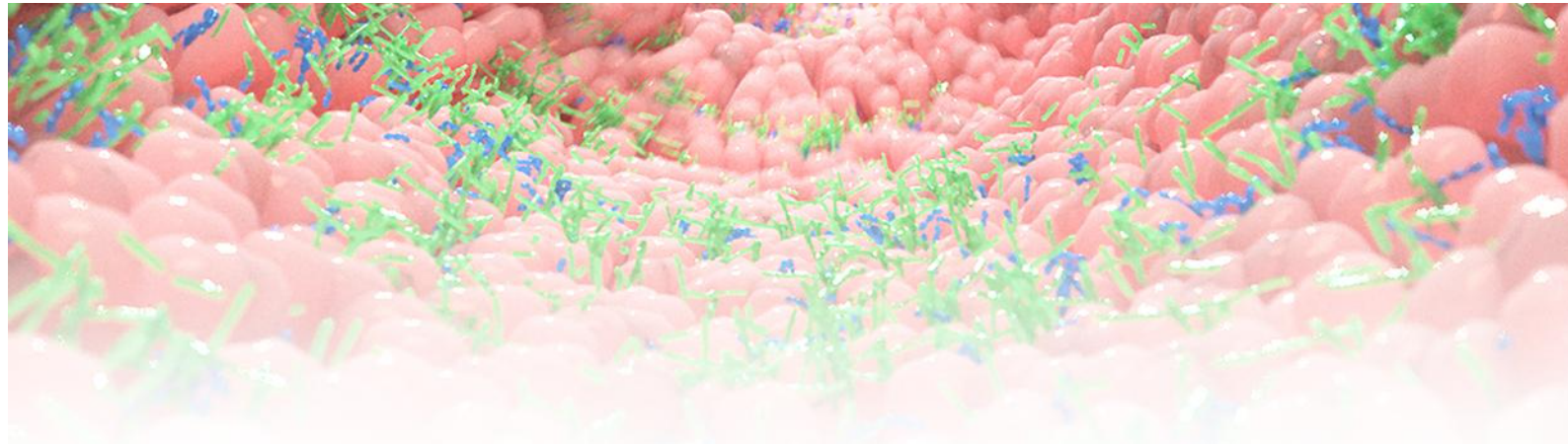
Nos modelos de regressão binária para variáveis não metagenômicas preditoras de recidiva – com inclusão de calprotectina fecal, zonulina fecal, PCR, vitamina D e índice inflamatório de dieta, as variáveis calprotectina, zonulina e índice inflamatório da doença aumentaram as chances de ocorrência da atividade da doença em seis e em doze meses (Tabela 18).

Todavia, a calprotectina fecal se configurou como variável que melhor prediz recidiva de doença nos dois períodos de acompanhamento, por apresentar os melhores valores de área sob a curva (tabela suplementar 8 e figura suplementar 4 – Apêndice).

**Tabela 18.** Preditores de recidiva da doença em pacientes com doença inflamatória intestinal em 6 meses (n = 34) e 12 meses (n = 31) de acompanhamento.

<b>Recidiva clínica em 6 meses</b>			
<b>Variáveis</b>	<b>OR</b>	<b>IC (2,5% -97,5%)</b>	<b>P valor</b>
Calprotectina	1,00059	1,000193 – 1,000986	<b>0,00643</b>
IID	1,2321706	1,046262 -1,451113	<b>0,0177</b>
Zonulina	2,2997557	1,1024825 – 4,797243	<b>0,0336</b>
PCR	1,018741	0,9957681 – 1,042243	0,1204
Vitamina D	0,9966841	0,9796377 -1,014027	0,708
<b>Recidiva clínica em 12 meses</b>			
Calprotectina	1,000767	1,0003120-1,001222	<b>0,00253</b>
IID	1.2880455	1,0988164- 1,509862	<b>0,00404</b>
Zonulina	2,3685006	1,0555771 – 5,314434	<b>0,0454</b>
PCR	1,022344	0,9984079 -1,046853	0,0778
Vitamina D	0,9934817	0,9722893 – 1,015136	0,557

Legenda: IID: índice inflamatório da dieta; PCR: proteína C-reativa; OR – *Odds ratio*; IC – Intervalo de confiança.



## **7. DISCUSSÃO**

## 7. DISCUSSÃO

O presente estudo evidenciou alterações na composição da microbiota intestinal de pacientes com doenças inflamatórias intestinais em remissão clínica, bem como aumento de permeabilidade intestinal nesta população e importantes correlações entre microbiota, inflamação e permeabilidade, que culminaram em maior risco para recidiva de doença.

Para melhor compreensão dos temas, os achados do estudo serão discutidos em tópicos, seguindo a ordem de apresentação dos resultados.

### 7.1 DADOS CLÍNICOS E NUTRICIONAIS

No presente estudo, os doentes de DC e RCU apresentaram tempo médio de doença superior a dez anos. De forma geral, as DII podem estar associadas a maior extensão de doença e comportamentos mais agressivos em pacientes mais jovens ou com diagnósticos recentes (158). Todavia, existem exceções, por que a remissão de doença depende de múltiplos fatores não propriamente relacionados à idade, como uso de medicamentos, comportamento de doença, cirurgias prévias etc. (159).

Observou-se que os pacientes com DII também apresentaram alterações no padrão evacuatório, com maior número de evacuações diárias e com Bristol 5 e 6 mais prevalentes no grupo DII. Maior frequência evacuatória e perfil diarreico são características clínicas bastante presentes nos pacientes com DII, embora na remissão clínica, estes sintomas se apresentam em quantidade reduzida (160).

Outros achados clínicos de grande relevância são as alterações em antropometria e composição corporal no grupo DII. Sem diferença estatística entre os subtipos DC e RCU, os pacientes com DII apresentaram maior IMC, maior percentual de massa gorda e menor percentual de massa magra quando comparado ao grupo controle.

Elevada incidência de sobrepeso e obesidade em DII corroboram os achados de estudos prévios e se configuram como agravantes no tratamento,

uma vez que a obesidade pode reduzir a resposta terapêutica, especialmente para medicamentos de dosagem fixa, aumentando sua depuração (161, 162). Todavia, sabe-se que a avaliação nutricional do paciente com DII não deve se restringir às análises antropométricas e cálculos de IMC, uma vez que esta medida não possibilita avaliar a composição corporal e pode mascarar inadequações do estado nutricional. Por exemplo, quando a redução da massa magra é compensada por um aumento proporcional da massa gorda (163). Assim, a avaliação da massa muscular em pacientes com DII vem sendo gradativamente introduzida na prática clínica.

Como observado em nossa população, outros estudos apontaram redução de massa magra em pacientes com DII e a correlação desta variável com maior tempo de doença. A redução da massa muscular em DII pode ser explicada por fatores como ingestão oral reduzida, inflamação crônica e síndrome do intestino curto. Especialmente em idosos, que apresentam maior catabolismo do tecido muscular, diminuição da mobilidade e inflamação inerente à idade, a redução da massa muscular está intimamente associada com diminuição da força muscular, fadiga e menor capacidade funcional (164, 165). Alterações no estado nutricional e composição corporal também podem ser explicadas pela reduzida prática de atividade física na população com DII, que são menos ativos quando comparados a grupos saudáveis, por conta de sintomas gastrointestinais e fatores psicológicos (166).

Considerados em conjunto, os resultados de IMC, massa muscular e massa gorda, destacam a necessidade do monitoramento nutricional rotineiro em todos os pacientes com DII e não apenas naqueles que estão visivelmente desnutridos, além do estímulo à prática da atividade física, de modo a auxiliar na resposta ao tratamento.

Adicionalmente, como variáveis de estilo de vida, observou-se, como ponto positivo, poucos pacientes com práticas de etilismo social e tabagismo. A interrupção destes hábitos é de extrema importância durante o tratamento do paciente com DII, por estarem álcool e cigarro associados a exacerbação de sintomas (167).



## 7.2 MICROBIOTA INTESTINAL EM DII

Ao compararmos a composição da microbiota intestinal entre pacientes com DII e grupo controle, não observamos diferença significativa na beta diversidade. Todavia, a alfa diversidade do grupo DII apresentou-se reduzida. Encontramos menor índice Shannon na população com DII e subgrupo DC, e menor índice Chao na população com DII.

A alfa diversidade descreve a complexidade das comunidades de um único ambiente, medindo o número de espécies e seus padrões de abundância (29). A diversidade da MI é um importante marcador de saúde intestinal ao impactar na sua resiliência, ou seja, na capacidade da MI de se recuperar e retornar ao seu estado anterior de eubiose após sofrer influência de fatores externos, como uso de antibióticos, ou internos, como inflamação e aumento de permeabilidade intestinal (168). Uma adequada diversidade está associada a maior repertório de atividades produzidas pela MI e adequado repertório imune. No entanto, a baixa diversidade microbiana se associa com menor competitividade entre bactérias comensais, maior probabilidade de espécies patogênicas se proliferarem, disbiose e condições de doença (169). O microbioma intestinal de pacientes com DII geralmente é caracterizado por diversidade reduzida, ainda que em remissão clínica (20, 170-173).

A análise da abundância diferencial foi realizada para detectar diferenças entre os grupos taxonômicos de DC, RCU e GC. Na distribuição de filos, o grupo DII apresentou maior abundância de *Actinobacteria*, no grupo DC e RCU, e enriquecimento de *Fusobacteria* e *Proteobacteria* exclusivamente no grupo DC. Os dados do nosso estudo corroboram os achados do estudo brasileiro delineado por Magro *et al.* (32) em pacientes com doença de Crohn em remissão, que apresentaram redução em alfa diversidade e enriquecimento do filo *Proteobacteria*. Diferente do estudo brasileiro, nossa pesquisa não identificou redução significativa no filo *Verrucomicrobia*.

A nossa investigação compartilha similaridades com o perfil de filos do estudo de Pascal *et al.* (86), que definiram a assinatura de microbiota na doença de Crohn com aumento de *Proteobacteria* e *Actinobacteria*. Corroborando nossos dados, estudos prévios também mostraram enriquecimento de

*Proteobacteria* em doença ativa e remissão em DC (174, 175). A prevalência deste filo está diretamente associada à inflamação intestinal por indução de citocinas pró-inflamatórias e depleção de AGCC (176) e parece ser mediada pela presença de oxigênio no ambiente intestinal inflamado. Em um intestino saudável, as células epiteliais promovem um ambiente anaeróbio, enquanto na presença de inflamação intestinal a capacidade de oxidação beta das células colônicas é reduzida, aumenta a disponibilidade de oxigênio e, por competição, facilita o crescimento de *Proteobacteria* (177).

O aumento do filo *Fusobacteria* nos pacientes da nossa pesquisa aponta desequilíbrio da microbiota intestinal. Isso porque espécies deste filo (como *Fusobacterium nucleatum*, enriquecida em DC na fase ativa de doença), quando presentes em altas quantidades, atuam como patógenos oportunistas, capazes de promover inflamação e carcinogênese (178). Outro ponto relevante em nosso estudo foi a não identificação de diferenças na abundância dos filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes*. Essa redução foi evidenciada em estudo prévio, embora realizado com pacientes em fase ativa de DII (179).

Na avaliação de famílias, gêneros e espécies, os gêneros *Bifidobacterium*, *Escherichia-Shigella*, *Lactobacillus* (e sua espécie *Lactobacillus mucosae*), *Fusobacterium*, *Megasphaera* e *Dialister* foram significativamente enriquecidos em DII, enquanto os gêneros das famílias *Lachnospiraceae* e *Bacteroidaceae* foram reduzidos. Adicionalmente, foi verificado aumento de *Ruminococcus torques* nos pacientes com DII. O aumento dessa espécie já foi associado a inflamação intestinal por sua capacidade de lesão de mucosa (34, 180-181).

A redução na abundância destas famílias com características comensais e o aumento dos grupos pró-inflamatórios *Escherichia* e *Fusobacterium* são descritos, em especial para DC (170, 174). O enriquecimento de *Escherichia-Shigella*, *Lactobacillus*, *Lactobacillus mucosae* e *Bifidobacterium* em DII também foi descrito por Dai *et al.* (180) em pacientes com RCU. A presença intestinal do gênero *Lactobacillus* é considerada benéfica à saúde intestinal, mas estudo em pacientes em uso de inibidor de bomba de prótons e antibióticos relacionou o enriquecimento deste gênero com o aumento de *Escherichia-Shigella*, por modificações no pH do ambiente intestinal (182). De modo similar, estudo que

comparou a microbiota de pacientes com RCU e DC versus a de indivíduos saudáveis, identificou aumento de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* na população com DII (31). Mesmo que o referido estudo tenha sido realizado na fase ativa de doença, diferente da nossa população de remissão clínica, os autores chamam atenção para a cautela no uso dos probióticos *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* durante a fase aguda de doença e sugerem a necessidade da suplementação probiótica guiada por sequenciamento genético da MI.

### 7.3 INFLAMAÇÃO E PERMEABILIDADE INTESTINAL

Em nosso estudo, relatamos o aumento da inflamação e permeabilidade intestinal nos pacientes com DII em remissão clínica, identificamos a zonulina fecal como um excelente biomarcador para integridade de barreira intestinal e apontamos o papel preditivo da calprotectina fecal no aumento dos níveis de zonulina fecal.

O aumento da permeabilidade intestinal na fase ativa das DII já é conhecido (183, 184). No entanto, ainda não estão disponíveis estudos de avaliação da permeabilidade através da zonulina fecal em pacientes em remissão clínica.

Em nosso estudo, não foram encontradas diferenças significativas nos valores de zonulina fecal entre os subtipos DC e RCU. De modo diferente, Malickova *et al.* (183) relataram em fase ativa de doença valores de zonulina sérica e fecal mais altos em pacientes com DC do que em RCU. Por outro lado, em concordância com nossa observação, nenhuma diferença nos níveis séricos de zonulina entre pacientes com DC e RCU foi observada por Caviglia *et al.* (184), que ainda relataram correlação inversa entre zonulina sérica e tempo de doença.

Discrepâncias nos níveis de zonulina identificados nestes estudos podem ser explicadas por diferentes características das populações estudadas, como diferentes estágios da doença, consumo alimentar, comorbidades associadas e presença de cirurgia prévia. Atenta-se ainda que o local de coleta da zonulina, fecal ou sérico, pode ser fator crítico para os resultados. Como a zonulina é sintetizada por células epiteliais e células imunes de tecidos intestinais e

extraintestinais, seus níveis séricos podem não refletir exclusivamente danos à barreira intestinal (97). Portanto, aceita-se zonulina fecal como um biomarcador de maior acurácia para a permeabilidade intestinal em relação à zonulina sérica (184).

Identificamos correlação inversa entre a concentração de zonulina fecal e o nível sérico de vitamina D, cuja prevalência de inadequação foi elevada em nossa população (67% - 23/34 – pacientes avaliados). Essa prevalência de inadequação foi superior aos resultados descritos por MacMaster *et al.* (185), que observaram valores insuficientes da vitamina D em aproximadamente 30% dos pacientes com DII em remissão clínica.

A vitamina D desempenha papel central na homeostase intestinal e sua insuficiência é um fator de risco bem reconhecido nas DII (185). A vitamina D pode contribuir para a boa saúde intestinal e integridade epitelial ao ligar-se ao seu receptor intracelular e fortalecer as junções intercelulares (186). Assim, sua deficiência tem implicações diretas no prognóstico das DII, em função de suas ações sobre a diferenciação das células imunes, modulação da microbiota intestinal, transcrição gênica e integridade de barreira (187-189). Em acordo com os nossos achados, outros relatos sugerem associação positiva entre níveis adequados de vitamina D e baixa permeabilidade intestinal em pacientes com DII (189-191).

No presente estudo, avaliamos biomarcadores fecais com grande potencial para monitoramento clínico em DII. Sabe-se que a endoscopia colorretal é o padrão ouro para essa avaliação, mas, tendo em vista que é procedimento de alto custo e invasivo, faz-se necessária a busca por marcadores substitutos para avaliação da mucosa intestinal (192, 193). Nesta área, a calprotectina tem sido amplamente utilizada para diagnóstico e monitoramento longitudinal das DII, devido à sua capacidade de refletir a atividade inflamatória endoscópica da doença. Uma revisão sistemática recente constatou que pontos de corte de calprotectina fecal entre 100 e 800 µg/g podem prever recaída de doença, ao refletir os níveis de inflamação na mucosa intestinal (181). Contudo, em pacientes com DII em doença ativa, Ohlsson *et al.* (194) não encontraram correlações entre zonulina sérica e calprotectina fecal, sugerindo que essas moléculas adotam comportamentos diferentes de acordo com características

clínicas, genéticas e ambientais. Estes achados preliminares, e ainda conflitantes, abrem oportunidade para novos estudos para melhor compreender o papel da zonulina e calprotectina no curso das doenças inflamatórias intestinais.

#### 7.4 CONSUMO ALIMENTAR

Em análise qualitativa do consumo alimentar, a população com DII do presente estudo apresentou padrão alimentar com elevado consumo de carboidratos e gordura saturada, além de baixo consumo de fibras (com percentual de inadequação superior a 85% na população masculina, independente da faixa etária). Esta baixa ingestão de fibras reflete o perfil alimentar descrito como dieta ocidental, considerado, segundo Ribaldone (195), como pró-inflamatório para DII.

Com relação ao consumo de carboidratos e proteínas, observou-se inadequação no consumo para 2,74% e 1,23% na população feminina e masculina, respectivamente. Para proteína, baseado no ponto de corte de EAR, também foram identificados baixos percentuais de inadequação – 12,92% na população feminina e 2,50% na população masculina. Durante a fase ativa de doença, relata-se déficits no consumo destes macronutrientes, atribuídos, segundo Massironi *et al.* (196), aos sintomas gastrointestinais persistentes – como náuseas, vômitos e dor abdominal – durante a crise, além do medo de se alimentar e ocasionar agravo do quadro. Para remissão clínica, todavia, espera-se encontrar um consumo alimentar adequado para estes nutrientes, conforme observado em nosso estudo. Baixos percentuais de inadequação para consumo proteico configuram aspecto positivo relevante, uma vez que a reduzida ingestão deste nutriente (por síndrome do intestino curto, sintomas obstrutivos e inflamação grave), especialmente em idosos, expõe os pacientes a maior risco de catabolismo do tecido muscular e sarcopenia (197).

Para o consumo de fibras, a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) recomendam uma ingestão dietética diária – para adultos – de 20g de fibras por 1.000 kcal ingeridas (198). Embora as fibras alimentares sejam amplamente

associadas a efeitos benéficos à saúde, a ingestão média diária na população ocidental é muito inferior às quantidades recomendadas. As fibras têm grande importância para a saúde intestinal dos pacientes com DII, uma vez que sua fermentação no intestino grosso promove a regulação do pH do lúmen intestinal, favorece a síntese de vitaminas, em especial vitamina K e vitaminas do complexo B, e a produção de AGCC (199-202). Dietas pobres em fibras, por outro lado, são associadas à redução de espécies fermentadoras e menor produção de AGCC, fonte energética para os colonócitos (199).

