

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO HUMANA

LORENA MORAIS COSTA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O ÍNDICE INFLAMATÓRIO DA DIETA E A
COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL EM INDIVÍDUOS COM
CONSTIPAÇÃO INTESTINAL**

BRASÍLIA
2020

LORENA MORAIS COSTA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O ÍNDICE INFLAMATÓRIO DA DIETA E A
COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL EM INDIVÍDUOS COM
CONSTIPAÇÃO INTESTINAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana do Departamento de Nutrição da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Borges Botelho

BRASÍLIA
2020

LORENA MORAIS COSTA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O ÍNDICE INFLAMATÓRIO DA DIETA E A
COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL EM INDIVÍDUOS COM
CONSTIPAÇÃO INTESTINAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana do Departamento de Nutrição da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

Data: 20/11/2020

Banca Examinadora

Prof. Dr^a. Patrícia Borges Botelho

Presidente - Departamento de Nutrição – Universidade de Brasília (UnB)

Prof. Dr^a. Ana Carolina Franco de Moraes

Membro titular – Pós-Doutorado Universidade de São Paulo (USP)

Prof. Dr^a. Helen Hermana Miranda Hermsdorff

Membro titular – Departamento de Nutrição – Universidade de Viçosa

Prof. Dr^a. Cristiane Cominetti

Membro Suplente – Faculdade de Nutrição – Universidade Federal de Goiás (UFG)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me proporcionar viver a experiência do mestrado em uma universidade pública, em outra cidade, e por ser o meu sustento em todos os momentos.

Aos meus pais, João e Ariádina, pela dedicação com a minha formação e por serem o alicerce de todas as minhas conquistas. Em especial à minha mãe, pelo amor, confiança e apoio incondicionais que me trouxeram até aqui.

À minha irmã, Larissa, que foi a minha maior saudade durante esse tempo, mas que sempre se fez presente em todos os momentos, apoiando minhas escolhas e celebrando minhas vitórias.

Aos meus primos Lorrán, Luan e Mariana e sua família, por terem me acolhido e amparado com tanto carinho em Brasília. E à Paula, João Victor, Débora, Vitor e Rayssa que sempre me auxiliaram em tudo que precisei.

Ao meu namorado, Renato, a quem dedico todo o meu amor. Agradeço por me enxergar muito melhor do que eu realmente sou, por me fazer acreditar em mim e por não medir esforços para que tudo fosse possível durante esses quase dois anos à distância. De idas e vindas de Brasília à todas as minhas alegrias e aflições. Você é minha luz!

À família do meu namorado, pelo acolhimento e por serem meu lar em todas as circunstâncias.

À Patrícia, minha orientadora, amiga, parceira e maior incentivadora, minha inspiração e exemplo de profissional desde a minha graduação na UFG. A ela dedico tudo que construí no mestrado e todas as oportunidades que tive nesse período: do meu primeiro artigo escrito à ser professora voluntária na UnB, ela estava lá. Obrigada pela companhia em Brasília, pela dedicação em transmitir tudo que sabe, por me corrigir, por ser presente e andar lado a lado. Minha eterna admiração, estar com você é um privilégio!

Aos meus amigos Grace, Lara Caroline, Rodrigo e Aderuza, que acompanharam de perto a minha caminhada e, ainda que à distância, sempre se fizeram presentes em todos os momentos, da escrita do projeto aos finais de semana em Brasília. Ter vocês para dividir a vida é a maior prova da generosidade e amor de Deus comigo.

À minha amiga Lara Nabuco, companheira de graduação e mestrado, com quem dividi todas etapas desse processo. Seu amparo e amor me fizeram mais forte e perseverante.

Às pessoas maravilhosas que conheci na UnB, em especial a Lara, Lorena, Mariana, Victória, Maísa, Ananda e Bernardo, com quem compartilhei, diariamente, frustrações, angústias, aprendizados e momentos felizes e inesquecíveis. Sem nossa parceria e apoio, não seria possível!

Às professoras Kênia e Teresa e à Marcela pela generosidade em compartilhar seus conhecimentos para que eu pudesse também construir o meu. Vocês são incríveis!

Ao grupo de Pesquisa em Nutrição e Saúde (PENSA) que me proporcionou desenvolver habilidades e adquirir conhecimentos ímpares.

Por fim, gratidão a tudo que vivi nesse período, a tudo que me foi confiado e a tudo que o mestrado me trouxe. Todas essas coisas contribuíram para o meu crescimento profissional e também pessoal. Estive exatamente aonde deveria estar, com quem e da forma que deveria estar!

Essa dissertação é o trabalho que eu mais me orgulho em ter feito até aqui, foi onde depus toda a minha dedicação, onde tive meus maiores aprendizados e por meio da qual vivenciei experiências extremamente importantes.

RESUMO

Introdução: A Constipação Crônica Funcional (CCF) é um distúrbio de motilidade intestinal que pode estar relacionado ao desequilíbrio da microbiota intestinal, à resposta inflamatória desregulada e a alimentação inadequada. O Índice Inflamatório da Dieta (IID) avalia o potencial inflamatório da dieta com base no consumo médio de nutrientes e alimentos e relaciona-os a diversos desfechos em saúde. Não há na literatura nenhum estudo que tenha relacionado o IID, a microbiota intestinal e marcadores inflamatórios em indivíduos com CCF. **Objetivo:** avaliar se existe associação entre o potencial inflamatório da dieta, medido pelo IID, e a composição da microbiota intestinal em adultos com CCF. **Metodologia:** Trata-se de um estudo transversal com 68 adultos com CCF, diagnosticados de acordo com os critérios de ROMA IV. Foram coletadas amostras de fezes para análise da microbiota intestinal, pelo método de sequenciamento do gene 16S rRna e amostras de sangue para análise dos marcadores de inflamação (TNF- α , IgG, IgM, IgA, Proteína C-reativa, IL-6, IL-10, IL-12, IL-1 β , MCP-1). Dados do consumo alimentar foram coletados para o cálculo do IID, que foi ajustado pela energia (E-IID). Dados antropométricos e de nível de atividade física também foram obtidos. Os indivíduos foram divididos em dois grupos de acordo com o E-DII: grupo de dieta anti-inflamatória (DA: E-IID <0) e grupo de dieta pró-inflamatória (DP: E-IID \geq 0). As associações dos escores E-IID com marcadores inflamatórios, diversidade e composição microbiana foram analisadas pelas diferenças médias entre os grupos E-IID e regressão linear. **Resultados:** O E-IID foi inversamente correlacionado com a abundância relativa de espécies não classificadas de *Hungatella* e *Bacteroides fragilllis* e positivamente correlacionado com *Bacteroides thetaiotaomicron* e *Bacteroides caccae*. O grupo DA (E-IID <0) apresentou maior abundância relativa dos gêneros *Blautia* e *Hungatella* e menor abundância relativa das espécies *Bacteroides thetaiotaomicron* e das espécies não classificadas de *Bacteroides*. Além disso, a dieta mais anti-inflamatória foi associada com uma redução na abundância relativa de espécies não classificadas de *Desulfovibrio*, espécies não classificadas de *Butyrivibrio* e as espécies *Butyrivibrio crossotus*, *Bacteroides clarus*, *Bacteroides coprophilus* e *Bacteroides intestinalis*. Não houve diferença significativa entre os grupos de E-IID para marcadores inflamatórios. **Conclusão:** Portanto, os resultados deste estudo indicam que o IID está associado à microbiota intestinal em indivíduos com CCF.

Palavras-chave: índice inflamatório da dieta; microbiota; inflamação; constipação intestinal

ABSTRACT

Introduction: Chronic Functional Constipation (FC) is a disorder of intestinal motility that can be related to the imbalance of the intestinal microbiota, to the unregulated inflammatory response and inadequate diet. The Dietary Inflammatory Index (DII®) assesses the inflammatory potential of the diet based on the average consumption of nutrients and food and relates them to various health outcomes. There are no studies in the literature that have related DII, intestinal microbiota and inflammatory markers in individuals with FC. **Objective:** to assess whether there is an association between the inflammatory potential of the diet, measured by the DII®, and the composition of the intestinal microbiota in adults with FC. **Methods:** This is a cross-sectional study with 68 adults with CCF, diagnosed according to the ROMA IV criteria. Stool samples were collected for analysis of the intestinal microbiota using the 16S rRNA gene sequencing method and blood samples for analysis of inflammation markers (TNF- α , IgG, IgM, IgA, C-reactive protein, IL-6, IL -10, 1L-12, 1L-1 β , MCP-1). Food consumption data were collected to calculate the IID, which was adjusted for energy (E-IID). Anthropometric and physical activity level data were also obtained. The individuals were divided into two groups according to the E-DII: anti-inflammatory diet group (AD: E-DII <0) and pro-inflammatory diet group (PD: E-DII \geq 0). The associations of E-IID scores with inflammatory markers, microbial diversity and composition were analyzed by the mean differences between the E-IID groups and linear regression. **Results:** E-IID was inversely correlated with the relative abundance of unclassified species of *Hungatella* and *Bacteroides fragillis* and positively correlated with *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Bacteroides caccae*. The AD group (E-DII <0) showed the highest relative abundance of the genera *Blautia* and *Hungatella* and the lowest relative abundance of the species *Bacteroides thetaiotaomicron* and the non-classified species of *Bacteroides*. In addition, the more anti-inflammatory diet was associated with a reduction in the relative abundance of unclassified species of *Desulfovibrio*, unclassified species of *Butyrivibrio* and the species *Butyrivibrio crossotus*, *Bacteroides clarus*, *Bacteroides coprophilus* and *Bacteroides intestinalis*. There was no significant difference between the E-DII groups for inflammatory markers. **Conclusion:** Therefore, the results of this study indicate that the DII of the diet is associated with the gut microbiota in individuals with FC.

Keywords: dietary inflammatory index; microbiota; inflammation; intestinal constipation

LISTA DE ABREVIações

AAG- Associação Americana de Gastroenterologia
AGCC- Ácidos Graxos de Cadeia Curta
ANCOVA: análise de covariância
CCF- Constipação Crônica Funcional
DA- Dieta Anti-inflamatória
DII- doença inflamatória intestinal
DP- Dieta Pró-Inflamatória
DP- Desvio padrão
E-IID- Índice inflamatório da dieta ajustado pela energia
IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IID- Índice inflamatório da dieta
IMC- Índice de Massa Corporal
IgA- Imunoglobulina A
IgG- Imunoglobulina G
IgM- Imunoglobulina M
IL-6- Interleucina 6
IL-10- Interleucina 10
IL-12- Interleucina 12
IL-22- Interleucina 22
1L-1 β - Interleucina 1 β
IPAQ- Questionário Internacional de Atividade Física
MCP-1 - Proteína-1 quimiotática de monócitos
NDSR- Nutrition Data System for Research
Proteína C reativa- PCR
R24h- Recordatório Alimentar de 24 horas
SE- Erro Padrão
SM- Síndrome Metabólica
TGI- Trato Gastrointestinal
TNF- α - Fator de Necrose Tumoral α

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E QUADROS

CAPÍTULO I

Quadro 1. Evolução histórica dos consensos de ROMA e seus critérios diagnóstico para constipação intestinal baseados em sintomas. Adaptado de Sobrado et al., (2018). Diagnosis and treatment of constipation: a clinical update based on the Rome IV criteria. *Journal of Coloproctology*, v. 38, n. 2, p. 137–144, 2018.

Quadro 2. Influência da ingestão de nutrientes na Microbiota Intestinal

Quadro 3. Pontuação dos artigos de acordo com o tipo e desenho dos estudos. Adaptado de Shivappa et al. (2014). Designing and developing a literature-derived, population-based dietary inflammatory index. *Public Health Nutrition*, v. 17, n. 8, p. 1689–1696, 2014.

CAPÍTULO II

Table 1. Characteristics of participants in anti-inflammatory diet (AD) and pro-inflammatory diet (PD) groups

Table 2. Differences between anti (AD) and pro-inflammatory (PD) diet groups for dietary parameters of E-DII (mean±SD)

Table 3. Differences between anti (AD) and pro-inflammatory (PD) diet groups for inflammatory markers (mean±SD)

Table 4. Differences between anti (AD) and pro-inflammatory (PD) diet groups in percentage of relative abundance of phylum and genus (mean±SD)

Figure 1. Flowchart of participants selected for the study. Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE). E-DII: Energy Adjusted Dietary Inflammatory Index; PD: Pro-Inflammatory Diet; AD: Anti-inflammatory Diet

Figure 2. Differences between anti (AD) and pro-inflammatory (PD) diet groups for the α -diversity index (2A- Evennes, Simpson; 2B- Shannon, Inv Simpson) and the Richness index (2C- CHAO index). ANCOVA - adjusted by water intake. Bars represent adjusted mean and error bars represent adjusted standard error.

Figure 3. Heatmap with frequency of bacterial species identified as differentially abundant by DESeq2 ($\log_2\text{FoldChange} > \pm 2$).

Figure 4. Principal Coordinate Analysis (PCoA) - Microbial community differences, as assessed by Bray-Curtis dissimilarity, between individuals with the most anti-inflammatory vs. pro-inflammatory diet, among all study subjects.

Figure 5. Differences between anti (AD) and pro-inflammatory (PD) diet groups of percentual relative abundance of *Bacteroides thetaiotamicron* (4A), *Bacteroides unclassified species* (4B), *Blautia unclassified species* (4C), *Hungatella unclassified species* (4D), according E-DII. * $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.01$. ANCOVA – Adjusted for Water Intake. Bars represent adjusted mean and error bars represent adjusted standard error.

LISTA DE APÊNDICES E ANEXOS

APÊNDICES

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

APÊNDICE B - Critérios de ROMA IV

APÊNDICE C – Questionário com critérios de inclusão e exclusão

APÊNDICE D – Anamnese

APÊNDICE E – Recordatório 24 horas

ANEXOS

ANEXO 1 - Valores padronizados dos parâmetros alimentares para o cálculo do IID (Shivappa et al., 2014)

ANEXO 2 – Orientações para coleta de fezes

ANEXO 3 – Questionário IPAQ

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
CAPÍTULO I	13
1. REVISÃO DA LITERATURA.....	13
1.1 Constipação intestinal crônica	13
1.2. MICROBIOTA INTESTINAL E HOMEOSTASE INTESTINAL	18
1.3 DISBIOSE, CONSTIPAÇÃO INTESTINAL E RESPOSTA INFLAMATÓRIA	26
1.4. PADRÃO DIETÉTICO, MICROBIOTA INTESTINAL, INFLAMAÇÃO E CONSTIPAÇÃO INTESTINAL	29
1.5 POTENCIAL INFLAMATÓRIO DA DIETA	34
1.5.1 Desenvolvimento do Índice Inflamatório da Dieta.....	34
1.5.2 Cálculo do IID de um parâmetro alimentar e do IID total	36
1.5.3 IID, inflamação e microbiota intestinal	37
2. OBJETIVOS	39
2.1 OBJETIVO GERAL	39
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
3. METODOLOGIA	40
3.1 TIPO DE ESTUDO.....	40
3.2 ASPECTOS ÉTICOS	40
3.3 POPULAÇÃO	40
3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO E VARIÁVEIS INVESTIGADAS.....	41
3.5 ANÁLISE DO CONSUMO ALIMENTAR E CÁLCULO DO E-IID	42
3.5.1 Cálculo do E-IID	42
3.6 ANÁLISE DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS.....	43
3.7 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO E DIVERSIDADE DA MICROBIOTA INTESTINAL	44
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
Referências	47
CAPÍTULO II	54
Artigo Original	54
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	85
APÊNDICE B - Critério de ROMA IV	89
APÊNDICE C – Questionário com Critérios de Inclusão e Exclusão	85
APÊNDICE D – Anamnese	92
APÊNDICE E – Recordatório 24 horas/ Diário Alimentar	93
ANEXO 1 - Valores padronizados dos parâmetros alimentares para o cálculo do IID	94
ANEXO 2 – Orientações para coleta de fezes	97
ANEXO 3 – Questionário IPAQ.....	98

INTRODUÇÃO

Os Distúrbios de Interação Intestino-Cérebro (DIIC) são definidos por anormalidades morfológicas e fisiológicas do trato gastrointestinal, incluindo distúrbios de motilidade, hipersensibilidade visceral, função da mucosa e função imunológica alteradas e desequilíbrio da microbiota intestinal (DROSSMAN, 2016). A constipação intestinal crônica (CC) é um DIIC caracterizado por desordens na motilidade e tem apresentado prevalência crescente (HUANG et al., 2018).