Para inadequação de micronutrientes, chama atenção a média de inadequação no consumo de ferro na população feminina entre 19 e 45 anos (53,59%), faixa etária com necessidades aumentadas para este nutriente. A deficiência de ferro é altamente prevalente em pacientes com DII, relacionada à má absorção, perdas do trato gastrointestinal e consumo insuficiente (197).

Também se alerta para inadequação próxima a 100% no consumo de folato e vitamina D no grupo DII. Segundo MacMaster *et al.* (185), a deficiência de folato afeta aproximadamente 30% dos pacientes com DC e 10% dos pacientes com RCU, sendo a má absorção e a baixa ingestão as principais causas associadas a este déficit. Para vitamina D, destacam-se duas importantes reflexões: 1) embora os valores de consumo tenham sido bastante reduzidos, o baixo consumo não diferiu entre grupo saudável e doente; 2) fontes alimentares de vitamina D, como fígado, óleo de fígado de bacalhau e salmão, são pouco consumidas no Brasil e fornecem apenas uma pequena proporção das necessidades diárias, enquanto a exposição da pele à radiação solar é a fonte natural mais eficaz de obtenção desta vitamina (130).

Um resultado relevante do estudo é que todos os pacientes consumiram dieta considerada pró-inflamatória, segundo o escore de índice inflamatório da dieta (133). Estudos anteriores identificaram o consumo de dietas pró-inflamatórias em pacientes com DII em fase ativa e remissão clínica. Em estudo comparando DII, SII e grupo saudável, também foi observado consumo de dieta de baixa qualidade nutricional em pacientes com DII e SII, em comparação com os indivíduos saudáveis (203).

Assim como observado em nosso estudo, dietas com alto potencial inflamatório tem a capacidade de desequilibrar a microbiota intestinal,

interromper a função de barreira epitelial e, conseqüentemente, desencadear ou agravar a inflamação intestinal (204).

## 7.5 MICROBIOTA E HÁBITO INTESTINAL EM DII

Apesar dos avanços na compreensão dos fatores que podem alterar a composição da microbiota intestinal, incluindo dieta, medicamentos e estilo de vida, algumas variáveis que potencialmente afetam essa composição microbiana, ainda parecem pouco explorados. É o caso do tempo de trânsito intestinal (205).

O tempo de trânsito intestinal pode afetar a microbiota intestinal, à medida que modifica a quantidade de água e nutrientes absorvidos no decorrer do trato gastrointestinal (206). Na prática clínica, uma forma bastante simples de avaliar o tempo de trânsito é através da escala de Bristol, que avalia as fezes em sete escalas de consistência, sendo as pontuações mais altas correspondentes a fezes amolecidas e trânsito acelerado, enquanto pontuações mais baixas representam fezes endurecidas e tempo de trânsito intestinal lentificado. Uma vez que a formação das fezes reflete o tempo de trânsito intestinal, diferenças na escala de Bristol podem moldar a composição da MI (207).

Na nossa população de pacientes com DII, não foram identificadas diferenças significativas entre a escala de Bristol e os índices Shannon e Simpson de alfa diversidade, porém foi observado que pacientes com escala de Bristol 6 (indicando trânsito intestinal mais acelerado) apresentaram menor índice Chao. Em estudo com população saudável, menor índice Chao também foi associado com Bristol 6 e 7 (207).

Até onde temos conhecimento, ainda não foram realizados estudos com associações entre alterações na composição da microbiota e escala de Bristol em pacientes com doenças inflamatórias intestinais em remissão clínica.

## 7.6 CORRELAÇÕES ENTRE MICROBIOTA, DIETA, INFLAMAÇÃO E PERMEABILIDADE INTESTINAL

Diferentes perfis de microbiota intestinal foram encontrados em pacientes com DII, de acordo com o nível de atividade e gravidade da doença. Estas diferenças de perfis microbianos dentro da mesma condição clínica sugerem a forte correlação entre microbiota intestinal e inflamação intestinal (170). Em nosso estudo, foram observadas correlações entre microbiota intestinal, inflamação intestinal (medida pela calprotectina fecal) e permeabilidade intestinal (medida pela zonulina fecal).

Para correlações com calprotectina fecal, os gêneros *Veillonella* e *Odoribacter* apresentaram correlação positiva com este biomarcador, enquanto *Eubacterium hali* group, *Lachnospiraceae* ND3007, *Enterococcus*, *Erysipelotrichaceae* UCG-003, *Anaerostipes*, *Senegalimassilia* e *Slackia* foram negativamente correlacionados.

O gênero *Veillonella* apresentou-se elevado em estudos prévios em pacientes com DII, especialmente na doença de Crohn (174, 175, 208). Este gênero é composto por diversas espécies patogênicas e está relacionado a infecções bacterianas na microbiota oral e intestinal (209, 210). *Veillonella* tem a capacidade de formar biofilmes na mucosa oral e intestinal, que a torna resistente a tratamentos antimicrobianos (209). Além disso, lipopolissacarídeos (LPS) de *Veillonella* podem estimular o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina-6 (IL-6) promovendo inflamação (211), bem como reduzir a produção de ácido litocólico e o ácido desoxicólico, receptores secundários de ácidos biliares que exercem efeitos anti-inflamatórios no cólon (212, 213).

As famílias *Ruminococcaceae* e *Lachnospiraceae* apresentaram-se reduzidas na população com DII e foram negativamente correlacionadas com maiores níveis de zonulina e calprotectina fecal. Estudos com DC e RCU sugerem uma possível relação entre a redução destes grupos e o aumento da inflamação e permeabilidade intestinal. Ao reduzir estas famílias, reduz-se a produção de AGCC, que atuam na proliferação de células epiteliais intestinais (25) e protegem a integridade da barreira intestinal (214, 215).

Além da proliferação de colonócitos (25), é importante destacar que os AGCC protegem a integridade da barreira intestinal por diversos outros mecanismos, como: indução da secreção de muco, alteração de processos



epigenéticos pela inibição da histona desacetilase e ativação dos receptores acoplados à proteína G nas células epiteliais (216).

Dentre os gêneros produtores de butirato que se correlacionaram negativamente com calprotectina fecal, destaca-se o *Eubacterium*. Espécies de *Eubacterium*, como *Eubacterium halii* e *Eubacterium rectale*, são apontadas como marcadoras de saúde intestinal por colonizarem a camada de muco, aumentando a biodisponibilidade de butirato para colonócitos, e serem capazes de modular a inflamação no intestino por meio da promoção da integridade intestinal e regulação da resposta imune (217).

Nas correlações entre zonulina fecal e grupos microbianos, os gêneros *Tyzzarella*, *Acidaminococcus* e *Sutterella* apresentaram correlações positivas com este marcador.

A relação entre microrganismos e permeabilidade intestinal já é descrita em literatura. Sabe-se que o aumento de bactérias patogênicas no trato digestivo pode alterar a permeabilidade intestinal, por adesão e lesão à mucosa colônica e alterações na produção de mucina, modificando a diversidade e a composição da microbiota intestinal e levando à inflamação (218). Especialmente em pacientes com DII, a camada de muco é comprometida, permitindo que bactérias patogênicas penetrem e invadam as camadas submucosas, levando aos processos inflamatórios que resultam na lesão de mucosa. A destruição da mucosa, conseqüente à lesão inflamatória, expõe ainda mais a submucosa a estas bactérias, levando a um ciclo vicioso de exposição antigênica e dano subsequente (219, 220).

O enriquecimento de *Sutterella* é bastante documentado em pacientes com DII adultos e pediátricos, em especial no subtipo RCU (175, 220-222). A presença deste gênero em DII é negativamente correlacionada com remissão endoscópica e está associada à falha terapêutica (223).

Assim como identificado em nosso estudo, outros pesquisadores apontam que o mecanismo que associa *Sutterella* e gravidade de doença não está na indução da inflamação, mas no prejuízo à funcionalidade de barreira intestinal (224, 225). O mecanismo que relaciona aumento de *Sutterella* e aumento de permeabilidade intestinal é a sua capacidade de degradação de IgA. Espécies de *Sutterella* produzem proteases de IgA, que levam à degradação desta

importante imunoglobulina, criando um ambiente favorável à adesão de microrganismos patogênicos na mucosa intestinal, Além disso, *Sutterella* pode ativar os receptores de reconhecimento de padrões e induzir expressão de IL-8 e IL-13, citocinas com capacidade de afetar a integridade da barreira epitelial (226, 227).

Os gêneros *Acidaminococcus* e *Tyzzarella*, positivamente correlacionados com zonulina fecal, foram previamente identificados em pacientes com DII (227-230). Para *Acidaminococcus*, ainda não é descrito associação deste gênero com calprotectina e zonulina fecal. Todavia, estudo sugere que o aumento de *Acidaminococcus* pode se associar com inflamação intestinal por sua baixa capacidade em produzir AGCC, ao mesmo tempo em que produz metabólitos tóxicos, como o amoníaco, que podem contribuir para a inflamação (230). A literatura para *Tyzzarella* ainda é limitada, mas foi descrito que esse gênero está aumentado em pacientes com consumo de dieta “não saudável” e, em pacientes com DC, sua abundância foi associada com maior gravidade de doença (231). Os mecanismos que associam *Tyzzarella* com inflamação e permeabilidade intestinal, até o momento, não são explicados.

Em nosso estudo das associações entre microbiota, dieta, inflamação e permeabilidade, identificamos, de modo inédito, que dietas mais inflamatórias foram associadas com alterações em microbiota intestinal e aumento de calprotectina fecal.

Os nutrientes podem causar inflamação intestinal, mediando respostas imunes e induzindo secreção de citocinas (232). Estudo pioneiro em pacientes com DC levantou a hipótese de que dietas pró-inflamatórias poderiam estar associadas à atividade da doença, e modular a composição e funcionalidade do microbioma intestinal (233). Para remissão clínica, todavia, os dados na área ainda são escassos.

Na associação entre índice inflamatório de dieta e marcadores de inflamação, o nosso estudo foi o primeiro a identificar uma associação deste índice com a calprotectina fecal. Investigamos também a relação entre o IID com a proteína C-reativa (biomarcador de inflamação sistêmica), mas não encontramos associação entre os parâmetros. Em contraste, estudo na doença

de Crohn descobriu que pacientes com uma dieta mais pró-inflamatória apresentavam PCR mais alto (234).

Não foi encontrada associação entre índice inflamatório dietético, aumento de zonulina fecal (biomarcador de permeabilidade intestinal). Como já explanado nessa discussão, até o momento, poucos estudos investigaram as concentrações séricas e fecais de zonulina em pacientes com DII, e os resultados são conflitantes (95).

Nas alterações de MI por dieta inflamatória, o gênero *Veillonella* foi significativamente maior no quartil mais inflamatório, assim como foi identificado um comportamento entre dieta pró-inflamatória e aumento de sq35 *Bacteroides plebeius*, sq974 *Bacteroides uniformis*, sq161 *Parabacteroides distasonis*, sq110 *Prevotella copri* e sq702 *Veillonella rogosae*. Em estudo com pacientes com DC, o gênero *Veillonella* foi correlacionado com PCR, biomarcador de inflamação sistêmica (234). Na nossa população, *Veillonella* e *Veillonella rogosae* foram associadas ao aumento de calprotectina fecal. Como supracitado, *Veillonella* e suas espécies, como *Veillonella rogosae*, são capazes de promover inflamação intestinal (209).

Além da *Veillonella rogosae*, a sequência bacteriana sq219 *Parabacteroides distasonis* se correlacionou com maior nível de calprotectina fecal. Espécies do gênero *Parabacteroides* são, em sua maior parte, comensais na microbiota intestinal, enriquecidas por dietas ricas em carboidratos. Todavia, algumas variantes apresentam-se com potencial inflamatório e resistência bacteriana (235). Até o momento, não há relatos de associação entre essa variante específica com marcadores inflamatórios.

Três sequências bacterianas (sq1137, sq638 e sq411) da mesma espécie, *Dakarella massiliensis*, apresentaram correlação positiva com zonulina fecal. Esta espécie, isolada em 2017, ainda não foi amplamente estudada em relação à sua interação com o hospedeiro humano, não contemplando informações disponíveis com inflamação e permeabilidade intestinal. Todavia, é importante ressaltar que esta espécie pertence à família *Sutterellaceae* e tem 92,4% de similaridade genética com *Sutterella wadsworthensis* (236), espécie fortemente associada com aumento de permeabilidade intestinal (224, 225).

## 7.7 IMPACTO DAS VARIÁVEIS NA RECIDIVA DE DOENÇA

A remissão clínica, isto é, a ausência de sintomas, está entre os principais objetivos do tratamento das doenças inflamatórias intestinais. Manter o paciente em remissão, com sintomas controlados ou ausência de sintomas relacionados à doença, como dor abdominal, diarreia, sangramento retal, perda de peso e febre, está associado a melhor prognóstico da doença, uma vez que se reduz o risco de complicações, como estenoses intestinais, fístulas, abscessos e necessidade de cirurgias (146). Na busca de novas formas terapêuticas para manter o paciente com DII mais tempo em remissão, diferentes medicamentos e biomarcadores para diagnóstico e acompanhamento, como marcadores fecais de microbiota, inflamação e permeabilidade intestinal, vêm sendo estudados (237-239).

O nosso estudo buscou compreender se diferenças na composição de microbiota intestinal, bem como aumento nos níveis de calprotectina fecal, proteína C-reativa, zonulina fecal e inflamação de dieta, estavam associados com maior risco para recidiva de doença em seis e doze meses de acompanhamento. Como resultados, foram identificados perfis de microbiota associados à recidiva clínica, bem como aumento de calprotectina fecal como preditor para recidiva de doença.

Estudos mostram que a disbiose do microbioma intestinal pode estar envolvida na atividade e gravidade de doença em DII, com diferenças na composição de MI entre remissão clínica e atividade de doença (71, 74) e impacto da microbiota no curso desta condição clínica (240-242).

Para as análises de alfa diversidade, este parâmetro não diferiu entre os pacientes que recidivaram doença ou mantiveram remissão clínica. De modo discordante, para esta variável, estudo em pacientes com DII em terapia biológica identificou que pacientes com maior  $\alpha$ -diversidade apresentavam menor chance de recidiva (243).

Ainda que não tenham sido observadas modificações na diversidade, assim como em estudo prévio, importantes grupos bacterianos foram associados à recidiva de doença (29).

Na análise dos pacientes que recidivaram atividade de doença em seis meses, foram observadas reduzidas abundâncias iniciais de *Faecalibacterium prausnitzii*, bem como redução de espécies do gênero *Bacteroides* e *Eubacterium*. Estes mesmos achados foram evidenciados em estudo com pacientes com DC acompanhados durante 06 meses, em que a redução da espécie *Faecalibacterium prausnitzii* e do gênero *Bacteroides* previram recaída de doença, independentemente do alto nível de proteína C reativa (244).

A espécie *Faecalibacterium prausnitzii* tem papel-chave para a saúde intestinal da DII, por sua capacidade de produção de AGCC, propriedades anti-inflamatórias e imunorreguladoras (244, 245). Em metanálise com 231 pacientes com DC e 392 pacientes com RCU, a abundância de *F. prausnitzii* foi menor em pacientes com DC ativa e RCU do que naqueles em remissão, sugerindo que *F. prausnitzii* pode ser um marcador confiável para avaliar o risco para atividade da doença (246). De modo a corroborar estes achados, em estudo com pacientes com RCU, a abundância de *F. prausnitzii* foi associada à manutenção de remissão clínica (247).

Para as espécies produtoras de butirato e associadas à degradação de fibras, a literatura também mostra que estas estão reduzidas em RCU e DC (76) e, na população com DII, sua redução é associada à atividade de doença (246). Estudo em população com DC mostrou que a redução de membros das famílias *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae*, similares aos encontrados em nosso estudo, foram associados à recorrência de inflamação endoscópica (248).

Nas avaliações dos grupos bacterianos diferenciados entre pacientes que recidivaram ou mantiveram remissão clínica em 12 meses de acompanhamento, os pacientes que se mantiveram em remissão apresentavam maior quantidade de *Akkermansia muciniphila* e *Phascolarctobacterium succinatutens*, enquanto pacientes que recaíram tinham aumento de *Dakarella massiliensis* e *Duodenibacillus massiliensis*, espécies da família *Sutterellaceae*. É importante lembrar que estas espécies foram associadas a dietas mais inflamatórias e, nas análises de correlação, a espécie *Dakarella massiliensis* foi correlacionada ao aumento de zonulina fecal.

Assim como em nosso estudo, em pacientes pediátricos com DII, o aumento de espécies de *Sutterellaceae* foi associado com maior risco para

recaída (249). Como é de conhecimento, espécies de *Proteobacteria* têm a capacidade de aderir à mucosa intestinal, rompendo sua barreira e promovendo inflamação, bem como a capacidade de formar biofilmes, o que aumenta sua colonização persistente no ambiente intestinal (250). Estes mecanismos explicam o aumento de espécies deste filo em pacientes que não se mantiverem em remissão. Além disso, como previamente discutido, o aumento de *Sutterellaceae* pode se associar a atividade de doença, por sua capacidade de degradação de IgA (224, 225). Assim como em nosso estudo, pacientes com maior abundância de *Proteobacteria* foram mais fortemente correlacionados com maior gravidade de doença, enquanto *Lachnospiraceae* e *Faecalibacterium* foram associados à remissão clínica (251, 252).

Variantes de *Bacteroides vulgatus* e *Prevotella copri* também se manifestaram aumentados em pacientes que recidivaram a doença. Estudo recente em pacientes com DC relacionou a espécie *Bacteroides vulgatus* à gravidade da doença (253). Variantes de *Bacteroides vulgatus* têm atividades de protease, que podem repercutir em lesão tecidual e respostas inflamatórias (253). Assim, os autores sugerem que a inibição da protease de *B. vulgatus* pode ser uma possível abordagem terapêutica para tratamento de DII, especialmente RCU.

Como visto nos resultados em que cepas diferentes ocasionaram desfechos também diferentes, os dados para *Prevotella* e *Prevotella copri*, espécie mais representativa deste gênero na microbiota intestinal, ainda são conflitantes. Em quantidades ideais sua presença na microbiota é associada à melhora do metabolismo da glicose. Todavia, o aumento da sua abundância é associado a distúrbios inflamatórios (254).

Foi demonstrado que a *Prevotella* exerce seu efeito pró-inflamatório pela ativação do Toll-like receptor 4 (TLR-4), por meio da produção de LPS e pela diminuição da expressão colônica de IL-18. Além disso, a *Prevotella* pode aumentar permeabilidade intestinal, por sua capacidade de produção de enzimas que degradam a mucina (254, 255).