A CC é classificada como funcional (CCF) quando é idiopática e embora a nocividade da CCF seja limitada, esse distúrbio pode estar relacionado com o aumento do risco de várias doenças como câncer colorretal, doença renal e Parkinson. Além disso, os sintomas da CCF podem gerar impactos na qualidade de vida do indivíduo (BHARUCHA et al., 2013).

Esses sintomas foram compilados por um grupo de especialistas em Gastroenterologia (Fundação Roma), que estabeleceram os critérios de ROMA para o diagnóstico da CCF, uma vez que esses sinais têm variações interindividuais. A versão mais recente é o ROMA IV, que classifica os sintomas da CCF de acordo com a consistência das fezes, a frequência e o esforço de evacuação e uso de laxantes em um determinado espaço de tempo (SCHMULSON; DROSSMAN, 2017).

Ainda que idiopática, a CCF pode estar relacionada a fatores como idade, sexo, alimentação, distúrbios defecatórios e de motilidade e a alterações na composição da microbiota intestinal, conhecidas como disbiose (LACY et al., 2016; SIMREN et al., 2015). A disbiose é uma condição de desequilíbrio na composição, função e diversidade de bactérias intestinais que podem implicar na patogênese de diversas doenças (MARCHESI et al., 2016). Esse desequilíbrio é comumente encontrado na CCF e pode alterar a integridade da barreira intestinal e provocar uma resposta inflamatória desregulada, prejudicando a motilidade intestinal, que é um aspecto comum nesse distúrbio intestinal (SIMREN et al., 2015; ZOPPI et al., 1998; ZHU et al., 2014; PARTHASARATHY et al., 2016). No entanto, ainda não é bem estabelecida a relação causal entre CCF e disbiose (ZHU et al., 2014).

A alimentação também tem sido relacionada com a disbiose, a inflamação e a CCF, uma vez que o padrão dietético de diferentes populações pode influenciar a

presença de diferentes espécies bacterianas no intestino (ALBENBERG; WU, 2014). Além disso, a dieta fornece substratos para a fermentação bacteriana, que gera ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) como produto. Os AGCC, por sua vez, têm um papel importante no crescimento de inúmeras bactérias e na modulação da inflamação, influenciando o desenvolvimento da CCF (KEDIA et al., 2016).

Desta forma, considerando que fatores dietéticos podem modular a inflamação, foi desenvolvido o Índice Inflamatório da Dieta (IID). O IID tem como objetivo avaliar o potencial inflamatório da dieta e pode ser relacionado à desfechos em saúde (SHIVAPPA et al., 2014). Shivappa et al. (2018) observaram que maiores pontuações do IID (dieta pró-inflamatória) foram associadas a níveis elevados de proteína C-reativa (PCR) e a menor concentração de enterolignanas, um metabólito marcador da diversidade microbiana intestinal. Um outro estudo investigou a influência do IID sobre a composição e diversidade da microbiota intestinal em adultos e observou que a abundância de algumas espécies variou entre a dieta pró e anti-inflamatória, no entanto não encontrou associação entre o IID e marcadores inflamatórios (Zheng et al., 2020).

Até o momento, não foi avaliado se há relação entre o potencial inflamatório da dieta, medido pelo IID, e a composição e diversidade da microbiota intestinal em indivíduos com CCF. Portanto, o objetivo deste estudo é avaliar se há associação entre o índice inflamatório da dieta e a composição da microbiota intestinal em indivíduos com constipação intestinal.

CAPÍTULO I

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Constipação intestinal crônica

A Associação Americana de Gastroenterologia (AAG) define constipação intestinal crônica (CC) como um DIIC caracterizado por evacuação incompleta, difícil e/ou pouco frequente (menos de 3 vezes por semana) (BHARUCHA et al., 2013). Embora a CCF seja definida com base na motilidade intestinal pouco frequente, os pacientes apresentam um conjunto amplo de sintomas, como fezes endurecidas, sensação de evacuação incompleta, desconforto abdominal, inchaço e distensão abdominal (BHARUCHA et al., 2013).

A CC é um dos tipos de DIIC mais comum e atinge, em média, 16 % da população ocidental adulta, dos quais 33 % têm mais de 60 anos, com predominância do sexo feminino (BHARUCHA et al., 2013; SOBRADO et al., 2018). Entretanto, a prevalência de constipação pode ser subestimada, uma vez que 65 % das pessoas com sintomas de constipação não procuram os serviços de saúde. As estimativas também podem variar de acordo com os fatores sociodemográficos e com os critérios de diagnóstico utilizados (TACK et al., 2011).

O diagnóstico de constipação requer avaliação da história clínica, exames físicos e proctológicos, avaliação do trânsito colônico, investigação de sintomas persistentes e/ou resistência ao tratamento inicial com dieta, mudança de estilo de vida e medicamentos à base de fibra (SOBRADO et al., 2018; LACY et al., 2016). Entre os critérios de diagnóstico existentes para a constipação intestinal crônica e outros distúrbios intestinais estão os critérios de ROMA, que foram desenvolvidos por um grupo internacional de pesquisadores em gastroenterologia (TACK et al., 2011; SCHMULSON; DROSSMAN, 2017). Esses critérios são baseados em sintomas e foram atualizados ao longo dos anos, sendo o ROMA IV a sua versão mais atual (Quadro 1) (SOBRADO et al., 2018).

Quadro 1. Evolução histórica dos consensos de ROMA e seus critérios diagnóstico para constipação intestinal baseados em sintomas

Sintomas e Diagnóstico	ROMA I (1994)	ROMA II (1999-2000)	ROMA III (2006)	ROMA IV (2016)
Esforço para evacuar	> 25% das evacuações	> 25% das evacuações	> 25% das evacuações	> 25% das evacuações
Fezes irregulares ou duras	> 25% das evacuações	> 25% das evacuações	> 25% das evacuações	> 25% das evacuações
Sensação de Evacuação incompleta	> 25% das evacuações	> 25% das evacuações	> 25% das evacuações	> 25% das evacuações
Sensação de Obstrução anorretal	-	> 25% das evacuações	> 25% das evacuações	> 25% das evacuações
Manobras Manuais facilitar a evacuação	-	> 25% das evacuações	> 25% das evacuações	> 25% de evacuações
Menos de 3 evacuações/ semana	sim	sim	sim	Sim
Número de critérios para diagnóstico	≥2	≥2	≥2	≥2
Tempo dos sintomas	3 meses	12 semanas/ 12 meses	3 - 6 meses	3-6 meses

Fonte: Adaptado de Sobrado et al., 2018.

O ROMA IV é uma síntese dos conhecimentos referidos nas versões anteriores e os critérios estabelecidos para o diagnóstico da constipação incluem esforço defecatório em mais de 25 % das vezes, fezes duras ou volumosas em caroços em mais de 25 % das defecações, sensação de evacuação incompleta em mais de 25 % das defecações, sensação de obstrução/bloqueio anorretal mais de 25 % das defecações, manobras manuais para facilitar as defecações em mais de 25 % dos casos, menos de 3 evacuações por semana. Além disso, inclui também fezes com aspecto amolecido raramente presentes sem o uso de laxantes e ausência de outros critérios suficientes para diagnóstico de Síndrome do Intestino Irritável. Esses sintomas devem estar presentes nos últimos três meses e com início dos sintomas em, pelo menos, seis meses antes do diagnóstico (AZEVEDO et al., 2017; LACY et al., 2016).

Diferente do ROMA III, o ROMA IV considera também aspectos como: (1) Orientações multiculturais e redução de termos imprecisos que facilitam o entendimento transcultural das perguntas do questionário e a interpretação dos sintomas relatados; (2) Informações sobre o microbioma do trato gastrointestinal, alimentação, aspectos farmacológicos e suas interações com os DIIC; (3) Fatores biopsicossociais e genéticos; (4) Distúrbios com etiologia conhecida, como constipação induzida por opioides, que não são funcionais, mas são caracterizadas pela interação do intestino com o SNC; (5) Informações sobre a doença do paciente em termos fisiológicos e de biomarcadores, para que o tratamento seja mais direcionado (DROSSMAN, 2016).

O consenso de ROMA descreve ainda que a CC pode ser classificada em Primária ou Funcional, quando é idiopática, e Secundária ou Orgânica, quando identifica-se anormalidades intestinais ou extra-intestinais, como causas endócrinas, metabólicas (hipotireoidismo, diabetes, insuficiência renal), disfunção anorretal (fissuras, estenose), desordem neurológica (Parkinson, lesão medular) e/ou medicamentosas (TACK et al., 2011; BASILISCO; COLETTA, 2013; SOBRADO et al., 2018

Entretanto, o conceito de “funcional” tem sido discutido, uma vez que distúrbios desse tipo podem ter uma base orgânica (BASSOTTI et al., 2013), podendo estar relacionado à fatores como idade, sexo, alimentação, aspectos

psicossociais, distúrbios defecatórios e de motilidade e à composição da microbiota intestinal (BASILISCO; COLETA, 2013).

Nesse contexto, a AAG não classifica a CC de acordo com a etiologia, mas a divide de acordo com a avaliação do tempo de trânsito intestinal, que corresponde ao tempo gasto para o conteúdo intraluminal atravessar o trato gastrointestinal e reflete as contrações tônicas e fásicas do intestino (DIMIDI et al., 2017). A classificação compreende três categorias: Constipação crônica de trânsito lento (CTL), Constipação crônica de trânsito normal (CTN) e Disfunção do assoalho pélvico ou Distúrbios defecatórios (BHARUCHA et al., 2013).

Na CTN o trânsito colônico das fezes e a frequência de evacuação são normais. Contudo, alguns pacientes podem apresentar distúrbios motores e sintomas comuns da constipação, como dor e desconforto abdominais, dificuldade para evacuar, fezes endurecidas e inchaço (TACK et al., 2011).

A CTL é caracterizada por um tempo maior de passagem das fezes no cólon, que pode ser atribuído à uma disfunção neural ou do músculo liso do cólon e/ou à uma alimentação inadequada. Em pacientes com disfunção motora, as respostas contráteis do cólon são reduzidas e permanentes por um período de pelo menos 24 horas. A motilidade prejudicada pode estar relacionada a uma redução acentuada dos nervos intrínsecos do cólon e nas células intersticiais de Cajal, que reduzem a propulsão da musculatura lisa e reflete na diminuição da atividade excitatória no plexo mioentérico (TACK et al., 2011; BHARUCHA et al., 2013). Esses fatores implicam em uma menor resposta à acetilcolina e à serotonina, que são neurotransmissores que estimulam a atividade contrátil do músculo, e está associado às fezes pequenas e duras (BASILISCO; COLETTA, 2013).

A CC por disfunção do assoalho pélvico ou distúrbios defecatórios consiste na dificuldade de evacuação, devido à propulsão anorretal comprometida e pode ocorrer na CTL ou na CTN. A etiologia dos distúrbios defecatórios presentes neste tipo de CC ainda não é clara e pode ser atribuída a um aprendizado não-adaptativo da contração do esfíncter, talvez iniciado na infância por evitar dor ou trauma, ou até mesmo por não responder à vontade de evacuar no momento. Mas pode ser decorrente também de uma evacuação anorretal incompleta resultante de forças propulsivas retais inadequadas e/ou aumento da resistência à evacuação, contração e relaxamento incompletos dos esfíncteres anais, contração comprometida do

assoalho pélvico e até hipossensibilidade e hipotonicidade retal (TACK et al., 2011). Conseqüentemente, o esforço excessivo para evacuação pode enfraquecer o assoalho pélvico (BHARUCHA et al., 2013) e alterar a motilidade intestinal.

A motilidade intestinal é controlada também pelo sistema nervoso entérico em conjunto com os sistemas nervoso autônomo e central. Simultaneamente, o sistema imunológico, as secreções gastrointestinais, a microbiota intestinal e os produtos da fermentação microbiana também exercem influência sobre ela (DIMID et al., 2017).

A 5-hidroxitriptamina (5-HT) é o principal neurotransmissor do eixo cérebro-intestino, secretada pelas células enterocromafins do estômago e tem papel importante na motilidade intestinal. O seu receptor (SERT) está distribuído nos neurônios entéricos sendo o principal regulador da disponibilidade da 5-HT (HUANG et al., 2018). Os agonistas de SERT induzem potenciais pós-sinápticos excitatórios rápidos em neurônios intrínsecos, liberam neurotransmissores como a acetilcolina excitatória e induzem secreção de muco ativando neurônios submucosos e estimulando a motilidade intestinal (BHARUCHA et al., 2013).

Estudos em camundongos demonstraram que a microbiota intestinal pode modular a sinalização mediada pela 5-HT por meio da produção de metabólitos solúveis que influenciam a sua síntese e a expressão de SERT, influenciando a motilidade gastrointestinal (CAO et al., 2017; YANO et al., 2015). Além disso, Khalif et al. (2005) observaram que indivíduos com CTL apresentaram redução de bactérias comensais (*Lactobacillus* e *Bifidobacterium*) e aumento de bactérias patogênicas no cólon. Este estudo sugeriu que as mudanças na microbiota podem ter sido secundárias à constipação, devido ao tempo de permanência das fezes no intestino de indivíduos com CTL, bem como que metabólitos produzidos pela microbiota intestinal alterada possam ter contribuído para as alterações na motilidade colônica que levaram à CTL. (CAO et al., 2017; YANO et al., 2015; BHATTARAI et al., 2017).

Nesse sentido, é possível perceber que alterações na microbiota podem estar relacionadas às mudanças na dinâmica intestinal e ao desenvolvimento de distúrbios como a constipação intestinal.

1.2. MICROBIOTA INTESTINAL E HOMEOSTASE INTESTINAL

A barreira intestinal é uma unidade funcional formada por uma barreira física, uma barreira imunológica e pela microbiota intestinal (**Figura 1**) (ARTIS, 2008).