Estes resultados discordantes demonstram a necessidade de avaliar o papel da *Prevotella* a partir das suas variantes (256). Em DII, o que determinará se *Prevotella copri* é benéfica ou deletéria provavelmente dependerá do contexto

de interações entre microrganismos e substratos, requerendo mais investigações (257, 258).

Outro importante marcador de saúde intestinal associado a recaída de doença em 12 meses foi a espécie *Akkermansia muciniphila*. A redução desta espécie já foi identificada na população com DII, especialmente em RCU, em remissão clínica (30) e fase ativa de doença (259, 260). *A. muciniphila* tem importante papel na homeostase intestinal, por sua capacidade de degradar mucina, produzindo acetato e propionato, ao mesmo tempo que protege as células epiteliais de ataques de patógenos via produção de IgG (261, 262).

Por tais mecanismos, reduzida abundância de *Akkermansia* compromete a mucosa e promove resposta inflamatória crônica, enquanto níveis adequados atuam como agentes terapêuticos nas disfunções metabólicas e imunomediadas (263). O benefício da *Akkermansia* na manutenção de remissão pode ser observado em modelo experimental em que a administração desta cepa melhorou RCU induzida por sulfato de sódio dextrano (264).

Os dados para microbiota intestinal que diferenciam remissão clínica e recidiva de doença em seis e doze meses apoiam o entendimento que padrões de disbiose, na fase de remissão, podem propiciar inflamação e deixar esses indivíduos mais propensos para recaída. Estes achados apontam para a necessidade de uma avaliação mais aprofundada do microbioma em pacientes durante a remissão, de modo a desenhar estratégias de modulação da microbiota, que podem incluir o uso de prebióticos, probióticos e simbióticos até o transplante de microbiota fecal para ambientes altamente disbióticos (265, 266), embora tais estratégias ainda necessitam ser validadas em estudos prospectivos. Conhecer e modular a microbiota desta população tem o potencial de aumentar a eficácia do tratamento para DII e manter um maior tempo de remissão (245).

Além da avaliação das variáveis microbianas associadas à recidiva de doença, o estudo também identificou calprotectina fecal, zonulina fecal e índice inflamatório de dieta como preditores de risco para recidiva clínica em seis meses e doze meses de acompanhamento, todavia com maior força de predição para calprotectina fecal.

Para o índice inflamatório da dieta, estudos relatam que dieta pró-inflamatória é associada a maior atividade da doença em pacientes com DII (203, 267). Da mesma forma, elevados níveis de zonulina fecal também foram identificados nesta população (183, 184), embora não tenha sido avaliado seu papel na predição de recidiva. De modo inédito, o nosso estudo traz as relações entre dieta, calprotectina fecal e zonulina fecal, buscando compreender melhor a relação destas variáveis com as doenças inflamatórias intestinais.

Em nosso estudo, maiores níveis séricos de PCR foram encontrados nos pacientes que recidivaram doença, mas este biomarcador não foi capaz de prever recidiva. A PCR é um biomarcador muito utilizado na triagem e avaliação da atividade da doença, recidiva clínica e capacidade de resposta ao tratamento em DII (268). No entanto, vale lembrar que PCR sérica elevada não é exclusiva da inflamação intestinal, ocorrendo em resposta a diversos distúrbios inflamatórios sistêmicos (34, 193).

A calprotectina, biomarcador associado à predição de doença em nosso estudo, é uma proteína citoplasmática encontrada em neutrófilos e liberada para o ambiente extracelular na ocorrência de respostas inflamatórias após a ativação ou necrose de neutrófilos e induz a quimiotaxia e adesão de neutrófilo (269). Encontrada em altas concentrações no paciente em fase ativa de doença, a calprotectina é amplamente utilizada para monitorar a atividade da doença e para prever recidiva em pacientes com DII, apresentando excelente acurácia, comparado a colonoscopia, padrão ouro para diagnóstico e acompanhamento da DII (39, 268, 269). Nossos dados validam estudos prévios que apontam a calprotectina como marcador de atividade de doença, com boa correlação com escore clínico de Mayo e marcador substituto para colonoscopia (270, 271).

## 7.5 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

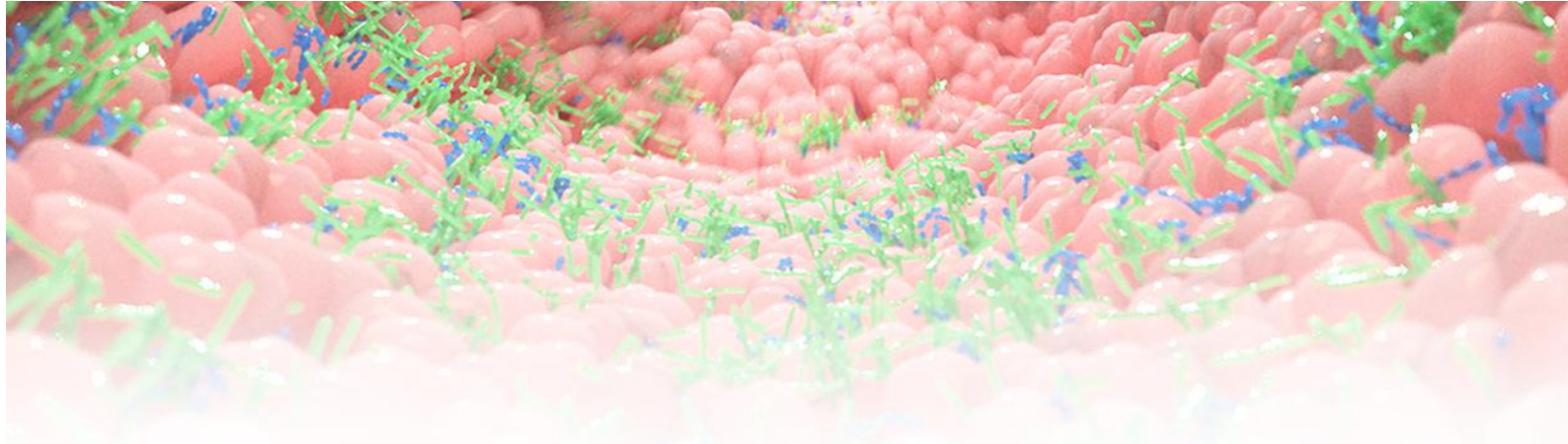
O presente estudo apresenta limitações que merecem ser destacadas. Como o tamanho amostral relativamente pequeno, particularmente dentro de subgrupos, requer cautela ao interpretar nossos achados. Além disso, os pacientes não tiveram avaliação endoscópica e, portanto, a remissão clínica foi obtida através de escores parciais. Outra limitação encontrada foi a diferença em



faixa etária (com pacientes com DII exibindo média de idade superior ao grupo controle, todavia com média para ambos os grupos, enquadrando-os na faixa etária adulta).

Apesar dessas limitações, nossos achados fornecem importantes evidências nas conexões entre microbiota intestinal, marcadores de inflamação e permeabilidade intestinal e dieta no curso das doenças inflamatórias intestinais em remissão clínica. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo em pacientes com DII (em remissão e fase ativa de doença) que investigou as correlações entre estas variáveis.

Estas descobertas abrem oportunidades para novos estudos longitudinais, com maior tempo de seguimento e realizações de exames de microbiota intestinal, inflamação e permeabilidade em mais de um momento, para investigar o impacto destas variáveis no curso das doenças.



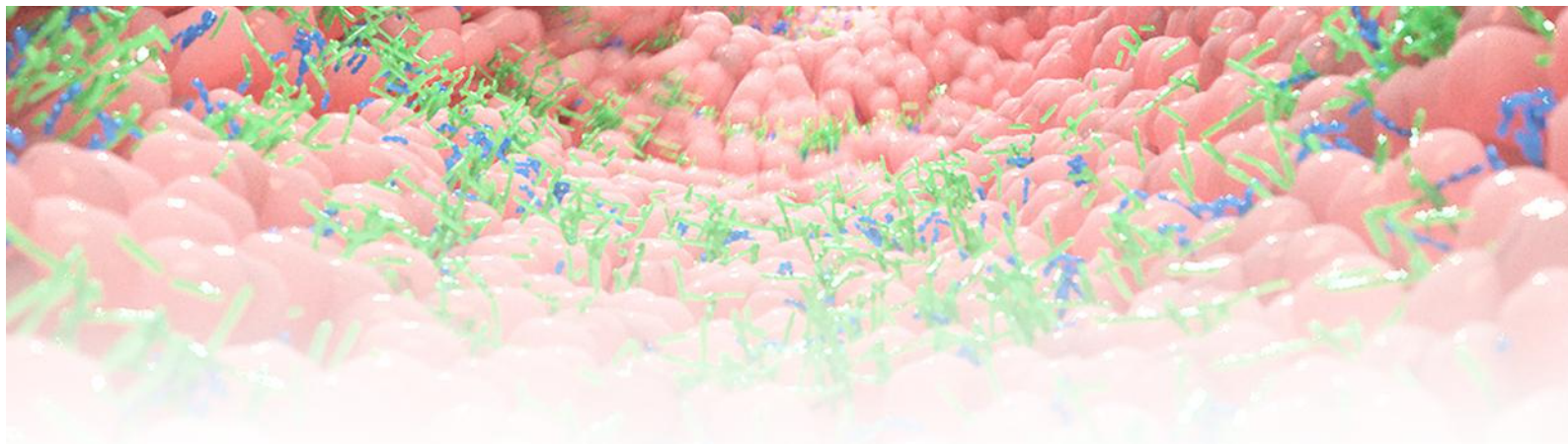
## **8. CONCLUSÃO**

## 8. CONCLUSÃO

Nas condições da presente, pesquisa encontramos conexões entre microbiota intestinal, inflamação intestinal e permeabilidade intestinal em pacientes com doenças inflamatórias intestinais. A partir dos resultados do estudo foi possível concluir:

- Pacientes com doenças inflamatórias intestinais, ainda que em remissão clínica, apresentam desequilíbrios na microbiota intestinal, caracterizado pela redução da alfa diversidade de microrganismos, redução de família e gêneros reconhecidamente benéficos, como *Lachnospiraceae*, e enriquecimento do filo *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Fusobacteria*.
- Pacientes com DII não apenas apresentam diferentes composições de MI quando comparados a indivíduos saudáveis, como apresentaram composições distintas dentro dos subgrupos DC e RCU.
- Pacientes com DII apresentam níveis de zonulina fecal significativamente superiores ao grupo controle saudável.
- Para a população com DII, a zonulina fecal apresentou excelente desempenho como biomarcador de permeabilidade intestinal nos pacientes em remissão clínica, negativamente correlacionado com níveis séricos de vitamina D e com níveis influenciados pelo aumento de calprotectina fecal, reforçando a ligação entre inflamação local e ruptura da barreira intestinal.
- No estudo da relação entre dieta pró-inflamatória, MI e inflamação, foi descrito aumento de *Veillonella* e *Veillonella rogosae*, bem como aumento de calprotectina fecal nos quartis mais inflamatórios, reforçando o papel da dieta na composição da microbiota intestinal e inflamação local.
- Na avaliação dos fatores preditores para recidiva de doença, a diversidade microbiana não impactou tal parâmetro, todavia a redução de espécies bacterianas importantes, como *Akkermansia muciniphila* e *Faecalibacterium prausnitzii*, mostrou influenciar neste desfecho.
- A calprotectina fecal, a zonulina fecal e o índice inflamatório de dieta também foram preditores de risco para recidiva clínica em seis e doze meses de acompanhamento, todavia com maior força de predição para calprotectina fecal.

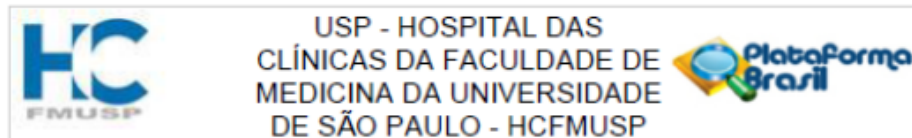
Para os próximos estudos, espera-se que avanços na tecnologia de sequenciamento genético e plataformas analíticas ampliem nossa compreensão das perturbações de interface microbiota-inflamação-permeabilidade em pacientes com DII, bem como impulsionem a identificação de potenciais alvos terapêuticos a partir destes biomarcadores.



**ANEXOS**

## ANEXOS

**Anexo 1.** Parecer consubstanciado da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – HC FMUSP.



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DA EMENDA**

**Título da Pesquisa:** Estudo VALIDYS: Validação de uma ferramenta para rastreamento do risco de disbiose e caracterização da microbiota intestinal sadia e enferma.

**Pesquisador:** Dan Linetzky Waitzberg

**Área Temática:**

**Versão:** 8

**CAAE:** 01713018.0.0000.0068

**Instituição Proponente:** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 4.082.713

**Apresentação do Projeto:**

Nova documentação foi enviada

**Objetivo da Pesquisa:**

Trata-se de Emenda referente a subprojeto de Doutorado de aluna Ilanna Marques Gomes da Rocha.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Sem alterações

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O subprojeto é regular e o novo projeto foi corretamente elaborado

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Não se aplica

**Recomendações:**

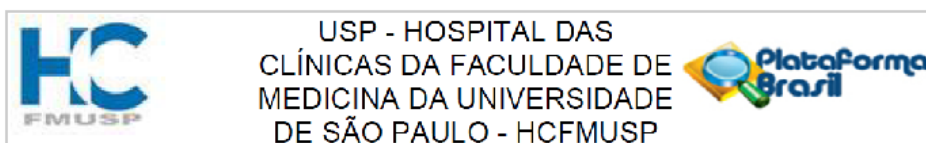
Não há

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há pendências

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
 Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010  
 UF: SP Município: SAO PAULO  
 Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 4.082.713

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_156572_2_E6.pdf	27/05/2020 21:58:35		Aceito
Outros	FORMULARIO_PARA_SUBMISSAO_D E_EMENDAS_IlannaMarques.pdf	27/05/2020 21:55:54	Dan Linetzky Waitzberg	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Doutorado_Ilanna_Marques_DII_260520.pdf	27/05/2020 21:55:01	Dan Linetzky Waitzberg	Aceito
Cronograma	Cronograma_Doutorado_Ilanna_Marques_DII_260520.pdf	27/05/2020 21:49:48	Dan Linetzky Waitzberg	Aceito
Outros	pacias.pdf	26/02/2020 16:48:01	Dan Linetzky Waitzberg	Aceito
Outros	Relatorio_parcial_estudovalidys.pdf	12/12/2019 17:49:25	Dan Linetzky Waitzberg	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_21102018.pdf	23/10/2018 15:58:27	Dan Linetzky Waitzberg	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_final231018.pdf	23/10/2018 14:43:07	Dan Linetzky Waitzberg	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

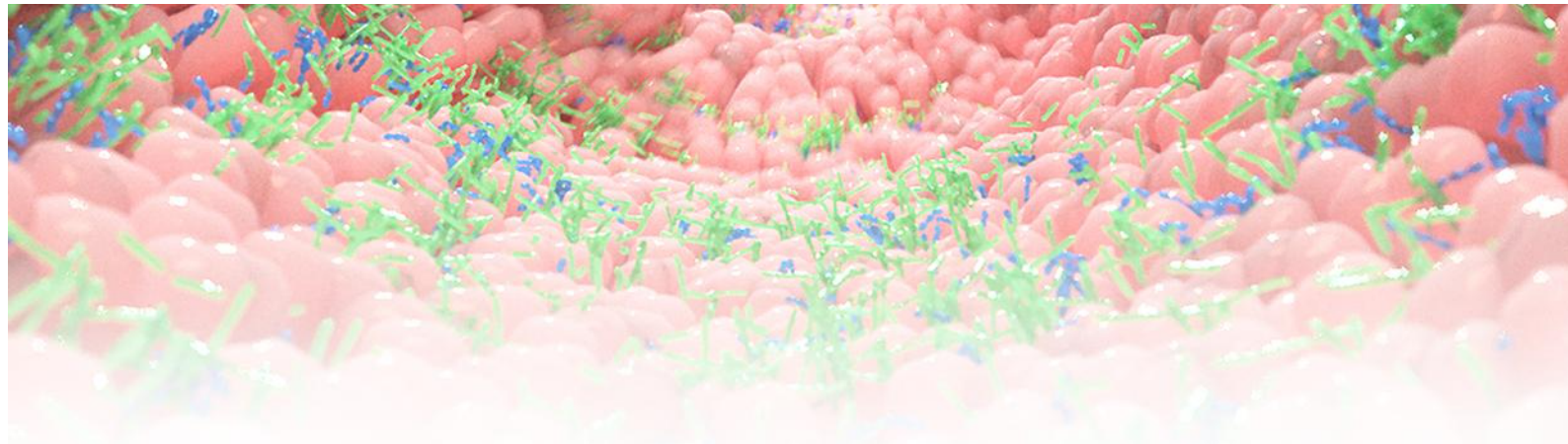
**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 10 de Junho de 2020

Assinado por:  
**ALFREDO JOSE MANSUR**  
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
 Bairro: Cerqueira César CEP: 05.403-010  
 UF: SP Município: SAO PAULO  
 Telefone: (11)2551-7585 Fax: (11)2551-7585 E-mail: caopesq.adm@hc.fm.usp.br



## **REFERÊNCIAS**



**REFERÊNCIAS**

1. Fiocchi C. Inflammatory Bowel Disease: Complexity and Variability Need Integration. *Front. Med.* 2018; 5:75.
2. Furey TS, Sethupathy P, Sheikh SZ. Redefining the IBDs using genome-scale molecular phenotyping. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019 May;16(5):296-311.
3. Ungaro R, Mehandru S, Allen PB.; Peyrin-Biroulet, L.; Colombel, J.F. Ulcerative colitis. *Lancet.* 2017; 389; 1756–1770.
4. Torres J, Mehandru S, Colombel JF, Peyrin-Biroulet, L. Crohn's disease. *Lancet.* 2017; 389: 1741–1755.
5. Harris KG, Chang EB. The intestinal microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases: New insights into complex disease. *Clin. Sci.* 2018; 132: 2013–2028.
6. AGA Patient Information Section. Inflammatory Bowel Disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2017; 15: A21.
7. Kudelka MR, Stowell SR, Cummings RD, Neish AS. Intestinal epithelial glycosylation in homeostasis and gut microbiota interactions in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2020;17(10):597-617.
8. Park J, Cheon JH. Incidence and Prevalence of Inflammatory Bowel Disease across Asia. *Yonsei Med J.* 2021;62(2):99-108.
9. Ananthakrishnan AN, Bernstein CN, Iliopoulos D, Macpherson A, Neurath MF, Ali RAR et al. Environmental triggers in IBD: a review of progress and evidence. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018;15(1):39-49.
10. Rapozo DCM, Bernardazzi C, de Souza HSP. Diet and microbiota in inflammatory bowel disease: The gut in disharmony. *World J Gastroenterol* 2017; 23(12): 2124-2140.