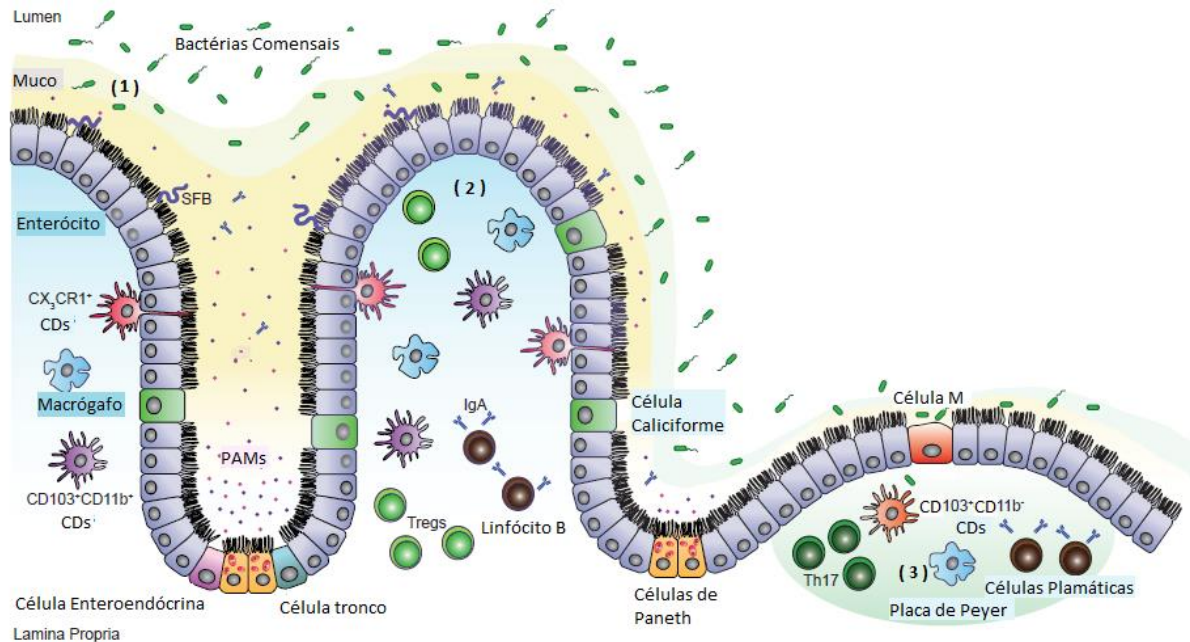


Figura 1 - Barreira do Epitélio Intestinal em Homeostase

Fonte: Adaptado de MUNIZ; KNOSP; YERETSSIAN (2012)

O Epitélio Intestinal é formado por uma camada única de células colunares simples, cobertas por uma camada de muco. A camada externa de muco (1) é colonizada por bactérias comensais e a camada interna (2) contém Imunoglobulina A e peptídeos antimicrobianos (PAMs), que impedem a interação de bactérias com as células epiteliais (CEI's). Bactérias oportunistas, como as bactérias filamentosas segmentadas (SFB) podem romper a barreira mucosa e entrar em contato com as CEI's. As CEI's são derivadas de células tronco, são elas: enterócitos, células caliciformes (produtoras de muco), células enteroendócrinas (produtoras de hormônios), células de Paneth -produtoras de peptídeos antimicrobianos (PAM's) e células M (apresentadoras de antígenos do lúmen intestinal às células imunes próximas). Linfócitos T, macrófagos, Linfócitos B (secretores de IgA) e células plasmáticas estão presentes na lâmina própria e nas placas de Peyer (3), onde se comunicam com as CEI's por meio das células dendríticas (CD's) e células M. As CD's CD103 + CD11b- e CD103+ CD11b+ induzem respostas dos linfócitos T auxiliares (Th17) e T reguladores (Tregs), enquanto as CD's CX3CR1 captam antígenos no lúmen intestinal.

A barreira física é composta por células epiteliais colunares simples (células caliciformes, células de Paneth, células M e Enterócitos) que formam extensões microvilares e são cobertas por muco. As células caliciformes secretam mucina, que é substrato para bactérias e forma uma camada externa protetora. Já as células de Paneth produzem peptídeos antimicrobianos (PAMs) e Imunoglobulina A (Ig A) e as Células M são as células especializadas em apresentar antígenos às células imunológicas próximas e cobrem as placas de Peyer e os folículos linfóides. Os

Enterócitos são responsáveis pela absorção de produtos da digestão e secreção de PAMs e as células enteroendócrinas secretam hormônios. Essas células se unem por meio das *Tight-junctions*, que controlam a permeabilidade intestinal (MUNIZ; KNOSP; YERETSSIAN, 2012).

A barreira Imunológica é a camada mais interna formada por um complexo de células imunológicas conhecido como tecido linfóide intestinal associado ao epitélio (GALT). Nessa camada encontram-se os Linfócitos T e B, as Células Dendríticas e os Macrófagos, que desencadeiam uma resposta imune quando em contato com antígenos do lúmen intestinal (ARTIS, 2008; MUNIZ; KNOSP; YERETSSIAN, 2012).

Além da barreira física e imunológica, o intestino é constituído também por trilhões de microrganismos entre bactérias, vírus, fungos, arqueas e protozoários, os quais compõem a microbiota intestinal (CANI, 2018). A composição da microbiota intestinal do indivíduo é dinâmica e começa a ser formada desde a fase intrauterina, se expandindo e se modificando com o nascimento e ao longo da vida (AAGAARD et al., 2014; COLLADO et al., 2016).

Dentre os microrganismos que compõem a microbiota intestinal saudável, existem mais de 3500 espécies bacterianas e cerca de 1000 espécies estão localizadas principalmente na região do cólon (FRANK et al., 2007). Destas, 90 % pertencem ao filo *Firmicutes* (Gram-positivas e Gram-negativas), que predominam espécies da classe *Clostridia* e as famílias *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae* e *Lactococcus spp*, e ao filo *Bacteroidetes* (Gram-negativas), que incluem várias espécies de *Bacteroides* (*Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides ovatus* e outras). Os 10 % restantes da população bacteriana intestinal pertencem aos filios *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Spirochaetes* e *Cianobactérias* (JANDHYALA et al., 2015; WALKER; LAWLEY, 2012).

Esses microrganismos podem ser classificados em residentes ou transitórios/temporários. Os residentes são microrganismos permanentes da microbiota intestinal, adquiridos desde o nascimento, que estabelecem uma relação de simbiose com o hospedeiro e podem ser classificados em autobiontes ou patobiontes. Os microrganismos autobiontes influenciam a dinâmica intestinal e exercem uma atividade imunomoduladora que não causa mudança no estado de

saúde do hospedeiro, mas auxilia na homeostase do sistema imunológico (IVANOV; HONDA, 2012).

Os patobiontes, por sua vez, são microrganismos que colonizam o hospedeiro e não causam prejuízos se a microbiota intestinal estiver em homeostase. No entanto, eles possuem um potencial patogênico e podem se expandir em condições de desequilíbrio da microbiota intestinal (como em casos de uso de antibiótico e inflamação intestinal), invadir o tecido do hospedeiro causando uma quebra da homeostase e ativando respostas imunológicas (CHOW; TANG; MAZMANIAN, 2011; IVANOV; HONDA, 2012).

A microbiota transitória, por sua vez, não coloniza permanentemente o Trato Gastrointestinal (TGI) por falta de mecanismos adaptativos ou capacidade de competir com a microbiota residente. Ela é representada por microrganismos que são introduzidos durante a vida e modificados a partir do ambiente externo, que podem ser inócuos, patogênicos ou benéficos, como microrganismos associados à alimentos ou probióticos. Esses microrganismos transitórios não se tornam permanentes no hospedeiro, mas podem influenciar a resposta imune (IVANOV; HONDA, 2012).

Desta forma, a microbiota intestinal residente pode modular as respostas imunes inata e adaptativa, influenciar a integridade da barreira intestinal e proteger contra microrganismos patogênicos, a depender da sua composição. Esses microrganismos residentes influenciam o desenvolvimento, a supressão e a função das células plasmáticas secretoras de IgA, dos linfócitos Th17 e Treg, das células natural killer, de macrófagos e células dendríticas. Isso ocorre por meio da produção de metabólitos, como os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), e do contato dessas bactérias com o GALT (DURACK, LYNCH, 2018).

Além disso, os efeitos imunológicos controlados pela microbiota intestinal também podem desempenhar um papel na regulação da própria microbiota, como as células plasmáticas IgA+ que são induzidas por bactérias comensais e contribuem para controlar a abundância e composição da microbiota (WEI et al., 2011).

Portanto, uma vez rompida a integridade e função da barreira intestinal, há um aumento da permeabilidade intestinal a microrganismos residentes e a seus metabólitos (produtos da fermentação de carboidratos, fatores de virulência) e ativação da resposta inflamatória (KHO; LAL, 2018). Por esse motivo, a manutenção

da homeostase intestinal depende da resposta do sistema imunológico da mucosa a microrganismos patogênicos e a tolerância a microrganismos comensais. Para isso, o sistema imunológico intestinal desenvolveu alguns mecanismos que podem ser divididos em três níveis (HOOPER; MACPHERSON, 2010). O primeiro nível é por meio de mediadores imunológicos que limitam o contato direto entre as bactérias intestinais e as células epiteliais, reduzindo a probabilidade de invasão tecidual; o segundo nível é o reconhecimento e a resposta imunológica contra bactérias que conseguem penetrar nas células intestinais; e o terceiro é a resposta imune da mucosa intestinal, não atingindo o sistema imunológico sistêmico quando em contato com bactérias residentes.

O primeiro nível, que compreende a minimização do contato entre microrganismos comensais e as células epiteliais, ocorre por meio de uma barreira física que envolve a camada de muco, PAM's e IgA. A produção de muco pelas células caliciformes limita o contato de bactérias com as células epiteliais, em que a camada interna é mais resistente à penetração bacteriana e a camada externa tem um número maior de bactérias. No entanto, alguns patógenos desenvolvem habilidades adaptativas para penetrar a camada de muco (HOOPER; MACPHERSON; 2010).

Nestes casos, os PAM's também são utilizados. Estes são expressos pelas células epiteliais e eliminam diretamente bactérias através do ataque enzimático da parede celular bacteriana ou rompendo a membrana interna bacteriana. Alguns subconjuntos desses PAM's não necessitam de ativação bacteriana para serem expressos, outro subconjunto é expresso pela ativação de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) que conseguem penetrar a camada de muco. Além disso, esses PAMPs ficam difundidos na camada de muco fortalecendo a proteção na superfície epitelial sem atingir as bactérias residentes do lúmen intestinal (MEYER-HOFFERT et al., 2008).

No entanto, vários patógenos desenvolveram também mecanismos específicos de resistência contra PAM's que facilitam a invasão desses microrganismos na barreira celular epitelial. Por exemplo, *Listeria monocytogenes* desacetila seu peptidoglicano evitando o ataque enzimático por lisozima, uma enzima degradadora da parede celular secretada pelas células epiteliais intestinais (BONECA et al., 2007). Já a espécie *S. Typhimurium* evita a ação de alguns PAM's,

modificando a porção lipídica A do lipopolissacarídeo presente na membrana externa (HOOPER; MACPHERSON; 2010).

Nestes casos, são secretadas IgA na tentativa de limitar a penetração de bactérias residentes nas células epiteliais. Essa imunoglobulina é produzida com o auxílio das células dendríticas que apresentam bactérias intestinais às células B e estas se diferenciam em células plasmáticas produtoras de IgA específica para bactérias intestinais nos linfonodos mesentéricos. Essa IgA transloca para a lâmina própria e se liga às bactérias intestinais na barreira epitelial, impedindo a penetração bacteriana nos tecidos hospedeiros (HOOPER; MACPHERSON; 2010). Os mecanismos exatos pelos quais a IgA desempenha essas funções ainda não são totalmente esclarecidos, mas pode envolver a captura de bactérias na camada de muco ou promover a fagocitose de microrganismos que penetram na barreira celular epitelial (MACPHERSON; UHR, 2004).

Embora existam essas barreiras, em condições de perda da homeostase, bactérias comensais e patogênicas podem entrar em contato com as células intestinais e estimular o segundo nível de mecanismo de defesa, que é a resposta imunológica, envolvendo captação e fagocitose bacteriana por células imunes inatas e respostas mediadas por células T (HOOPER; MACPHERSON, 2010).

A fagocitose de microrganismos que rompem a barreira epitelial é feita por macrófagos localizados na lâmina própria. Bactérias comensais penetrantes são rapidamente fagocitadas por macrófagos, mantendo o controle da resposta imune, enquanto que bactérias patogênicas usam de estratégias para a evasão ou supressão da morte fagocítica. A *Salmonella spp.* e a *Shigella spp.*, por exemplo, desregulam os mecanismos microbicidas dos macrófagos, permitindo que os patógenos sobrevivam e se repliquem, danificando os tecidos do hospedeiro (HOOPER; MACPHERSON, 2010).

Apesar de manterem funções fagocíticas e bactericidas eficientes, esses macrófagos intestinais não mediam fortes respostas pró-inflamatórias após o reconhecimento bacteriano e ajudam a restaurar a integridade da barreira após lesão causada pela resposta inflamatória, impedindo que outras bactérias penetrem na área danificada. Provavelmente, isso reflete uma adaptação evolutiva dessas células devido à alta carga bacteriana no intestino, impedindo que respostas pró-

inflamatórias exacerbadas sejam ativadas em condições de homeostase (SMYTHIES et al., 2005; PULL et al., 2005).

Ainda no segundo nível, bactérias comensais e patogênicas podem estimular as células TCD4 quando rompem as barreiras epiteliais. O reconhecimento dessas bactérias é feito principalmente pelo sistema imune inato, em que as células epiteliais e as Células Dendríticas são capazes de reconhecer esses microrganismos do lúmen intestinal por meio de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) - *Toll-like* (TLRs), Domínios de Oligomerização de Ligação aos Nucleotídeos (NLRs) e Moléculas de Histocompatibilidade I e II (MHC I e MHC II). Esses receptores são expressos nas superfícies celulares (TLR-2, 4, 5), nos lisossomos (TLR-3, 7, 8, 9 ou 13), no citoplasma (NLR's), em células nucleadas (MHC I) e em células dendríticas, linfócitos B e macrófagos (MHC II). Essas células reconhecem os PAMPs e comunicam às células T, que desencadeiam uma resposta imune por meio do aumento da expressão de citocinas (SHUKLA et al., 2018).

Isso ocorre por meio da indução e diferenciação de células Th17 as quais são necessárias para eliminação de bactérias que penetram a camada epitelial (HOOPER; MACPHERSON, 2010). Além disso, Células T CD4 da mucosa também potencializam a função das células fagocíticas, estimulando a produção de interferon- γ (IFN γ) pelas células Th1 e pela produção de IL-17 pelas células Th17 que promovem ativação de neutrófilos. Embora essas bactérias possam estimular essas células T efectoras quando rompem as barreiras epiteliais, elas também são capazes de regular os efeitos prejudiciais da inflamação. O contato com as bactérias comensais estimulam o desenvolvimento de células Treg e a expressão de citocinas anti-inflamatórias de forma a permitir a manutenção da integridade da célula epitelial (**Figura 2**) (HOOPER; MACPHERSON, 2010).

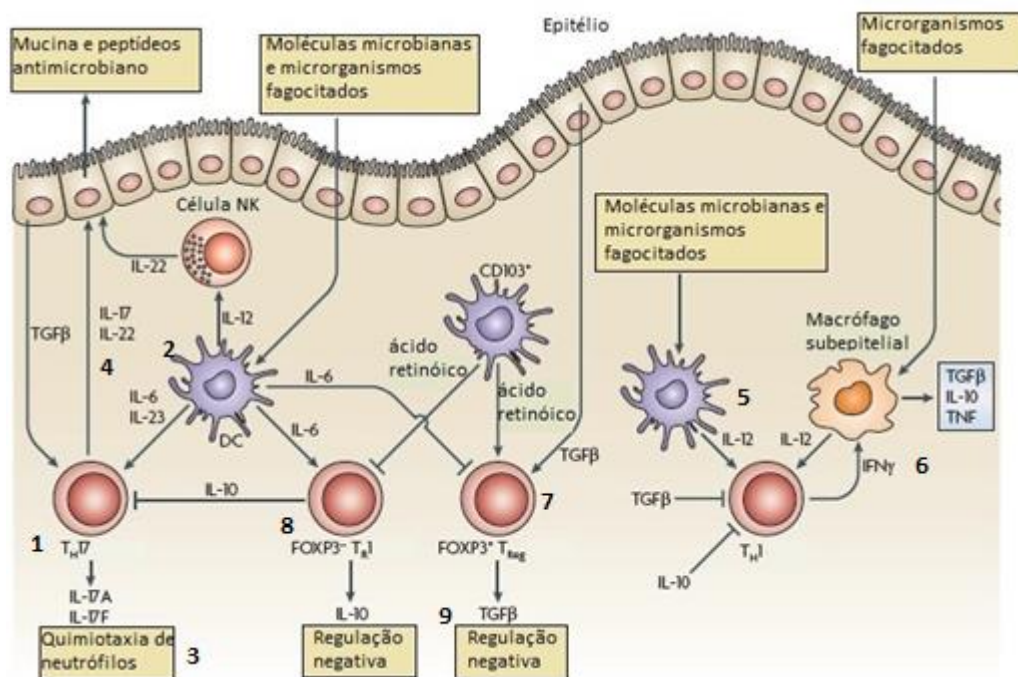


Figura 2 – Regulação da atividade das células T CD4

Fonte: Adaptado de Hooper; Macpherson (2010)