11. Chiba M, Nakane K, Komatsu M. Westernized Diet is the Most Ubiquitous Environmental Factor in Inflammatory Bowel Disease. *Perm J*. 2019; 23:18-107.
12. Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet*. 2017;390(10114):2769-2778.
13. Zuo T, Kamm MA, Colombel JF, Ng SC. Urbanization and the gut microbiota in health and inflammatory bowel disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018;15(7):440-452.
14. Butel MJ, Waligora-Dupriet AJ, Wydau-Dematteis S. The developing gut microbiota and its consequences for health. *J Dev Orig Health Dis*. 2018;9(6):590-597.
15. Schwartz DJ, Langdon AE, Dantas G. Understanding the impact of antibiotic perturbation on the human microbiome. *Genome Med*. 2020;12(1):82.
16. Almeida A, Mitchell AL, Boland M, Forster SC, Gloor GB, Tarkowska A. A new genomic blueprint of the human gut microbiota. *Nature*. 2019; 568(7753):499-504.
17. Chen L, Wang J. Gut microbiota and inflammatory bowel disease. *WIREs Mech Dis*. 2022;14(2): e1540.
18. Adak A, Khan MR. An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cell Mol Life Sci*. 2019; 76(3):473-493.
19. Pickard JM, Zeng MY, Caruso R, Núñez G. Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunol Rev*. 2017 Sep;279(1):70-89.
20. Lynch SV, Pedersen O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *N Engl J Med*. 2016;375(24):2369-2379.

21. 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):410-422.
22. Hirata Y, Ihara S, Koike K. Targeting the complex interactions between microbiota, host epithelial and immune cells in inflammatory bowel disease. *Pharmacol Res.* 2016;113(Pt A):574-584.
23. Ryan FJ, Ahern AM, Fitzgerald RS, Laserna-Mendieta EJ, Power EM, Clooney AG et al. Colonic microbiota is associated with inflammation and host epigenomic alterations in inflammatory bowel disease. *Nat Commun.* 2020; 23;11(1):1512.
24. Stange EF, Schroeder BO. Microbiota and mucosal defense in IBD: an update. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019;13(10):963-976.
25. Matsuoka K, Kanai T. The gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Semin Immunopathol.* 2015;37(1):47-55.
26. Tedjo DI, Smolinska A, Savelkoul PH, Masclee AA, van Schooten FJ, Pierik MJ, Penders J, Jonkers DM. The fecal microbiota as a biomarker for disease activity in Crohn's disease. *Sci Rep.* 2016; 6:35216.
27. Guo XY, Liu XJ, Hao JY. Gut microbiota in ulcerative colitis: insights on pathogenesis and treatment. *J Dig Dis.* 2020;21(3):147-159.
28. Zheng J, Sun Q, Zhang J, Ng SC. The role of gut microbiome in inflammatory bowel disease diagnosis and prognosis. *United European Gastroenterol J.* 2022 Dec;10(10):1091-1102.
29. Pisani A, Rausch P, Bang C, Ellul S, Tabone T, Marantidis Cordina C et al. Dysbiosis in the Gut Microbiota in Patients with Inflammatory Bowel Disease during Remission. *Microbiol Spectr.* 2022; 10(3):e0061622.
30. Rajilić-Stojanović M, Shanahan F, Guarner F, de Vos WM. Phylogenetic analysis of dysbiosis in ulcerative colitis during remission. *Inflamm Bowel Dis.* 2013;19(3):481-8.

31. Wang W, Chen L, Zhou R, Wang X, Song L, Huang S, Wang G, Xia B. Increased proportions of Bifidobacterium and the Lactobacillus group and loss of butyrate-producing bacteria in inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol.* 2014; 52(2):398-406.
32. Magro DO, Santos A, Guadagnini D, de Godoy FM, Silva SHM, Lemos WJF et al. Remission in Crohn's disease is accompanied by alterations in the gut microbiota and mucins production. *Sci Rep.* 2019 Sep 13;9(1):13263.
33. Gkikas K, Gerasimidis K, Milling S, Ijaz UZ, Hansen R, Russell RK. Dietary Strategies for Maintenance of Clinical Remission in Inflammatory Bowel Diseases: Are We There Yet? *Nutrients.* 2020;12(7):2018.
34. Guo X, Huang C, Xu J, Xu H, Liu L et al. Gut Microbiota Is a Potential Biomarker in Inflammatory Bowel Disease. *Front Nutr.* 2022; 8:818902.
35. Tian Z, Zhuang X, Zhao M, Zhuo S, Li X, Ma R et al. Index-Based Dietary Patterns and Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review of Observational Studies. *Adv Nutr.* 2021;12(6):2288-2300.
36. Lacombe LAC, Matiollo C, Rosa JSD, Felisberto M, Dalmarco EM, Schiavon LL. Factors Associated with circulating zonulin in Inflammatory Bowel Disease. *Arq Gastroenterol.* 2022;59(2):238-243.
37. Wegh CAM, de Roos NM, Hovenier R, Meijerink J, Besseling-van der Vaart I, van Hemert S et al. Intestinal Permeability Measured by Urinary Sucrose Excretion Correlates with Serum Zonulin and Faecal Calprotectin Concentrations in UC Patients in Remission. *J Nutr Metab.* 2019; 2019:2472754.
38. GBD 2017 Inflammatory Bowel Disease Collaborators. The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2020;5(1):17-30.
39. Maaser C, Sturm A, Vavricka SR, Kucharzik T, Fiorino G, Annese V et al. European Crohn's and Colitis Organisation [ECCO] and the European Society

- of Gastrointestinal and Abdominal Radiology [ESGAR]. ECCO-ESGAR Guideline for Diagnostic Assessment in IBD Part 1: Initial diagnosis, monitoring of known IBD, detection of complications. *J Crohns Colitis*. 2019; 13(2):144-164.
40. Salvucci, E. The human-microbiome superorganism and its modulation to restore health. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 2019; 70: 781–795
41. Dahlhamer JM, Zammitti EP, Ward BW, Wheaton AG, Croft JB. Prevalence of Inflammatory Bowel Disease Among Adults Aged  $\geq 18$  Years - United States, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2016; 65(42):1166-1169.
42. Sugihara K, Kamada N. Diet-Microbiota Interactions in Inflammatory Bowel Disease. *Nutrients*. 2021;13(5):1533.
43. Saez A, Herrero-Fernandez B, Gomez-Bris R, Sánchez-Martinez H, Gonzalez-Granado JM. Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease: Innate Immune System. *Int J Mol Sci.* 2023; 24(2):1526.
44. Neurath MF, Leppkes M. Resolution of ulcerative colitis. *Semin Immunopathol.* 2019;41(6):747-756.
45. Dinallo V, Marafini I, Di Fusco D, Laudisi F, Franzè E, Di Grazia A, Figliuzzi MM, Caprioli F, Stolfi C, Monteleone I, Monteleone G. Neutrophil Extracellular Traps Sustain Inflammatory Signals in Ulcerative Colitis. *J Crohns Colitis.* 2019;13(6):772-784.
46. Kaur A, Goggolidou P. Ulcerative colitis: understanding its cellular pathology could provide insights into novel therapies. *J Inflamm (Lond).* 2020; 17:15.
47. Jorch, S. K., & Kubes, P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nature medicine.* 2017; 23(3): 279-287
48. Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, Relman DA. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol.* 2008;6(11): e280.

49. Shaw SY, Blanchard JF, Bernstein CN. Association between the use of antibiotics in the first year of life and pediatric inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 2010;105(12):2687-92.
50. Shaw SY, Blanchard JF, Bernstein CN. Association between the use of antibiotics and new diagnoses of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol.* 2011;106(12):2133-42.
51. Klement E, Cohen RV, Boxman J, Joseph A, Reif S. Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review with meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 2004;80(5):1342-52.
52. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature.* 2014; 505(7484):559-63.
53. Lewis JD, Abreu MT. Diet as a Trigger or Therapy for Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology.* 2017;152(2):398-414.e6.
54. Brown K, DeCoffe D, Molcan E, Gibson DL. Diet-induced dysbiosis of the intestinal microbiota and the effects on immunity and disease. *Nutrients.* 2012 Aug;4(8):1095-119.
55. Hooper KM, Barlow PG, Stevens C, Henderson P. Inflammatory Bowel Disease Drugs: A Focus on Autophagy. *J Crohns Colitis.* 2017;11(1):118-127.
56. Hirata, Y.; Ihara, S.; Koike, K. Targeting the complex interactions between microbiota: Host epithelial and immune cells in inflammatory bowel disease. *Pharmacol. Res.* 2016, 113, 574–584.
57. Tanida S, Mizoshita T, Ozeki K, Katano T, Kataoka H, Kamiya T, Joh T. Advances in refractory ulcerative colitis treatment: A new therapeutic target, Annexin A2. *World J Gastroenterol.* 2015;21(29):8776–8786.

58. Seyedian SS, Nokhostin F, Malamir MD. A review of the diagnosis, prevention, and treatment methods of inflammatory bowel disease. *J Med Life*. 2019; 12(2):113-122.
59. Glassner KL, Abraham BP, Quigley EMM. The microbiome and inflammatory bowel disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;145(1):16-27.
60. Davenport ER, Sanders JG, Song SJ, Amato KR, Clark AG, Knight R. The human microbiome in evolution. *BMC Biol*. 2017;15(1):127.
61. Roswall J, Olsson LM, Kovatcheva-Datchary P, Nilsson S, Tremaroli V, Simon MC et al. Developmental trajectory of the healthy human gut microbiota during the first 5 years of life. *Cell Host Microbe*. 2021; 29(5):765-776.e3.
62. Robertson RC. The gut microbiome in child malnutrition. *Global Landscape of Nutrition Challenges in Infants and Children*. 93: USA: Karger Publishers, 2020: 133-44.
63. Jensen EA, Young JA, Mathes SC, List EO, Carroll RK, Kuhn J, et al. Crosstalk between the growth hormone/insulin-like growth factor-1 axis and the gut microbiome: A new frontier for microbial endocrinology. *Growth Horm IGF Research*. 2020; 53-54:101333.
64. Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, Feng Q, Jia H, Kovatcheva-Datchary P et al. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host Microbe*. 2015;17(5):690-703.
65. Stewart CJ, Ajami NJ, O'Brien JL, Hutchinson DS, Smith D, Wong MC et al. et al. Temporal development of the gut microbiome in early childhood from the TEDDY study. *Nat. Cell Biol*. 2018; 562: 583–588.
66. Zhuang L, Chen H, Zhang S, Zhuang J, Li Q, Feng Z. Intestinal microbiota in early life and its implications on childhood health. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2019; 17:13-25.

67. Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrone F, Mahony J et al. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2017; 81: e00036-17.
68. Balakrishnan B, Taneja V. Microbial modulation of the gut microbiome for treating autoimmune diseases. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018; 12:985-96.
69. Rothschild D, Weissbrod O, Barkan E, Kurilshikov A, Korem T, Zeevi D, et al. Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Nature* 2018; 555:210-215.
70. Yamashiro Y. Gut Microbiota in Health and Disease. *Ann Nutr Metab.* 2018;71(3-544 4):242-246.
71. Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J.* 2017;474(11):1823-1836.
72. Ni J, Wu GD, Albenberg L, Tomov VT. Gut microbiota and IBD: causation or correlation? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017; 14:573-584
73. Halfvarson J, Brislawn CJ, Lamendella R, Vázquez-Baeza Y, Walters WA, Bramer LM et al. Dynamics of the human gut microbiome in inflammatory bowel disease. *Nat Microbiol.* 2017;2:17004.
74. Shin NR, Whon TW, Bae JW. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol.* 2015;33(9):496-503.
75. Zuo T, Ng SC. The Gut Microbiota in the Pathogenesis and Therapeutics of Inflammatory Bowel Disease. *Front Microbiol.* 2018; 9:2247.
76. Machiels K, Joossens M, Sabino J, De Preter V, Arijis I, Eeckhaut V, et al. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut.* 2014; 63(8): 1275– 83.



77. Neurath MF. Host-microbiota interactions in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020; 17(2): 76– 7.
78. Palmela C, Chevarin C, Xu Z, Torres J, Sevrin G, Hirten R, et al. Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2018; 67(3): 574– 87.
79. Henke Matthew T, Kenny Douglas J, Cassilly Chelsi D, Vlamakis H, Xavier Ramnik J, Clardy J. *Ruminococcus gnavus*, a member of the human gut microbiome associated with Crohn’s disease, produces an inflammatory polysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019; 116(26): 12672– 7.
80. Liu H, Hong XL, Sun TT, Huang XW, Wang JL, Xiong H. *Fusobacterium nucleatum* exacerbates colitis by damaging epithelial barriers and inducing aberrant inflammation. *J Dig Dis*. 2020; 21(7): 385– 98.
81. Schirmer M, Garner A, Vlamakis H, Xavier RJ. Microbial genes and pathways in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Microbiol*. 2019;17(8):497-511.
82. Sun M, Wu W, Liu Z, Cong Y. Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases. *J Gastroenterol*. 2017;52(1):1-8.
83. Bach Knudsen KE, Lærke HN, Hedemann MS, Nielsen TS, Ingerslev AK, Gundelund Nielsen DS et al. Impact of Diet-Modulated Butyrate Production on Intestinal Barrier Function and Inflammation. *Nutrients*. 2018 Oct 13;10(10):1499.
84. Sitkin S, Pokrotnieks J. Clinical Potential of Anti-inflammatory Effects of *Faecalibacterium prausnitzii* and Butyrate in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2019;25(4):e40-e41.
85. Zhu R, He P, Liu Z, Liu N, Miao Y, Yu C et al. Editorial: Microbiome in IBD: From Composition to Therapy. *Front Pharmacol*. 2021 Jun 24; 12:721992.
86. Pascal V, Pozuelo M, Borrueal N, Casellas F, Campos D, Santiago A, Martinez X, Varela E, Sarrabayrouse G, Machiels K, Vermeire S, Sokol H, Guarner F,

- Manichanh C. A microbial signature for Crohn's disease. *Gut*. 2017; 66(5):813-822.
87. Lloyd-Price J, Arze C, Ananthakrishnan AN, Schirmer M, Avila-Pacheco J, Poon TW et al. Multi-omics of the gut microbial ecosystem in inflammatory bowel diseases. *Nature*. 2019; 569(7758):655-662.
88. Schäffler H, Herlemann DPR, Alberts C, Kaschitzki A, Bodammer P, Bannert K et al. Mucosa-attached bacterial community in Crohn's disease coheres with the clinical disease activity index. *Environ Microbiol Rep*. 2016;8(5):614-621.
89. Shawki A, McCole DF. Mechanisms of Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction by Adherent-Invasive Escherichia coli. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2016; 3(1):41-50.
90. Melhem H, Regan-Komito D, Niess JH. Mucins Dynamics in Physiological and Pathological Conditions. *Int J Mol Sci*. 2021;22(24):13642.
91. Schoultz I, Keita ÅV. Cellular and Molecular Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease-Focusing on Intestinal Barrier Function. *Cells*. 2019;8(2):193.
92. Paone P, Cani PD. Mucus barrier, mucins and gut microbiota: the expected slimy partners? *Gut*. 2020;69(12):2232-2243
93. Coufal S, Galanova N, Bajer L, Gajdarova Z, Schierova D, Jiraskova et al. Inflammatory Bowel Disease Types Differ in Markers of Inflammation, Gut Barrier and in Specific Anti-Bacterial Response. *Cells*. 2019; 8(7):719
94. Fasano A, Not T, Wang W, Uzzau S, Berti I, Tommasini A, Goldblum Se: Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. *Lancet*; 2000; 355: 1518-1519.
95. Fasano A. All disease begins in the (leaky) gut: role of zonulin-mediated gut permeability in the pathogenesis of some chronic inflammatory diseases. *F1000Res*. 2020;9: F1000 Faculty Rev-69.

96. Fasano A. Leaky gut and autoimmune diseases. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2012; 42(1):71-8.
97. Fasano A. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiol Rev* 2011; 91:151-75.
98. Jukic A, Bakiri L, Wagner EF, Tilg H, Adolph TE. Calprotectin: from biomarker to biological function. *Gut.* 2021;70(10):1978-1988.
99. Khalil H, Sherwood P. PTH-034 Do faecal calprotectin levels influence colonoscopy rates? *Gut* 2018; 67: A29.
100. Walsham NE, Sherwood RA. Fecal calprotectin in inflammatory bowel disease. *Clin. Exp. Gastroenterol;* 2016.; 9, 21–29.
101. Motaganahalli S, Beswick L, Con D, van Langenberg DR. Faecal calprotectin delivers on convenience, cost reduction and clinical decision-making in inflammatory bowel disease: a real-world cohort study. *Intern Med J.* 2019; 49: 94– 100.
102. Mumolo MG, Bertani L, Ceccarelli L, Laino G, Fluri GD, Albano E, et al. From bench to bedside: fecal calprotectin in inflammatory bowel diseases clinical setting. *World J Gastroenterol.* 2018; 24: 3681– 94.
103. D'Amico F, Nancey S, Danese S, Peyrin-Biroulet L. A practical guide for faecal calprotectin measurement: myths and realities. *J Crohns Colitis.* 2021; 15(1): 152– 61.
104. Toyonaga T, Kobayashi T, Nakano M, Saito E, Umeda S, Okabayashi S. Usefulness of fecal calprotectin for the early prediction of short-term outcomes of remission-induction treatments in ulcerative colitis in comparison with two-item patient-reported outcome. *PloS One.* 2017; 12:e0185131.
105. Guardiola J, Lobaton T, Rodriguez-Alonso L, Ruiz-Cerulla A, Arajol C, Loayza C et al. Fecal level of calprotectin identifies histologic inflammation in

- patients with ulcerative colitis in clinical and endoscopic remission, *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2014; 12 (11): 1865e1870.
106. Mao R, Xiao Y-lian, Gao X, et al. Fecal calprotectin in predicting relapse of inflammatory bowel diseases: a meta-analysis of prospective studies. *Inflamm Bowel Dis* 2012;18:1894–9.
107. Toke N, Ramaswamy P, Panackel C. IDDF2019-ABS-0346 Utility of inflammatory markers in the management of inflammatory bowel disease and their correlation with disease activity indices. *Gut* 2019;68:A122–A22.
108. De Vos M, Louis EJ, Jahnsen J, et al. Consecutive fecal calprotectin measurements to predict relapse in patients with ulcerative colitis receiving infliximab maintenance therapy. *Inflamm Bowel Dis* 2013; 19:2111–7.
109. Lobatón T, Rodríguez-Moranta F, Lopez A, et al. A new rapid quantitative test for fecal calprotectin predicts endoscopic activity in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2013; 19:1034–42.
110. Scaldaferri F, Pizzoferrato M, Lopetuso LR, Musca T, Ingravalle F, Sicignano LL et al. Nutrition and IBD: Malnutrition and/or Sarcopenia? A ;
111. Balestrieri P, Ribolsi M, Guarino MPL, Emerenziani S, Altomare A, Cicala M. Nutritional Aspects in Inflammatory Bowel Diseases. *Nutrients.* 2020 Jan 31;12(2):372.
112. Singh S, Picardo S, Seow CH. Management of Inflammatory Bowel Diseases in Special Populations: Obese, Old, or Obstetric. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2020;18(6):1367-1380
113. Schreiner P, Martinho-Grueber M, Studerus D, Vavricka SR, Tilg H, Biedermann L; on behalf of Swiss IBDnet, an official working group of the Swiss Society of Gastroenterology. Nutrition in Inflammatory Bowel Disease. *Digestion.* 2020;101 Suppl 1:120-135.