A transformação das células T helper 17 (TH17) é induzida pelo fator de crescimento β (TGF β) e pela interleucina-6 (IL-6) (1) e amadurecem por meio da liberação de IL-23 após a ativação das células dendríticas intestinais (DCs) por microorganismos fagocitados ou moléculas microbianas que cruzaram a barreira epitelial (2). As citocinas secretadas pelas células TH17 (IL-17A e IL-17F), têm efeitos pró-inflamatórios e mediam a quimiotaxia de neutrófilos (3). As células TH17 também expressam IL-22, que contribui para a homeostase epitelial e estimula a secreção de moléculas antimicrobianas (4). As bactérias comensais e suas moléculas associadas também estimulam as DCs a secretar IL-12 (5), que ativa a secreção de interferon- γ (IFN γ) pelas células TH1, que, por sua vez, ativam a atividade fagocítica dos macrófagos subepiteliais (6). A inflamação aguda é normalmente controlada através da indução de duas classes de células T reguladoras (Treg), que podem ser diferenciadas com base na sua expressão do fator de transcrição P3 (FOXP3). As células Treg FOXP3+ são induzidas pelo ácido retinóico produzido pelas células CD103 e DCs, na presença de TGF β (7) e as células FOXP3- TR1, que são induzidas pela IL-6, mas inibidas pelo ácido retinóico (8). As células Treg secretam IL-10 e / ou TGF β , que têm efeitos reguladores negativos nas células T efetoras (9).

Por um lado, microrganismos comensais, como *Bacteroides fragilis*, *Bifidobacterium infantis* e *Firmicutes*, são capazes de induzir o desenvolvimento de células Treg produtoras de IL-10, que são cruciais na supressão da inflamação e na indução da tolerância imunológica do hospedeiro à microrganismos intestinais (KHO; LAL, 2018). Por outro lado, bactérias filamentosas segmentadas demonstraram induzir células TH17 intestinais e a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-17 e IL-22, estimulando a defesa antimicrobiana e a imunidade da mucosa contra o patógeno intestinal *Citrobacter rodentium* em camundongos (INANOV et al., 2009).

Lopetuso et al. (2013) demonstraram a ação de espécies comensais de bactérias do gênero *Clostridium* na modulação da resposta inflamatória. Essas

bactérias, quando em contato com as células epiteliais do cólon, promoveram o desenvolvimento e diferenciação de linfócitos Treg, que são importantes no controle da inflamação. Além disso, produziram Butirato, que regulou a ativação do NF-kB levando a maior expressão de IL-10 e, conseqüentemente, propiciou um efeito anti-inflamatório.

Esses dados sugerem que constituintes potencialmente patogênicos da microbiota intestinal podem ser tolerados no lúmen intestinal desde que não atinjam um limiar de penetração na mucosa intestinal e que as células Treg e TH17 estejam em equilíbrio uma vez que possuem um papel importante na manutenção da homeostase (HOOPER; MACPHERSON, 2010).

Por fim, o terceiro nível compreende o controle da resposta imune da mucosa, de forma que essa não atinja níveis sistêmicos. Bactérias que são capturadas pelas células dendríticas ficam contidas no tecido da mucosa e podem ser transportadas para linfonodos mesentéricos estimulando o sistema imune na mucosa, como por exemplo a produção de IgA, sem atingir o sistema imune sistêmico. Acredita-se que as estruturas linfóides da mucosa são adaptadas pelo contato com moléculas bacterianas comensais que penetram nos tecidos hospedeiros, embora a penetração de bactérias comensais vivas e a indução de respostas imunes adaptativas estejam ausentes ou limitadas em hospedeiros imunocompetentes (HOOPER; MACPHERSON, 2010).

Além desses três possíveis mecanismos para regulação da resposta imune das células intestinais contra bactérias comensais, a ausência de genes de virulência ou patogenicidade de algumas bactérias também contribui para limitação da resposta imune. Desta forma, essas bactérias não desenvolvem mecanismos de invasão e de sobrevivência capazes de ativar as respostas imunes inata e adaptativa no intestino, garantindo uma relação de simbiose (BHAVSAR; GUTTMAN; FINLAY, 2007).

Portanto, o equilíbrio na composição da microbiota intestinal é importante para a modulação da resposta inflamatória e a para manutenção da integridade da barreira intestinal e da homeostase intestinal. No entanto, em DIIC's como a constipação intestinal, é comum observar um desequilíbrio nessa composição o qual é denominado Disbiose intestinal (LAWLEY; WALKER, 2012; SARTOR; MAZMANIAN, 2012).

1.3 DISBIOSE, CONSTIPAÇÃO INTESTINAL E RESPOSTA INFLAMATÓRIA

O termo disbiose refere-se a situações em que há um desequilíbrio na composição, biodiversidade e função microbiana no intestino, implicando na patogênese de diversas doenças (CAO et al., 2017; MARCHESI et al., 2016). Esse desequilíbrio é comumente caracterizado pela redução das espécies bacterianas obrigatoriamente anaeróbias, como o filo *Firmicutes*, e aumento de anaeróbios facultativos, como os da família *Enterobacteriaceae*, que contém vários patógenos como *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.* e *E. coli* (LUPP et al., 2007; WALKER; LAWLEY, 2012).

Entretanto, estudos recentes têm demonstrado que a avaliação da composição da microbiota intestinal apenas pela proporção de bactérias, como a razão *Firmicutes/Bacteroidetes*, é limitada, uma vez que a função exercida por essas bactérias pode se sobrepor ao número (CANI et al., 2018). Além disso, existem variações interindividuais que podem modificar as espécies bacterianas envolvidas na disbiose. Essa condição tem sido associada à patogênese de alguns DIICs, incluindo a CCF, especialmente na CTL, em que alterações do tempo de permanência das fezes no intestino podem influenciar a composição da microbiota intestinal e levar à disbiose (HUANG et al., 2018; OHKUSA et al., 2019).

Zoppi et al (1998) realizaram uma análise de cultura em amostras fecais coletadas de crianças com e sem CCF e observaram que as crianças com CCF tinham um nível significativamente mais alto de espécies de *Clostridium* (*C. sporogenes*, *C. paraputrificum*, *C. fallax* e *C. innocuum*) e de *Bifidobacterium*. Em contrapartida, utilizando esse mesmo método de análise, Khalif et al. (2005) observaram em indivíduos adultos com CCF uma redução do nível de espécies de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides* e *Clostridium* e um aumento de *Enterobacteriaceae*, como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, e fungos.

Zhu et al. (2014), por sua vez, utilizando o método de sequenciamento do gene 16S rRNA, demonstraram em amostras fecais de crianças com CCF um nível significativamente mais baixo de *Bacteroidetes*, em particular *Prevotella*, e um nível aumentado de várias espécies de *Firmicutes*, incluindo *Lactobacillus*. Os autores observaram ainda que espécies de *Bifidobacteria* não estavam reduzidas nessa amostra. Enquanto que o estudo de Kim et al. (2015), por meio do método de análise

de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) de amostras fecais de adultos com CCF, observaram um número mais baixo de *Bifidobacterium* e *Bacteroides*.