114. Dhaliwal A, Quinlan JI, Overthrow K, Greig C, Lord JM, Armstrong MJ, Cooper SC. Sarcopenia in Inflammatory Bowel Disease: A Narrative Overview. *Nutrients*. 2021;13(2):656.
115. Nardone OM, de Sire R, Petito V, Testa A, Villani G, Scaldaferri F et al. Inflammatory Bowel Diseases and Sarcopenia: The Role of Inflammation and Gut Microbiota in the Development of Muscle Failure. *Front Immunol*. 2021 Jul 13;12:694217.
116. Cioffi I, Imperatore N, Di Vincenzo O, Pagano MC, Santarpia L, Pellegrini L, et al. Evaluation of Nutritional Adequacy in Adult Patients With Crohn's Disease: A Cross-Sectional Study. *Eur J Nutr*. 2020; 59:3647–58.
117. Khalili H, Chan SSM, Lochhead P, Ananthakrishnan AN, Hart AR, Chan AT. The role of diet in the aetiopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018; 15(9):525-535
118. Witkowski M, Witkowski M, Gagliani N, Huber S. Recipe for IBD: can we use food to control inflammatory bowel disease? *Semin Immunopathol*. 2018; 40(2):145-156.
119. Guevara M, Salamanca-Fernández E, Miqueleiz E, Gavrila D, Amiano P, Bonet C et al. Inflammatory Potential of the Diet and Incidence of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis in the EPIC-Spain Cohort. . 2021; 13(7):2201.
120. Desai MS, Seekatz AM, Koropatkin NM, Kamada N, Hickey CA, Wolter M et al. A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. *Cell*. 2016; 167(5):1339-1353.e21.
121. Vissers E, Wellens J, Sabino J. Ultra-processed foods as a possible culprit for the rising prevalence of inflammatory bowel diseases. *Front Med*. 2022; 9:1058373.
122. Ananthakrishnan AN, Khalili H, Konijeti GG, Higuchi LM, de Silva P, Fuchs CS, Willett WC, Richter JM, Chan AT. Long-term intake of dietary fat and risk of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut*. 2014; 63(5):776-84.

123. Li F, Liu X, Wang W, Zhang D. Consumption of vegetables and fruit and the risk of inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2015; 27(6):623-30.
124. Cespedes EM, Hu FB. Dietary patterns: from nutritional epidemiologic analysis to national guidelines. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2015; 101(5):899–900.
125. Chiba M, Nakane K, Komatsu M. Westernized Diet is the Most Ubiquitous Environmental Factor in Inflammatory Bowel Disease. *Perm J*. 2019;23:18-107.
126. Mentella MC, Scaldaferri F, Pizzoferrato M, Gasbarrini A, Miggiano GAD. Nutrition, IBD and Gut Microbiota: A Review. *Nutrients*. 2020;12(4):944.
127. Zheng J, Hoffman KL, Chen JS, Shivappa N, Sood A, Browman GJ et al. Dietary inflammatory potential in relation to the gut microbiome: results from a cross-sectional study. *Br J Nutr*. 2020;124(9):931-942.
128. Hiippala K, Kainulainen V, Kalliomäki M, Arkkila P, Satokari R. Mucosal Prevalence and Interactions with the Epithelium Indicate Commensalism of *Sutterella* spp. *Front Microbiol*. 2016; 7:1706.
129. Milajerdi A, Ebrahimi-Daryani N, Dieleman LA, Larijani B, Esmailzadeh A. Association of Dietary Fiber, Fruit, and Vegetable Consumption with Risk of Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Adv Nutr*. 2021;12(3):735-743.
130. Bertani L, Ribaldone DG, Bellini M, Mumolo MG, Costa F. Inflammatory Bowel Diseases: Is There a Role for Nutritional Suggestions? *Nutrients*. 2021; 13(4):1387.
131. Barnes EL, Nestor M, Onyewadume L, de Silva PS, Korzenik JR; DREAM Investigators. High Dietary Intake of Specific Fatty Acids Increases Risk of Flares in Patients With Ulcerative Colitis in Remission During Treatment With Aminosalicylates. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2017;15(9):1390-1396.e1.

132. Barbaresko J, Koch M, Schulze MB, Nöthlings U. Dietary pattern analysis and biomarkers of low-grade inflammation: a systematic literature review. *Nutr Rev.* 2013;71(8):511-527.
133. Shivappa N, Steck SE, Hurley TG, Hussey JR, Hébert JR. Designing and developing a literature-derived, population-based dietary inflammatory index. *Public Health Nutr.* 2014;17(8):1689-1696.
134. Mirmiran P, Moslehi N, Morshedzadeh N, Shivappa N, Hébert JR, Farsi F et al. Does the inflammatory potential of diet affect disease activity in patients with inflammatory bowel disease? *Nutr J.* 2019;18(1):65.
135. Magro F, Gionchetti P, Eliakim R, Ardizzone S, Armuzzi A, Barreiro-de Acosta M, et al. Third European evidence-based consensus on diagnosis and management of ulcerative colitis. Part 1: definitions, diagnosis, extra-intestinal manifestations, pregnancy, cancer surveillance, surgery, and ileo-anal pouch disorders. *J Crohns Colitis* 2017; 11:649-70.
136. Gomollón F, Dignass A, Annese V, Tilg H, Van Assche G, Lindsay JO, et al. 3rd European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease 2016: part 1: diagnosis and medical management. *J Crohn Colitis* 2017; 11:3-25.
137. Harvey RF, Bradshaw MJ. Measuring Crohn's disease activity. *Lancet* 1980; 1:1134-5.
138. Sandborn WJ, van Assche G, Reinisch W, et al. Adalimumab induces and maintains clinical remission in patients with moderate-to-severe ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 2012;142(2):257–265.e3.
139. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* 200519(suppl A)5–36.

140. Callahan, B. J. et al. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods*. 2016; 13, 581–583
141. Quast, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*. 2013. 41, 590–596.
142. Pires DEV, Oliveira FS, Correa FB, Morais DK, Fernandes GR. TAG.ME: Taxonomic Assignment of Genetic Markers for Ecology. *bioRxiv* 263293
143. BÜHLMANN CALPROTECTIN ASSAYS IN CLINICAL APPLICATION. BÜHLMANN Laboratories AG. 2015.
144. Cannatelli R, Bazarova A, Zardo D, Nardone OM, Shivaji U, Smith SCL et al. Fecal Calprotectin Thresholds to Predict Endoscopic Remission Using Advanced Optical Enhancement Techniques and Histological Remission in IBD Patients. *Inflamm Bowel Dis*. 2021;27(5):647-654.
145. D'Amico F, Rubin DT, Kotze PG, Magro F, Siegmund B, Kobayashi T et al. International consensus on methodological issues in standardization of fecal calprotectin measurement in inflammatory bowel diseases. *United European Gastroenterol J* 2021; 9:451-60
146. Turner D, Ricciuto A, Lewis A, D'Amico F, Dhaliwal J, Griffiths AM et al. International Organization for the Study of IBD. STRIDE-II: An Update on the Selecting Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease (STRIDE) Initiative of the International Organization for the Study of IBD (IOIBD): Determining Therapeutic Goals for Treat-to-Target strategies in IBD. *Gastroenterology*. 2021 Apr;160(5):1570-1583.
147. Fisberg et al. Avaliação do consumo alimentar e da ingestão de nutrientes na prática clínica. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2009. 53 (5)
148. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Tabela de Medidas Referidas Para Os Alimentos Consumidos No Brasil.; 2011.



149. Giuntini EB, Lajolo FM, Menezes EW. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos TBCA-USP (Versões 3 e 4) no contexto internacional. Arch Latinoam Nutr. 2006; 56(4):366-74.
150. Pinheiro ABV, Lacerda EMA BE et al. Tabela Para Avaliação de Consumo Alimentar Em Medidas Caseiras. Atheneu; 2008.
151. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) 1ª ed. Campinas: NEPA – UNICAMP, 2004.
152. United States Department of Agriculture (USDA). National Nutrient Database for Standard Reference. Food Composition Table.; 2012.
153. DiE, 2020. (<https://msm.dife.de>).
154. Padovani RM, Amaya-Farfan J, Colugnati FAB, Domene SMA. Dietary reference intakes: aplicabilidade das tabelas em estudos nutricionais. Rev. Nutr., Campinas, 2006; 19(6):741-760.
155. US Department of Agriculture. USDA database for the flavonoid content of selected foods: release 3.2. Beltsville, MD: USDA; 2015. 173pp.
156. WHO Expert Committee. Vol. 854, World Health Organization technical report series. 1995; 1–452.
157. Hosmer, David W, Lemeshow E. 2000. Applied Logistic Regression. 2 ed. New York: Wiley.
158. Duricova D, Burisch J, Jess T, Gower-Rousseau C, Lakatos PL; ECCO-EpiCom. Age-related differences in presentation and course of inflammatory bowel disease: an update on the population-based literature. J Crohns Colitis. 2014;8(11):1351-61.
159. Flynn S, Eisenstein S. Inflammatory Bowel Disease Presentation and Diagnosis. Surg Clin North Am. 2019; 99(6):1051-1062.

160. Davis J, Kellerman R. Gastrointestinal Conditions: Inflammatory Bowel Disease. *FP Essent.* 2022; 516:23-30.
161. Singh S, Dulai PS, Zarrinpar A, Ramamoorthy S, Sandborn WJ. Obesity in IBD: epidemiology, pathogenesis, disease course and treatment outcomes. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017;14(2):110-121
162. Singh S, Picardo S, Seow CH. Management of Inflammatory Bowel Diseases in Special Populations: Obese, Old, or Obstetric. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2020;18(6):1367-1380.
163. Bryant RV, Trott MJ, Bartholomeusz FD, Andrews JM. Systematic review: body composition in adults with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2013;38(3):213-25.
164. Ryan E, McNicholas D, Creavin B, Kelly ME, Walsh T, Beddy D. Sarcopenia and Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review. *Inflamm Bowel Dis.* 2019;25(1):67-73.
165. Tasson L, Zingone F, Barberio B, Valentini R, Ballotta P, Ford AC et al. Sarcopenia, severe anxiety and increased C-reactive protein are associated with severe fatigue in patients with inflammatory bowel diseases. *Sci Rep.* 2021;11(1):15251.
166. Mareschal J, Douissard J, Genton L. Physical activity in inflammatory bowel disease: benefits, challenges and perspectives. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2022;25(3):159-166
167. Khasawneh M, Spence AD, Addley J, Allen PB. The role of smoking and alcohol behaviour in the management of inflammatory bowel disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2017;31(5):553-559.
168. Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JI, Knight R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science.* 2009;18;326(5960):1694-7.

169. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*. 2012; 489(7415):220-30.
170. Aldars-García L, Chaparro M, Gisbert JP. Systematic Review: The Gut Microbiome and Its Potential Clinical Application in Inflammatory Bowel Disease. *Microorganisms*. 2021;9(5):977
171. Lloyd-Price J, Arze C, Ananthakrishnan AN, Schirmer M, Avila-Pacheco J, Poon TW et al. Multi-omics of the gut microbial ecosystem in inflammatory bowel diseases. *Nature*. 2019;569(7758):655-662.
172. Clooney AG, Eckenberger J, Laserna-Mendieta E, Sexton KA, Bernstein MT, Vagianos K et al. Ranking microbiome variance in inflammatory bowel disease: a large longitudinal intercontinental study. *Gut*. 2021;70(3):499-510.
173. Lo Sasso G, Khachatryan L, Kondylis A, Battey JND, Sierro N, Danilova NA et al. Inflammatory Bowel Disease-Associated Changes in the Gut: Focus on Kazan Patients. *Inflamm Bowel Dis*. 2021;27(3):418-433.
174. Manichanh C, Borruel N, Casellas F, Guarner F. The gut microbiota in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012;9(10):599-608.
175. Rizzatti G, Lopetuso LR, Gibiino G, Binda C, Gasbarrini A. Proteobacteria: A Common Factor in Human Diseases. *Biomed Res Int*. 2017;2017:9351507.
176. Popov J, Caputi V, Nandeesh N, Rodriguez DA, Pai N. Microbiota-Immune Interactions in Ulcerative Colitis and Colitis Associated Cancer and Emerging Microbiota-Based Therapies. *Int J Mol Sci*. 2021;22.
177. Rivera-Chávez F, Lopez CA, Bäumlér AJ. Oxygen as a driver of gut dysbiosis. *Free Radic Biol Med*. 2017;105:93-101.
178. Brennan CA, Garrett WS. *Fusobacterium nucleatum* - symbiont, opportunist and oncobacterium. *Nat Rev Microbiol*. 2019;17:156-166.

179. 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;11:1-10.
180. Dai ZF, Ma XY, Yang RL, Wang HC, Xu DD, Yang JN et al. Intestinal flora alterations in patients with ulcerative colitis and their association with inflammation. *Exp Ther Med*. 2021; 22(5):1322.
181. Palmieri O, Castellana S, Biscaglia G, Panza A, Latiano A, Fontana R et al. Microbiome Analysis of Mucosal Ileoanal Pouch in Ulcerative Colitis Patients Revealed Impairment of the Pouches Immunometabolites. *Cells*. 2021; 19;10(11):3243
182. Imhann F, Vich Vila A, Bonder MJ, Lopez Manosalva AG, Koonen DPY, Fu J et al. The influence of proton pump inhibitors and other commonly used medication on the gut microbiota. *Gut Microbes*. 2017;8(4):351-358.
183. Malíčková K, Francová I, Lukáš M, Kolář M, Králíková E, Bortlík M et al. Fecal zonulin is elevated in Crohn's disease and in cigarette smokers. *Pract Lab Med*. 2017;9:39-44.
184. Caviglia GP, Dughera F, Ribaldone DG, Rosso C, Abate ML, Pellicano R et al. Serum zonulin in patients with inflammatory bowel disease: a pilot study. *Minerva Med*. 2019;110(2):95-100.
185. MacMaster MJ, Damianopoulou S, Thomson C, Talwar D, Stefanowicz F, Catchpole A, Gerasimidis K, Gaya DR. A prospective analysis of micronutrient status in quiescent inflammatory bowel disease. *Clin Nutr*. 2021;40(1):327-331
186. Battistini C, Ballan R, Herkenhoff ME, Saad SMI, Sun J. Vitamin D Modulates Intestinal Microbiota in Inflammatory Bowel Diseases. *Int J Mol Sci*. 2020;22(1):362.
187. Zhang YG, Wu S, Sun J. Vitamin D, Vitamin D Receptor, and Tissue Barriers. *Tissue Barriers*. 2013;1(1):e23118.

188. Ham NS, Hwang SW, Oh EH, Kim J, Lee HS, Park SH, Yang DH, Ye BD, Byeon JS, Myung SJ, Yang SK. Influence of Severe Vitamin D Deficiency on the Clinical Course of Inflammatory Bowel Disease. *Dig Dis Sci*. 2021; 66(2):587-596.
189. Gubatan J, Moss AC. Vitamin D in inflammatory bowel disease: more than just a supplement. *Curr Opin Gastroenterol*. 2018; 34(4):217-22
190. Gubatan J, Mitsuhashi S, Longhi MS, Zenlea T, Rosenberg L, Robson S, Moss AC. Higher serum vitamin D levels are associated with protective serum cytokine profiles in patients with ulcerative colitis. *Cytokine*. 2018 Mar;103:38-45.
191. Fakhoury HMA, Kvietyts PR, AlKattan W, Anouti FA, Elahi MA, Karras SN, Grant WB. Vitamin D and intestinal homeostasis: Barrier, microbiota, and immune modulation. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2020;200:105663.
192. Liu F, Lee SA, Riordan SM, Zhang L, Zhu L. Global Studies of Using Faecal Biomarkers in Predicting Relapse in Inflammatory Bowel Disease. *Front Med*. 2020; 7:580803.
193. Yang RX, Song WJ, Wu ZQ, Goyal H, Xu HG. Association of Serum Neuron-Specific Enolase and C-Reactive Protein With Disease Location and Endoscopic Inflammation Degree in Patients With Crohn's Disease. *Front Med (Lausanne)*. 2021; 8:663920.
194. Ohlsson B, Roth B, Larsson E, Hoglund P. Calprotectin in serum and zonulin in serum and feces after introduction of a diet with lower carbohydrate content and high fiber, fat and protein content. *Biomed Rep* 2017;6: 411-2
195. Ribaldone DG, Pellicano R, Actis GC. Inflammation in gastrointestinal disorders: prevalent socioeconomic factors. *Clin Exp Gastroenterol*. 2019; 12:321-329.

196. Massironi S, Cavalcoli F, Rausa E, Invernizzi P, Braga M, Vecchi M. Understanding short bowel syndrome: Current status and future perspectives. *Dig Liver Dis.* 2020;52(3):253-261.
197. Yueying C, Yu Fan W, Jun S. Anemia and iron deficiency in Crohn's disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2020;14(3):155-162.
198. FAO/OMS. Fiber dietary recommendation. Disponível em: <https://www.who.int/dietphysicalactivity/fruit/en/>.
199. Statovci D, Aguilera M, MacSharry J, Melgar S. The Impact of Western Diet and Nutrients on the Microbiota and Immune Response at Mucosal Interfaces. *Front Immunol.* 2017; 28; 8:838.
200. Rowland I, Gibson G, Heinken A, Scott K, Swann J, Thiele I et al. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur J Nutr.* 2018; 57(1):1-24.
201. Precup G, Vodnar DC. Gut Prevotella as a possible biomarker of diet and its eubiotic versus dysbiotic roles: a comprehensive literature review. *Br J Nutr.* 2019;122(2):131-140.
202. Cronin P, Joyce SA, O'Toole PW, O'Connor EM. Dietary Fibre Modulates the Gut Microbiota. *Nutrients.* 2021;13(5):1655
203. de Graaf MCG, Spooren CEGM, Hendrix EMB, Hesselink MAM, Feskens EJM, Smolinska A, Keszthelyi D, Pierik MJ, Mujagic Z, Jonkers DMAE. Diet Quality and Dietary Inflammatory Index in Dutch Inflammatory Bowel Disease and Irritable Bowel Syndrome Patients. *Nutrients.* 2022;14(9):1945.
204. Zmora N, Suez J, Elinav E. You are what you eat: diet, health and the gut microbiota. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019;16(1):35-56.
205. 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.

206. Lewis SJ, Heaton KW. Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time. *Scand J Gastroenterol.* 1997;32(9):920-4.
207. Saad RJ, Rao SS, Koch KL, Kuo B, Parkman HP, McCallum RW et al. Do stool form and frequency correlate with whole-gut and colonic transit? Results from a multicenter study in constipated individuals and healthy controls. *Am J Gastroenterol.* 2010;105(2):403-11.
208. Wang Y, Gao X, Ghazlane A, Hu H, Li X et al. Characteristics of Faecal Microbiota in Paediatric Crohn's Disease and Their Dynamic Changes During Infliximab Therapy. *J Crohns Colitis.* 2018;12(3):337-346.
209. Poppleton DI, Duchateau M, Hourdel V, Matondo M, Flechsler J, Klingl A, et al. Outer membrane proteome of *Veillonella parvula*: a diderm firmicute of the human microbiome. *Front Microbiol* 2017; 8:1215
210. Li J, Wang H, Li N, Zhang Y, Lü X, Liu B. Antibiotic susceptibility and biofilm-forming ability of *Veillonella* strains. *Anaerobe.* 2022; 78:102667.
211. Rai AK, Panda M, Das AK, Rahman T, Das R, Das K, et al. Dysbiosis of salivary microbiome and cytokines influence oral squamous cell carcinoma through inflammation. *Arch Microbiol* 2021; 203:137e52.
212. Li N, Zhan S, Tian Z, Liu C, Xie Z, Zhang S, et al. Alterations in bile acid metabolism associated with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2021;27(9):1525e40.
213. Das P, Marcisauskas S, Ji B, Nielsen J. Metagenomic analysis of bile salt biotransformation in the human gut microbiome. *BMC Genom.* 2019; 20:517
214. Becker C, Neurath MF, Wirtz S. The intestinal microbiota in inflammatory Bowel Disease. *ILAR J.* 2015;56:192–204.
215. Danilova NA, Abdulkhakov SR, Grigoryeva TV, Markelova MI, Vasilyev IY, Boulygina EA et al. Markers of dysbiosis in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Ter Arkh.* 2019;91:17–24.

216. Fuke N, Nagata N, Suganuma H, Ota T. Regulation of Gut Microbiota and Metabolic Endotoxemia with Dietary Factors. *Nutrients*. 2019;11(10):2277.
217. Mukherjee A, Lordan C, Ross RP, Cotter PD. Gut microbes from the phylogenetically diverse genus *Eubacterium* and their various contributions to gut health. *Gut Microbes*. 2020; 12(1):1802866
218. Quaglio AEV, Grillo TG, De Oliveira ECS, Di Stasi LC, Sasaki LY. Gut microbiota, inflammatory bowel disease and colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2022; 28(30): 4053-4060.
219. Gomaa EZ. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2020; 113:2019-2040.
220. Mukhopadhyay I, Hansen R, Nicholl CE, Alhaidan YA, Thomson JM, Berry SH et al. A comprehensive evaluation of colonic mucosal isolates of *Sutterella wadsworthensis* from inflammatory bowel disease. *PLoS One*. 2011;6(10):e27076.
221. Gryaznova MV, Solodskikh SA, Panevina AV, Syromyatnikov MY, Dvoretckaya YD, Sviridova TN et al. Study of microbiome changes in patients with ulcerative colitis in the Central European part of Russia. *Heliyon*. 2021; 7(3):e06432
222. Schirmer M, Denson L, Vlamakis H, Franzosa EA, Thomas S, Gotman NM et al. Compositional and Temporal Changes in the Gut Microbiome of Pediatric Ulcerative Colitis Patients Are Linked to Disease Course. *Cell Host Microbe*. 2018;24(4):600-610.e4.
223. Paramsothy S, Nielsen S, Kamm MA, Deshpande NP, Faith JJ, Clemente JC et al. Specific Bacteria and Metabolites Associated With Response to Fecal Microbiota Transplantation in Patients With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology*. 2019; 156(5):1440-1454.e2.
224. Kaakoush NO. *Sutterella* Species, IgA-degrading Bacteria in Ulcerative Colitis. *Trends Microbiol*. 2020; 28(7):519-522.



225. Butera A, Di Paola M, Vitali F, De Nitto D, Covotta F, Borrini F et al. IL-13 mRNA Tissue Content Identifies Two Subsets of Adult Ulcerative Colitis Patients With Different Clinical and Mucosa-Associated Microbiota Profiles. *J Crohns Colitis*. 2020;14(3):369-380.
226. Hansen IS, Baeten DLP, den Dunnen J. The inflammatory function of human IgA. *Cell Mol Life Sci*. 2019; 76(6):1041-1055.
227. Machiels K, Sabino J, Vandermosten L, Joossens M, Arijis I, de Bruyn M et al. Specific members of the predominant gut microbiota predict pouchitis following colectomy and IPAA in UC. *Gut*. 2017; 66(1):79-88.
228. Olaisen M, Flatberg A, Granlund AVB, Røyset ES, Martinsen TC, Sandvik AK et al. Bacterial Mucosa-associated Microbiome in Inflamed and Proximal Noninflamed Ileum of Patients With Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2021;27(1):12-24.
229. Qiu Z, Yang H, Rong L, Ding W, Chen J, Zhong L. Targeted Metagenome Based Analyses Show Gut Microbial Diversity of Inflammatory Bowel Disease patients. *Indian J Microbiol*. 2017; 57(3):307-315.
230. Koppel N, Maini Rekdal V, Balskus EP. Chemical transformation of xenobiotics by the human gut microbiota. *Science*. 2017; 356(6344): 2770.
231. Liu Y, Ajami NJ, El-Serag HB, Hair C, Graham DY, White DL et al. Dietary quality and the colonic mucosa-associated gut microbiome in humans. *Am J Clin Nutr*. 2019;110(3):701-712.
232. Larussa T, Imeneo M, Luzzza F. Potential role of nutraceutical compounds in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2017;23:2483–2492.
233. Tian Z, Zhuang X, Zhuo S, Zhu Y, Hu S, Zhao M, Tang C, Zhang Z, Li X, Ma R, Zeng Z, Feng R, Chen M. Dietary inflammatory potential mediated gut microbiota and metabolite alterations in Crohn's disease: A fire-new perspective. *Clin Nutr*. 2022;41(6):1260-1271.

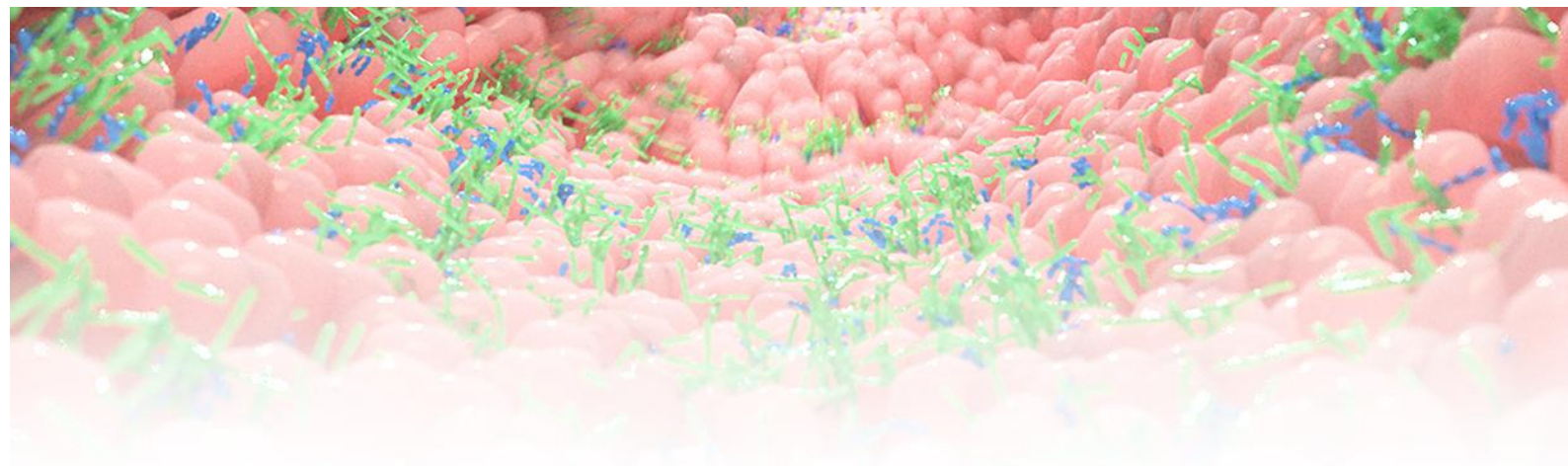
234. Bian D, Liu X, Wang C, Jiang Y, Gu Y, Zhong J, Shi Y. Association between Dietary Inflammatory Index and Sarcopenia in Crohn's Disease Patients. *Nutrients*. 2022;14(4):901.
235. Cui Y, Zhang L, Wang X, Yi Y, Shan Y, Liu B, Zhou Y, Lü X. Roles of intestinal Parabacteroides in human health and diseases. *FEMS Microbiol Lett*. 2022; 369(1):fnac072.
236. Dione N, Rathored J, Tomei E, Lagier JC, Khelaifia S, Robert C et al. *Dakarella massiliensis* gen. nov., sp. nov., strain ND3T: a new bacterial genus isolated from the female genital tract. *New Microbes New Infect*. 2017; 18:38-46.
237. Yamamoto-Furusho JK, Parra-Holguín NN. Emerging therapeutic options in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2021; 27(48): 8242-8261.
238. Agrawal M, Spencer EA, Colombel JF, Ungaro RC. Approach to the Management of Recently Diagnosed Inflammatory Bowel Disease Patients: A User's Guide for Adult and Pediatric Gastroenterologists. *Gastroenterology*. 202;161(1):47-65.
239. Lopez RN, Leach ST, Lemberg DA, Duvoisin G, Geary RB, Day AS. Fecal biomarkers in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2017;32(3):577-582.
240. Park SK, Kim HN, Choi CH, Im JP, Cha JM, Eun CS et al. Differentially Abundant Bacterial Taxa Associated with Prognostic Variables of Crohn's Disease: Results from the IMPACT Study. *J Clin Med*. 2020;9(6):1748.
241. Ananthakrishnan AN, Luo C, Yajnik V, Khalili H, Garber JJ, Stevens BW et al. Gut microbiome function predicts response to anti-integrin biologic therapy in inflammatory bowel diseases. *Cell Host Microbe*. 2017; 21(5): 603– 10.e3.
242. Rajca S, Grondin V, Louis E, Vernier-Massouille G, Grimaud JC, Bouhnik Y et al. Alterations in the intestinal microbiome (dysbiosis) as a predictor of relapse after infliximab withdrawal in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2014;20(6):978-86.

243. Leylabadlo HE, Ghotaslou R, Feizabadi MM, Farajnia S, Moaddab SY, Ganbarov K et al. The critical role of *Faecalibacterium prausnitzii* in human health: An overview. *Microb Pathog*. 2020;149:104344.
244. Ghouri YA, Tahan V, Shen B. Secondary causes of inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*. 2020;26:3998-4017.
245. Ryma T, Samer A, Soufli I, Rafa H, Touil-Boukoffa C. Role of Probiotics and Their Metabolites in Inflammatory Bowel Diseases (IBDs). *Gastroenterol Insights*. 2021;12:56-66.
246. Prosberg M, Bendtsen F, Vind I, Petersen AM, Gluud LL. The association between the gut microbiota and the inflammatory bowel disease activity: a systematic review and meta-analysis. *Scand J Gastroenterol*. 2016;51(12):1407-1415.
247. Varela E, Manichanh C, Gallart M, Torrejón A, Borrueal N, Casellas F, et al. Colonisation by *Faecalibacterium prausnitzii* and maintenance of clinical remission in patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013;38:151-161.
248. Sokol H, Brot L, Stefanescu C, Auzolle C, Barnich N, Buisson A et al. Prominence of ileal mucosa-associated microbiota to predict postoperative endoscopic recurrence in Crohn's disease. *Gut*. 2020; 69(3): 462– 72.
249. Hyams JS, Davis Thomas S, Gotman N, Haberman Y, Karns R, Schirmer M et al. Clinical and biological predictors of response to standardised paediatric colitis therapy (PROTECT): a multicentre inception cohort study. *Lancet*. 2019;393(10182):1708-1720.
250. Kamada N, Kim YG, Sham HP, Vallance BA, Puente JL, Martens EC, Núñez G. Regulated virulence controls the ability of a pathogen to compete with the gut microbiota. *Science*. 2012;336(6086):1325-9.

251. He XX, Li YH, Yan PG, Meng XC, Chen CY, Li KM et al. Relationship between clinical features and intestinal microbiota in Chinese patients with ulcerative colitis. *World J Gastroenterol*. 2021;27(28):4722-4737.
252. Gonzalez CG, Mills RH, Zhu Q, Saucedo C, Knight R, Dulai PS, Gonzalez DJ. Location-specific signatures of Crohn's disease at a multi-omics scale. *Microbiome*. 2022;10(1):133.
253. Mills RH, Dulai PS, Vázquez-Baeza Y, Saucedo C, Daniel N, Gerner RR et al. Multi-omics analyses of the ulcerative colitis gut microbiome link *Bacteroides vulgatus* proteases with disease severity. *Nat Microbiol*. 2022 Feb;7(2):262-276.
254. Lo Presti A, Del Chierico F, Altomare A, Zorzi F, Monteleone G, Putignani L et al. Phylogenetic analysis of *Prevotella copri* from fecal and mucosal microbiota of IBS and IBD patients. *Therap Adv Gastroenterol*. 2023; 16:17562848221136328.
255. Iljazovic A, Roy U, Gálvez EJC, Lesker TR, Zhao B, Gronow A et al. Perturbation of the gut microbiome by *Prevotella* spp. enhances host susceptibility to mucosal inflammation. *Mucosal Immunol*. 2021;14(1):113-124.
256. Wright DP, Rosendale DI, Robertson AM. *Prevotella* enzymes involved in mucin oligosaccharide degradation and evidence for a small operon of genes expressed during growth on mucin. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 190: 73–79.
257. Cani PD. Human gut microbiome: hopes, threats and promises. *Gut*. 2018; 67(9):1716-1725.
258. Zhong W, Lu X, Shi H, Zhao G, Song Y, Wang Y et al. Distinct Microbial Populations Exist in the Mucosa-associated Microbiota of Diarrhea Predominant Irritable Bowel Syndrome and Ulcerative Colitis. *J Clin Gastroenterol*. 2019;53(9):660-672.
259. Lo Presti A, Del Chierico F, Altomare A, Zorzi F, Cella E, Putignani L et al. Exploring the genetic diversity of the 16S rRNA gene of *Akkermansia muciniphila* in IBD and IBS. *Future Microbiol* 2019;14:1497–1509.

260. Cani PD, de Vos WM. 2017. Next-generation beneficial microbes: the Case of *Akkermansia muciniphila*. *Front Microbiol.* 2017; 8:1765.
261. Geerlings SY, Kostopoulos I, de Vos WM, Belzer C. *Akkermansia muciniphila* in the Human Gastrointestinal Tract: When, Where, and How? *Microorganisms.* 2018;6(3):75.
262. Zhang T, Li Q, Cheng L, Buch H, Zhang F. *Akkermansia muciniphila* is a promising probiotic. *Microb Biotechnol.* 2019;12(6):1109-1125.
263. Zhai Q, Feng S, Arjan N, Chen W. A next generation probiotic, *Akkermansia muciniphila*. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2019;59(19):3227-3236.
264. Zhai R, Xue X, Zhang L, Yang X, Zhao L, Zhang C. Strain-specific anti-inflammatory properties of two *Akkermansia muciniphila* strains on chronic colitis in mice. *Front Cell Infect Microbiol* 2019: 9.
265. Reinshagen M, Stallmach A. Multidonor intensive faecal microbiota transplantation for active ulcerative colitis: a randomised placebo-controlled trial]. *Z Gastroenterol.* 2017;55(8):779-780.
266. Lacroix V, Cassard A, Mas E, Barreau F. Multi-Omics Analysis of Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Diseases: What Benefits for Diagnostic, Prognostic and Therapeutic Tools? *Int J Mol Sci.* 2021; 22(20):11255.
267. Lamers CR, de Roos NM, Witteman BJM. The association between inflammatory potential of diet and disease activity: results from a cross-sectional study in patients with inflammatory bowel disease. *BMC Gastroenterol.* 2020; 20(1):316.
268. Liu F, Lee SA, Riordan SM, Zhang L, Zhu L. Global Studies of Using Fecal Biomarkers in Predicting Relapse in Inflammatory Bowel Disease. *Front Med (Lausanne).* 2020;7:580803.
269. yle BD, Agbor TA, Sharif S, Chauhan U, Marshall J, Halder SLS, Ip S, Khan WI. Fecal Calprotectin, CRP and Leucocytes in IBD Patients: Comparison of

- Biomarkers With Biopsy Results. *J Can Assoc Gastroenterol*. 2020 Mar 27;4(2):84-90.
270. Patel A, Panchal H, Dubinsky MC. Fecal Calprotectin Levels Predict Histological Healing in Ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2017;23(9):1600-1604.
271. Lee SH, Kim MJ, Chang K, Song EM, Hwang SW, Park SH et al. Fecal calprotectin predicts complete mucosal healing and better correlates with the ulcerative colitis endoscopic index of severity than with the Mayo endoscopic subscore in patients with ulcerative colitis. *BMC Gastroenterol*. 2017; 17(1):110.



## **APÊNDICES**

APÊNDICES

Apêndice 1. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

**IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL  
LEGAL**

1. NOME.....  
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO BIOLÓGICO: .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 :.....SEXO BIOLÓGICO: M  F   
 DATA NASCIMENTO.: ...../...../..... IDADE: .....  
 ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....  
 BAIRRO: ..... CEP: .....  
 TELEFONE: DDD (.....).....

**DADOS SOBRE A PESQUISA**

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Estudo VALIDYS: Validação de uma ferramenta para rastreamento do risco de disbiose e caracterização da microbiota intestinal sadia e enferma.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL / PRINCIPAL: Dan Linetzky Waitzberg  
 CARGO/FUNÇÃO: médico/ professor - CRM Nº: 22052  
 UNIDADE DO HCFMUSP: “Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo”  
 PESQUISADOR EXECUTANTE: Danielle C. Fonseca Candian – Nutricionista CRN3-37872

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:  
 RISCO MÍNIMO [X] RISCO MÉDIO   
 RISCO BAIXO  RISCO MAIOR

3.DURAÇÃO DA PESQUISA: 4 anos

**Prezado (a) Senhor(a):**

Você está sendo convidado(a) para participar voluntariamente de uma pesquisa que prevê responder perguntas de questionários e, eventualmente, a coleta de amostra fecal e análise de composição corporal (análise de gordura e músculos corporais). Pesquisa é um conjunto de procedimentos que procura criar ou aumentar o conhecimento sobre um assunto. Embora frequentemente não tragam benefícios diretos ao participante, as descobertas de uma pesquisa podem ser úteis para muitas pessoas



no futuro. Para decidir se aceita ou não participar desta pesquisa, o(a) senhor(a) precisa entender o suficiente sobre todos os seus aspectos. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), descreve as razões da pesquisa, os procedimentos previstos, bem como os riscos e benefícios nela envolvidos. Pedimos que leia e, caso sinta necessidade, discuta com familiares e/ou outras pessoas de sua confiança todo o seu conteúdo. Se alguma dúvida persistir, você pode esclarecê-la diretamente com o pesquisador. Havendo interesse em participar, será solicitada a sua rubrica em todas as páginas do TCLE e sua assinatura na última página. Uma via assinada deste termo deverá ficar em posse do(a) senhor(a) ou por seu representante legal e uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável.

**Objetivo do estudo:** Aplicar um questionário (DYS) sobre risco de disbiose intestinal (alterações no padrão de bactérias que vivem em nosso intestino), para verificar sua sensibilidade em detectar alterações da microbiota intestinal (bactérias que vivem em nosso intestino) em casos de saúde e doença (população geral, funcionários e pacientes do Hospital das Clínicas de São Paulo – HC-FMUSP).

**Procedimentos:** Sua participação poderá ser apenas com o preenchimento do questionário DYS e questionários de consumo alimentar, ou também contar com a coleta adicional de quatro pequenas amostras de fezes, avaliação da composição corporal e novamente um questionário de consumo alimentar. O referido questionário DYS, contém perguntas que podem trazer algum constrangimento, como idade; tipo de parto em que você nasceu; hábitos referentes à alimentação, prática de atividade física, consumo de álcool e/ou fumo; uso de medicação, presença de enfermidades e funcionamento intestinal. Caso o(a) senhor(a) preencha alguns critérios estabelecidos pelo estudo, os profissionais responsáveis pela pesquisa poderão entrar em contato com o(a) senhor(a) por e-mail, carta ou telefone, para o convidar a participar da etapa que necessita de amostra de fezes. As referidas amostras serão utilizadas para a realização de dois exames chamados “sequenciamento de microbiota das fezes”, que avalia quais bactérias vivem em seu intestino através da análise de fezes e “metabolômica das fezes”, que avalia o que essas bactérias podem produzir nas fezes. Caso seja solicitado, esse exame não terá nenhum custo para o(a) senhor(a), não trará nenhum risco à sua saúde, nem implicará em qualquer alteração do seu tratamento. Trata-se apenas da coleta de amostra de fezes, feita em sua casa.

**Benefícios.** Esta pesquisa trará maior conhecimento sobre o tema abordado, mas não há previsão de benefício direto para o(a) senhor(a). Estudos científicos baseiam-se na análise de grande número de amostras, sendo impossível estimar o benefício individual de cada paciente incluído no estudo.

**Riscos.** O preenchimento destes questionários, e/ou coleta de fezes e avaliação de composição corporal não representará qualquer risco de ordem física ou psicológica para você. Ainda assim, caso queira desistir de sua participação em qualquer momento, você não sofrerá nenhum prejuízo.

**Forma de acompanhamento e assistência.** A sua participação neste estudo não modifica em nada os tratamentos que o(a) senhor(a) realiza nesta instituição (aplica-se exclusivamente a pacientes do Hospital das Clínicas de São Paulo – HC-FMUSP). Em qualquer etapa do estudo, o(a) senhor(a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa. O investigador principal é o **Dr. Dan Linetzky Waitzberg**, que pode ser encontrado pelo telefone **(11) 3061-7459**, horário de atendimento 08-18 horas. O investigador executante é **Danielle Cristina Fonseca Candian** que pode ser encontrado na **Faculdade de Medicina da USP, Avenida Doutor Arnaldo nº455, sala 2205/2208 – prédio principal, Telefone (11) 99285-6059**, e-mail: [daniellecf\\_25@hotmail.com](mailto:daniellecf_25@hotmail.com).

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549; e-mail: [cappesq.adm@hc.fm.usp.br](mailto:cappesq.adm@hc.fm.usp.br)

**Liberdade de recusar-se e retirar-se do estudo.** A escolha de entrar ou não nesse estudo é inteiramente sua. Caso o(a) senhor(a) se recuse a participar deste estudo, o(a) senhor(a) receberá o tratamento habitual (caso seja paciente do Hospital das Clínicas de São Paulo – HC-FMUSP), sem qualquer tipo de prejuízo ou represália. O(A) senhor(a) também tem o direito de retirar-se deste estudo a qualquer momento e, se isso acontecer, seu médico continuará a tratá-lo(a) sem qualquer prejuízo ao tratamento ou represália (aplica-se a pacientes do Hospital das Clínicas de São Paulo – HC-FMUSP).

**Manutenção do sigilo e privacidade.** Os seus dados serão analisados em conjunto com outros pacientes, sendo assim, as informações fornecidas por você terão sua privacidade garantida pelos pesquisadores responsáveis, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente sob qualquer circunstância. Solicitamos sua autorização para que os dados obtidos nesta pesquisa sejam utilizados em publicações científicas, meio como os resultados de uma pesquisa são divulgados e compartilhados com a comunidade científica.

**Garantia de Ressarcimento.** O(A) senhor(a) não terá qualquer custo, pois o custo desta pesquisa será de responsabilidade do orçamento da pesquisa. O(A) senhor(a) tem direito a ressarcimento em caso de despesas decorrentes da sua participação na pesquisa.

**Garantia de indenização.** Esta pesquisa não é invasiva e não traz riscos à saúde. O(A) senhor(a) tem direito à indenização diante de eventuais danos comprovadamente decorrentes dela.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “**Estudo VALIDYS: Validação de uma ferramenta para rastreamento do risco de disbiose e caracterização da microbiota intestinal sadia e enferma**”. Eu discuti com o Pesquisador Responsável Dr Dan Linetzky Waitzberg, ou pessoa(s) por ele delegada(s) \_\_\_\_\_ sobre a minha decisão em participar nesse estudo.

Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é voluntária, isenta de despesas e participar deste estudo não modifica em nada meu acesso a tratamento hospitalar (aplica-se a pacientes do Hospital das Clínicas de São Paulo – HC-FMUSP), quando necessário.

Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

-----  
Assinatura do participante/representante legal

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

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste participante ou representante legal para a participação neste estudo.

-----  
Assinatura do responsável pelo estudo

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

## APÊNDICES

**Apêndice 2.** Modelo de recordatório alimentar 24horas (R24) aplicado aos pacientes.

<b>Data:</b> ____/____/____ -	<b>Dia da semana:</b> _____	Número do recordatório:
Refeição/horário	Alimento ou preparação consumida	Quantidade e porção referida
Ingestão de água diária: _____		Suplementação: _____

## Apêndice 3. Tabelas suplementares

**Tabela suplementar 1.** Parâmetros de avaliação do índice inflamatório de dieta com base em 45 grupos alimentares.

COMPONENTE ALIMENTAR	CONSUMO MÉDIO GLOBAL	DESVIO-PADRÃO DO CONSUMO GLOBAL	ESCORE INFLAMATÓRIO
Álcool (g)	13,98	3,72	-0,278
Vitamina B12 (µg)	5,15	2,7	0,106
Vitamina B6 (mg)	1,47	0,74	-0,365
β- caroteno (µg)	3718	1720	-0,584
Cafeína (g)	8,05	6,67	-0,11
Carboidrato (g)	272,2	40	0,097
Colesterol (mg)	279,4	51,2	0,11
Energia (kcal)	2056	338	0,18
Eugenol (mg)	0,01	0,08	-0,14
Gordura total (g)	71,4	19,4	0,298
Fibra (g)	18,8	4,9	-0,663
Ácido fólico (µg)	273	70,7	-0,19
Alho (g)	4,35	2,9	-0,412
Gengibre (g)	59	63,2	-0,453
Fe (mg)	13,35	3,71	0,032
Mg (mg)	310,1	139,4	-0,484
MUFA (g)	27	6,1	-0,009
Niacina (mg)	25,9	11,77	-0,246
Ácidos graxos n-3 (g)	1,06	1,06	-0,436
Ácidos graxos n-6 (g)	10,8	7,5	-0,159
Cebola (g)	35,9	18,4	-0,301
Proteína (g)	79,4	13,9	0,021
PUFA (g)	13,88	3,76	-0,337
Riboflavina (mg)	1,7	0,79	-0,068
Açafrão (g)	0,37	1,78	-0,14
Gordura saturada (g)	28,6	8	0,373
Se (µg)	67	25,1	-0,191
Tiamina (mg)	1,7	0,66	-0,098
Gordura trans (g)	3,15	3,75	0,229
Curcuma (mg)	533,6	754,3	-0,785
Vitamina A (RE)	983,9	518,6	-0,401
Vitamina C (mg)	118,2	43,46	-0,424
Vitamina D (µg)	6,26	2,21	-0,446
Vitamina E (mg)	8,73	1,49	-0,419
Zn (mg)	9,84	2,19	-0,313
Chá verde/preto (g)	1,69	1,53	-0,536
Flavan-3-ol (mg)	95,8	85,9	-0,415
Flavonas (mg)	1,55	0,07	-0,616
Flavonóis (mg)	17,7	6,79	-0,467
Flavononas (mg)	11,7	3,82	-0,25
Antocianidinas (mg)	18,05	21,14	-0,131
Isoflavonas (mg)	1,2	0,2	-0,593
Pimenta (g)	10	7,07	-0,131
Tomilho/Orégano (mg)	0,33	0,99	-0,102
Alecrim (mg)	1	15	-0,013

Fonte: Traduzido e adaptado de Shivappa *et al.* (133).

**Tabela suplementar 2.** Valores individuais para os marcadores de zonulina fecal e calprotectina fecal na população com doenças inflamatórias intestinais em remissão clínica (n=40).

Código do paciente	Zonulina fecal (ng/mL)	Calprotectina (µg/g)
AMB_099	1,5	989
AMB_100	1,1	142
AMB_102	0,941	188
AMB_103	1,05	113
AMB_104	0,981	93
AMB_105	1,09	30
AMB_106	1,11	910
AMB_107	1,14	102
AMB_108	0,871	690
AMB_109	1,12	384
AMB_113	1,05	67
AMB_114	1,35	498
AMB_115	1,23	111
AMB_118	1,29	57
AMB_147	1,23	45
AMB_155	1,35	42
AMB_157	1,23	183
AMB_158	1,11	230
AMB_159	0,991	239
AMB_162	1,05	35
AMB_110	1,83	978
AMB_111	1,21	30
AMB_116	1	1000
AMB_117	1,23	133
AMB_119	1,31	298
AMB_141	1,18	929
AMB_142	0,951	1000
AMB_143	1,19	30
AMB_144	1,1	418
AMB_145	1,22	67
AMB_146	1,35	395
AMB_148	1,42	395
AMB_149	1,58	87
AMB_150	1,54	454
AMB_151	1,39	94
AMB_152	1,18	245
AMB_156	1,2	232
AMB_160	1,31	772
AMB_161	1,04	72
AMB_163	1,03	867

**Tabela suplementar 3.** Correlação entre parâmetros clínicos e de estado nutricional pacientes com doenças inflamatórias intestinais (n=40).

Variáveis de correlação	IMC		Massa magra (%)		Massa gorda (%)	
	rho	p valor <sup>1</sup>	rho	P valor <sup>1</sup>	rho	P valor <sup>1</sup>
Idade (anos)	0,094	0,564	- 0,372	<b>0,018</b>	0,372	<b>0,018</b>
Tempo de doença (anos)	0,047	0,771	- 0,404	<b>0,009</b>	0,404	<b>0,009</b>
Massa gorda (%)	0,326	<b>0,040</b>	- 1,00	<b>&lt;0,001</b>	-	-
Massa magra (%)	- 0,326	<b>0,040</b>	-	-	-1,00	<b>&lt;0,001</b>
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	-	-	- 0,326	<b>0,040</b>	0,326	<b>0,040</b>

**Legenda:** rho: Peso da correlação. IMC: Índice de massa corporal. <sup>1</sup>Correlação de Spearman.

**Tabela suplementar 4.** Distribuição dos níveis de zonulina fecal em pacientes com doença inflamatória intestinal em remissão clínica (n = 40).

Zonulina (ng/mL)	n (%)
<b>Percentil 25</b>	
≤ 1,05	11 (27,50%)
> 1,050	29 (72,50%)
<b>Mediana</b>	
≤1,185	21 (52,50%)
> 1,185	19 (47,50%)
<b>Percentil 75</b>	
≤ 1,310	30 (75,00%)
> 1,310	10 (25,00%)

**Tabela suplementar 5.** Comparação dos índices Chao, Shannon e Simpson, parâmetros de alfa diversidade, entre os diferentes quartis de inflamação de dieta em pacientes com Doenças Inflamatórias Intestinais em remissão clínica (n=40).

Índices de diversidade	Quartil 1	Quartil 2	Quartil 3	Quartil 4	p valor
Chao	214,79 (97,46)	270,58 (79,22)	193,29 (57,89)	252,08 (72,98)	0,213
Shannon	3,76 (0,64)	4,11 (0,45)	3,69 (0,46)	3,95 (0,44)	0,199
Simpson	0,95 (0,03)	0,96 (0,02)	0,94 (0,03)	0,95 (0,02)	0,108

**Tabela suplementar 6.** Análise comparativa da microbiota intestinal de pacientes com doenças inflamatórias intestinais (n=40) estratificada em quartis do índice de inflamação alimentar usando métodos de análise de expressão gênica diferencial usando modelos lineares generalizados binomiais negativos (DESeq2).

ASV	Quartil 1 (n = 10)	Quartil 2 (n = 10)	Quartil 3 (n = 10)	Quartil 4 (n = 10)
<b>Gênero <i>Bacteroides</i> (17)</b>				
<i>sq1092. Bacteroides dorei</i>	0 (0)	a 0 (0)	a 15,4 (25)	b 0 (0) a
<i>sq439. Bacteroides finegoldii</i>	0 (0)	a 0,21 (0,665)	a 0,466 (1,47)	a 15,1 (32,6) b
<i>sq159. Bacteroides fragilis</i>	7,05 (16,2)	ab 19,8 (41,2)	a 0 (0)	b 5,59 (16,1) ab
<i>sq227. Bacteroides intestinalis</i>	0,776 (2,45)	a 2,58 (8,15)	ab 0 (0)	a 10,7 (26,8) b
<i>sq925. Bacteroides nordii</i>	0 (0)	a 8,24 (20,9)	b 3,84 (12,1)	a 0,278 (0,88) ab
<i>sq483. Bacteroides ovatus</i>	0,542 (1,72)	ab 12,4 (31,1)	a 0 (0)	b 1,16 (2,38) ab
<i>sq346. Bacteroides ovatus</i>	11,6 (36,8)	ab 6,71 (21,2)	a 0 (0)	a 8,47 (18,6) b
<i>sq344. Bacteroides ovatus</i>	0,836 (2,64)	a 1,68 (4,21)	ab 7,45 (15,2)	ab 3,52 (5,99) b
<i>sq35. Bacteroides plebeius</i>	0,38 (0,803)	a 26,1 (82,6)	a 98,5 (311)	a 117 (305) b
<i>sq116. Bacteroides stercoris</i>	15,4 (42,3)	a 12,6 (26,7)	b 25,9 (82)	bc 0 (0) c
<i>sq112. Bacteroides stercoris</i>	0 (0)	a 4,9 (10,7)	b 55 (174)	ab 0 (0) a
<i>sq663. Bacteroides thetaiotaomicron</i>	1,59 (5,04)	a 1,42 (4,49)	a 11,1 (28)	b 0,774 (2,45) a
<i>sq974. Bacteroides uniformis</i>	0,996 (3,15)	a 1,26 (3,99)	a 3,58 (9,65)	ab 9,59 (21,2) b
<i>sq612. Bacteroides uniformis</i>	1,05 (3,33)	ab 6,05 (13,2)	a 7,54 (13,5)	ab 0,523 (1,65) b
<i>sq1009. Bacteroides vulgatus</i>	3,05 (7)	a 2,51 (5,64)	ab 0,687 (2,17)	a 4,31 (9,09) b
<i>sq1577. Bacteroides vulgatus</i>	0 (0)	ab 0 (0)	a 0 (0)	ab 5,71 (12,8) b
<i>sq288. Bacteroides vulgatus</i>	3,8 (11,2)	ab 0 (0)	a 0,609 (1,92)	ab 16,8 (37) b
<b>Gênero <i>Parabacteroides</i> (6)</b>				
<i>sq161. Parabacteroides distasonis</i>	27,4 (78,5)	a 4,77 (10,1)	ab 16,8 (21,7)	ab 13,8 (43,7) b
<i>sq296. Parabacteroides distasonis</i>	9,24 (29,2)	a 1,32 (2,84)	ab 3,47 (6,54)	b 4,33 (13,1) ab
<i>sq219. Parabacteroides distasonis</i>	0 (0)	a 8,86 (19,8)	b 2,18 (6,54)	ab 22,7 (39,6) b
<i>sq594. Parabacteroides distasonis</i>	0,427 (1,35)	ab 7,22 (17,2)	a 0,0103 (0,0325)	ab 0 (0) b

## APÊNDICES

sq690. <i>Parabacteroides distasonis</i>	0 (0)	a	0 (0)	a	7,78 (17,3)	b	0 (0)	a
sq262. <i>Parabacteroides goldsteinii</i>	9,5 (22,8)	a	1,6 (5,07)	b	4,34 (7,38)	ab	9,81 (12,6)	ab
<b>Gênero <i>Sutterella</i> (6)</b>								
sq411. <i>Dakarella massiliensis</i>	0,227 (0,621)	ab	3,45 (10,9)	a	5,13 (6,49)	ab	9,21 (21,1)	b
sq638. <i>Dakarella massiliensis</i>	0 (0)	a	0,0316 (0,0998)	ab	3,04 (7,89)	ab	8,59 (15,6)	b
sq1137. <i>Dakarella massiliensis</i>	0 (0)	a	1,56 (4,94)	a	2,23 (7,06)	a	3,19 (6,73)	b
sq154. <i>Duodenibacillus massiliensis</i>	0,841 (2,66)	a	32,2 (67)	b	0 (0)	a	2,14 (6,76)	ab
sq184. <i>Duodenibacillus massiliensis</i>	0 (0)	a	27,1 (50,7)	b	0 (0)	a	6,35 (20,1)	ab
sq252. <i>Sutterella wadsworthensis</i>	2,27 (7,19)	ab	7,63 (18,3)	a	1,52 (4,8)	ab	0 (0)	b
<b>Gênero <i>Prevotella</i> (5)</b>								
sq80. <i>Prevotella copri</i>	0,0125 (0,0397)	a	0,417 (0,619)	ab	33,6 (71,8)	a	186 (572)	b
sq121. <i>Prevotella copri</i>	7,64 (23,9)	ab	0 (0)	a	59,1 (174)	b	0 (0)	a
sq110. <i>Prevotella copri</i>	42,4 (124)	a	1,16 (3,66)	b	20,6 (65,1)	b	2,74 (5,05)	ab
sq300. <i>Prevotella stercorea</i>	0 (0)	a	31,6 (59,7)	b	0 (0)	a	55,9 (124)	b
sq128. <i>Prevotella stercorea</i>	0 (0)	a	12,9 (22)	b	0 (0)	a	108 (339)	ab
<b><i>Catenibacterium</i> genus (3)</b>								
sq132. <i>Catenibacterium mitsuokai</i>	0,169 (0,536)	ab	15,3 (34,8)	a	2,24 (7,09)	b	0 (0)	b
sq199. <i>Catenibacterium mitsuokai</i>	7,59 (16,4)	a	11,8 (20)	ab	0 (0)	c	1,5 (4,73)	bc
sq471. <i>Catenibacterium mitsuokai</i>	0 (0)	a	11,8 (30,3)	b	0,265 (0,837)	ab	0,734 (2,32)	a
<b>Gênero <i>Megasphaera</i> (3)</b>								
sq478. <i>Megasphaera elsdenii</i>	0 (0)	a	9,59 (30,3)	a	24 (62,5)	b	0 (0)	a
sq203. <i>Megasphaera elsdenii</i>	0 (0)	a	13,8 (26,5)	b	57,2 (181)	a	6,89 (21,8)	a
sq146. <i>Megasphaera elsdenii</i>	11 (34,9)	a	19,3 (37,3)	ab	32,2 (52,9)	b	2,35 (7,44)	ab
<b>Gênero <i>Phascolarctobacterium</i> (3)</b>								
sq92. <i>Phascolarctobacterium succinatutens</i>	29,6 (53,8)	a	36,5 (79,8)	ab	25,7 (66,2)	a	0	
sq343. <i>Phascolarctobacterium succinatutens</i>	10,7 (24,6)	a	0 (0)	b	2,06 (6,5)	b	0	
sq352. <i>Phascolarctobacterium succinatutens</i>	15,5 (26,1)	a	6,1 (19,3)	b	2,25 (7,12)	b	0	



## APÊNDICES

<b>Gênero <i>Faecalibacterium</i> (2)</b>								
<i>sq101. Faecalibacterium prausnitzii</i>	1,29 (4,09)	a	20,5 (34,4)	ab	58,1 (141)	b	9,31 (15,8)	ab
<i>sq188. Faecalibacterium prausnitzii</i>	0 (0)	a	6,8 (11,1)	b	0 (0)	a	1,04 (3,3)	ab
<b>Gênero <i>Veillonella</i> (2)</b>								
<i>sq558. Veillonella atypica</i>	0 (0)	a	0,105 (0,333)	ab	15,8 (44,9)	b	3,38 (7,82)	ab
<i>sq702. Veillonella rogosae</i>	0,473 (1,5)	ab	0 (0)	a	0 (0)	a	4,83 (8,16)	b
<b>Outros gêneros (16)</b>								
<i>sq1000. Eubacterium ramulus</i>	2,84 (6,35)	a	0,144 (0,456)	ab	4,04 (12,8)	b	0,83 (2,24)	ab
<i>sq24. Akkermansia muciniphila</i>	37,4 (78,5)	a	35,9 (83,3)	ab	121 (383)	bc	15,2 (48,2)	c
<i>sq105. Alistipes shahii</i>	10,7 (19,2)	a	5,8 (9,26)	a	0,301 (0,953)	b	14,4 (18,9)	ab
<i>sq113. Prevotellamassilia timonensis</i>	0 (0)	a	12,6 (39,8)	ab	0 (0)	a	79,1 (142)	b
<i>sq389. Anaerostipes hadrus</i>	4,09 (9,44)	a	4,87 (6,38)	a	0 (0)	b	0,21 (0,664)	ab
<i>sq316. Butyricimonas virosa</i>	2,26 (4,78)	ab	4,66 (6,38)	ab	6,72 (16,1)	a	0,263 (0,831)	b
<i>sq440. Coprococcus eutactus</i>	3,46 (10,9)	a	7,96 (19,3)	b	0 (0)	a	1,09 (2,48)	ab
<i>sq282. Dialister invisus</i>	1,79 (3,96)	ab	26,2 (65,1)	a	5,6 (17,5)	ab	9,09 (28,7)	b
<i>sq231. Escherichia coli</i>	0 (0)	a	0,634 (2)	a	19 (33,2)	b	5,17 (13,5)	ab
<i>sq723. Eubacterium hallii</i>	4,36 (8,19)	a	1,98 (3,22)	a	0 (0)	b	0,63 (1,16)	ab
<i>sq312. Lactobacillus ruminis</i>	0 (0)	a	4,97 (11,2)	a	11,5 (29,8)	b	6,42 (16)	ab
<i>sq359. Mitsuokella jalaludinii</i>	3,29 (10,4)	a	6,72 (16,3)	b	2,31 (7,3)	a	25,3 (56,5)	ab
<i>sq332. Parasutterella secunda</i>	5,2 (16,4)	a	32,2 (88,6)	b	5,95 (18,8)	a	25,3 (76,1)	ab
<i>sq384. Eubacterium siraeum</i>	4,68 (10,1)	a	11,1 (35,1)	b	0 (0)	ab	13,3 (42,1)	ab
<i>sq58. Ruminococcus bromii</i>	22,1 (69,9)	a	20,5 (54,1)	b	132 (255)	bc	11,3 (23,8)	ac
<i>sq989. Senegalimassilia anaerobia</i>	1,97 (2,8)	ab	0,111 (0,351)	ab	0 (0)	a	2,43 (6,94)	b

Abundância relativa média de sequências bacterianas em PPM (parte por milhão) seguida de desvio padrão entre parênteses. Letras diferentes indicam diferença significativa entre quartis (p valor < 0,01).

**Tabela suplementar 7.** Comparação das médias índices Chao, Shannon e Simpson, parâmetros de alfa diversidade, entre os pacientes com remissão clínica e recidiva de doença em 06 meses (n=34) e 12 meses (n=31).

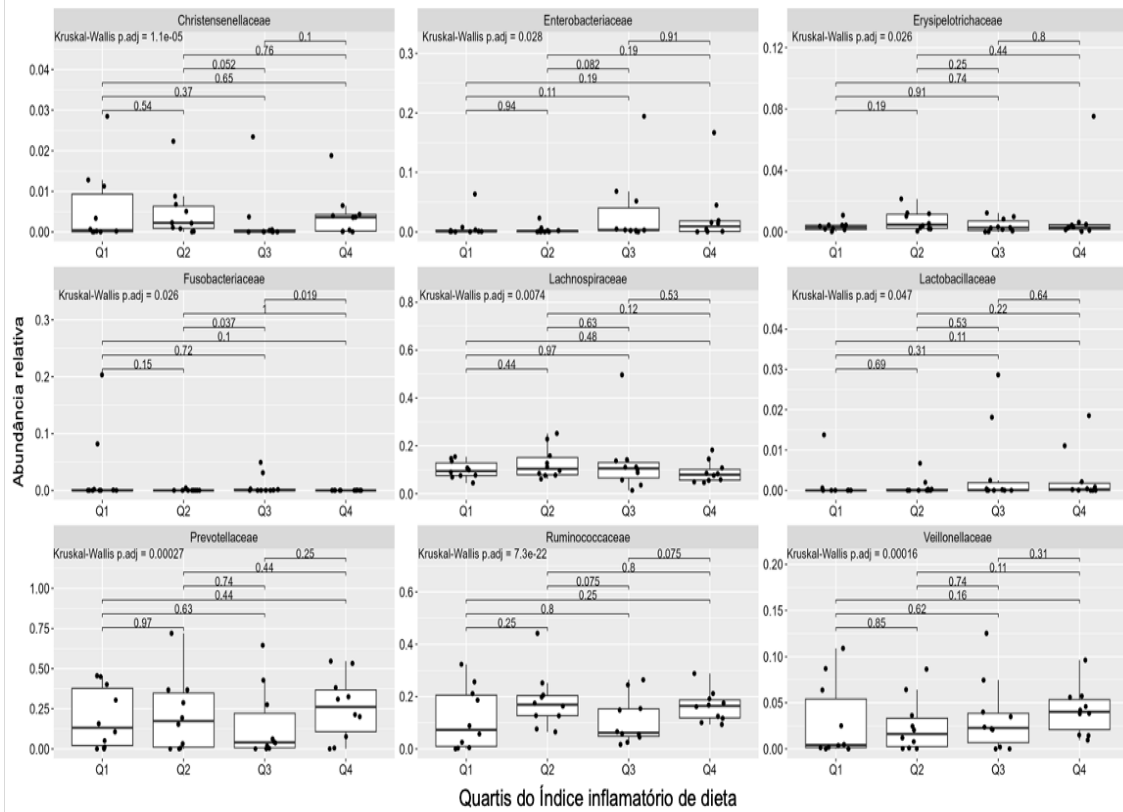
Índice de diversidade	Remissão clínica Média (DP)	Recidiva de doença Média (DP)	p valor
<b>6 meses</b>			
Chao	243,68 (89,21)	215,01 (41,09)	0,23
Shannon	3,92 (0,56)	3,81 (0,40)	0,34
Simpson	0,95 (0,03)	0,94 (0,02)	0,54
<b>12 meses</b>			
Chao	233,27 (82,22)	229,44 (60,16)	0,82
Shannon	3,89 (0,51)	3,90 (0,42)	0,85
Simpson	0,95 (0,02)	0,95 (0,02)	0,95

Legenda: DP: desvio padrão.

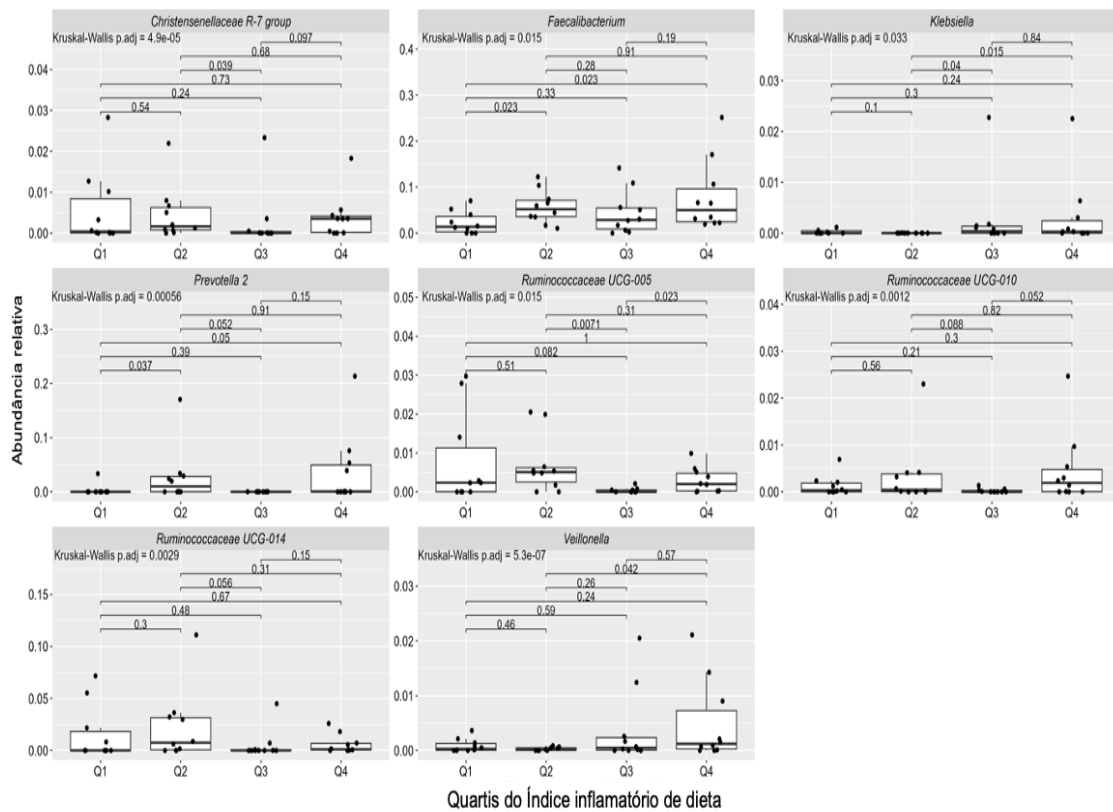
**Tabela suplementar 8.** Análise comparativa entre os modelos logísticos testados para predição de recidiva de doença em 06 meses (n=34) e 12 meses (n=31).

Indicadores	6 meses			12 meses		
	Pseudo R <sup>2</sup>	Acurácia	ROC	Pseudo R <sup>2</sup>	Acurácia	ROC
Calprotectina	0.2099	0.7647	0.8511	0.2736	0.7419	0.6524
Zonulina	0.1334	0.7647	0.5911	0.1310	0.8065	0.7
IID	0.16360	0.7353	0.5711	0.2515	0.7097	0.6548
RPC	0.0736	0.7647	0.5556	0.1033	0.7097	0.5762
Vitamina D	0.00443	0.7353	0.5533	0.0120	0.6774	0.5

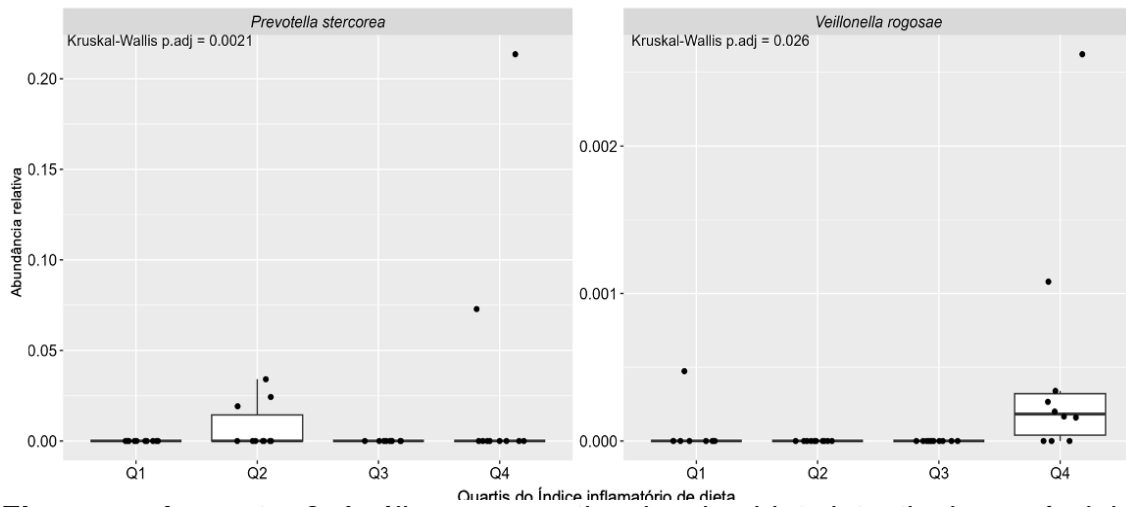
Apêndice 4. Figuras suplementares



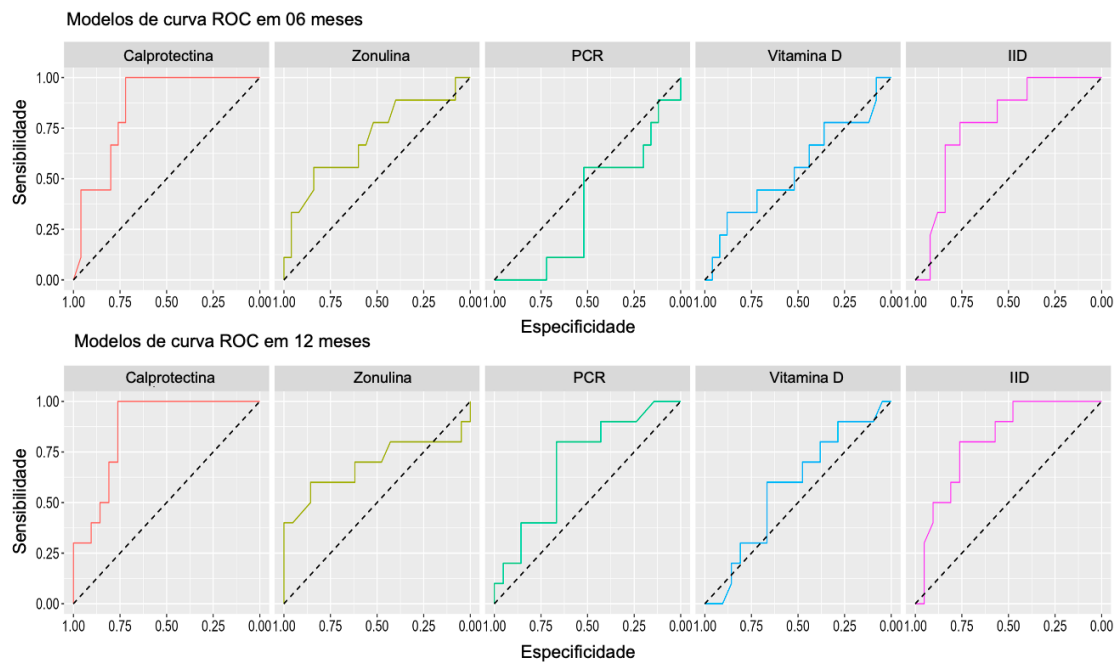
**Figura suplementar 1.** Análise comparativa da microbiota intestinal, em nível de família, da microbiota intestinal de pacientes com doenças inflamatórias intestinais (DII) estratificada por quartis de índice de inflamação alimentar.



**Figura suplementar 2.** Análise comparativa da microbiota intestinal, em nível de gênero, da microbiota intestinal de pacientes com doenças inflamatórias intestinais (DII) estratificada por quartis de índice de inflamação alimentar.



**Figura suplementar 3.** Análise comparativa da microbiota intestinal, em nível de espécies, da microbiota intestinal de pacientes com doenças inflamatórias intestinais (DII) estratificada por quartis de índice de inflamação alimentar.



**Figura suplementar 4.** Modelos de curva de ROC dos modelos testados em 06 e 12 meses.