O estudo de Parthasarathy et al. (2016) avaliou a composição da microbiota por meio de biópsia da mucosa intestinal e sequenciamento do gene 16S rRNA da microbiota intestinal em adultos com e sem CCF. Eles demonstraram que não houve diferença na quantidade de espécies bacterianas a nível de gênero entre indivíduos com CCF e o grupo controle, embora os indivíduos com CCF apresentaram níveis aumentados do filo *Bacteroidete* na mucosa. No entanto, este estudo também incluiu indivíduos com Síndrome do Intestino Irritável com presença de constipação intestinal, não representando exclusivamente pacientes com CCF.

Portanto, não existe consenso sobre quais espécies bacterianas estão envolvidas na disbiose da CCF, visto que a microbiota intestinal pode ser alterada conforme fatores externos e idade e os estudos foram realizados em populações de diferentes idades e as amostras analisadas por diferentes métodos (OHKUSA et al., 2019). Também não é bem estabelecida a relação causal entre disbiose e constipação: se o desenvolvimento deste distúrbio é causado e/ou ampliado pela disbiose ou se o contrário também ocorre (ZHU et al., 2014). Sabe-se, porém, que a disbiose influencia a resposta inflamatória e a motilidade intestinal, contribuindo para a progressão da constipação intestinal (De MEIJ et al., 2016).

Em modelos animais, foi demonstrado que a microbiota poderia modular a expressão de genes envolvidos na resposta motora do intestino e modular a sinalização mediada pela 5-HT bem como a expressão do seu receptor (SERT), influenciando a motilidade gastrointestinal (CAO et al., 2017; YANO et al., 2015). Estirpes bacterianas como *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus reuterii* e *Lactobacillus acidophilus* foram observadas como promotoras da motilidade intestinal, enquanto que espécies de *Escherichia* demonstraram inibir a motilidade (HUSEBYE et al., 2000; MA et al., 2009).

Um estudo *in vitro* observou que a motilidade intestinal foi influenciada também pelo pH e pelo efeito osmótico decorrentes de produtos da fermentação bacteriana, além da influência provocada pelo aumento da produção de gases intraluminais (dióxido de carbono, hidrogênio e metano) que causam contrações reflexivas do músculo liso (BÄR et al., 2009).

Além disso, como as bactérias comensais são essenciais para manter um estado estável imunológico saudável, qualquer desequilíbrio na composição da microbiota intestinal pode ter efeitos negativos e perpetuar um ciclo de inflamação crônica. A disbiose tem sido associada ao aumento da permeabilidade intestinal, à ativação da resposta imune da mucosa e à inflamação crônica (OHKUSA et al., 2019). O aumento de bactérias patogênicas favorece um ambiente pró-inflamatório, caracterizado por uma inflamação de baixo grau na mucosa e um aumento sistêmico sutil, porém persistente, de marcadores pró-inflamatórios (CAO et al., 2017; TOMASELLO et al., 2016; WALKER; LAWLEY, 2012).

A interação de bactérias patogênicas com os TLRs resulta na ativação das respostas imunes inata e adaptativa, com o aumento da expressão de citocinas inflamatórias pelas células T e Dendríticas, e o comprometimento das *Tight-junctions*, o que aumenta a permeabilidade intestinal (TOMASELLO et al., 2016). Estudos em indivíduos com Doença Inflamatória Intestinal têm investigado a relação da microbiota com a ativação dos receptores TLRs e a expressão de citocinas. Eles demonstraram que a disbiose promoveu a inflamação nesse grupo de pacientes, o que pode influenciar a patogênese dessa doença (BASHASHATI et al., 2014). Na CCF esses desfechos ainda não foram investigados.

Bactérias patogênicas, incluindo as da família *Enterobacteriaceae*, parecem ser mais capazes de sobreviver neste ambiente inflamado do que as comensais anaeróbias (WALKER; LAWLEY, 2012). Por exemplo, a espécie *Salmonella entérica* diminui a sua suscetibilidade aos PAM's e aumentam a sua capacidade de incorporar moléculas geradas pelo processo inflamatório para o seu crescimento, prolongando a disbiose (WINTER et al., 2010; THIENNIMITR et al., 2011).

Vários fatores contribuem para o desenvolvimento e permanência dessa disbiose como fatores genéticos, o uso de antibióticos, tratamento com radioterapia e quimioterapia, a idade, o estresse físico e psicológico e o padrão alimentar (MARCHESI et al., 2016).

Estudos têm demonstrado que o padrão alimentar de diferentes populações pode influenciar na composição e diversidade da microbiota intestinal (De FILIPPIS et al., 2014; De FILIPPIS et al., 2015; ALBENBERG; WU, 2014). Além disso, os nutrientes provenientes da dieta são o substrato para que bactérias comensais se

desenvolvam e produzam metabólitos que influenciam na motilidade intestinal e na resposta inflamatória (PLÉ et al., 2015).

1.4. PADRÃO DIETÉTICO, MICROBIOTA INTESTINAL, INFLAMAÇÃO E CONSTIPAÇÃO INTESTINAL

Após o parto, a alimentação é o primeiro fator externo que influencia a composição da microbiota intestinal, através do leite materno e de alimentos da introdução alimentar. Durante a infância e na vida adulta, a dieta passa a ser o fator mais importante na composição e diversidade da microbiota intestinal (JANDHYALA et al., 2015).

David et al. (2014) observaram que o padrão alimentar pode favorecer modificações rápidas na composição da microbiota. Uma dieta vegetariana ou uma dieta baseada em fontes animais, foi capaz de causar uma alteração aguda na composição microbiana em apenas 24 horas de ingestão. Esse efeito foi revertido depois de 48 horas de descontinuação dessas dietas.

Adicionalmente, Di Filippo et al. (2010) verificaram que composição da microbiota intestinal diferiu significativamente entre as crianças que vivem em uma aldeia rural na África, consumindo uma dieta vegetariana, e crianças que vivem na zona urbana da Itália, consumindo uma dieta com padrão ocidental. A microbiota intestinal das crianças africanas apresentou maior abundância de bactérias do gênero *Prevotella* e de *Bacteroidetes* e menor abundância do filo *Firmicutes*, além de apresentarem concentrações mais elevadas de AGCC quando comparadas à microbiota intestinal das crianças europeias. Isso pode ser explicado pela distinção do padrão alimentar entre as duas populações, uma vez que as crianças africanas consumiam uma dieta rica em fibras e proteína vegetal, enquanto que as europeias consumiam alimentos com alto teor de proteína animal, açúcar e gordura e pobres em fibras.

Além disso, foi demonstrado que o padrão de dieta mediterrânea, caracterizado pelo consumo de hortaliças, leguminosas e grãos, tem sido associado também a menores concentrações de marcadores pró-inflamatórios como PCR, IL-6 e TNF- α (SIMPSON; CAMPBELL, 2012). Em contrapartida, o padrão de dieta ocidental, caracterizado pela alta ingestão de gorduras, carne processada e

vermelha, associou-se à menor diversidade microbiana e aumento da expressão de marcadores pró-inflamatórios (SINGH et al., 2017). Portanto, o padrão dietético, caracterizado pela ingestão variada de nutrientes e alimentos, pode modificar a colonização bacteriana no intestino (MORAES et al., 2014).

Os carboidratos são os nutrientes mais estudados com relação à sua capacidade de modificar a microbiota intestinal. Eles são divididos em dois tipos: carboidratos digeríveis, que são degradados por enzimas no intestino delgado e transformados em glicose, tais como amidos e açúcares, como glicose, frutose, sacarose e lactose; e carboidratos não digeríveis (fibras), que não são digeridos por enzimas no intestino delgado e sim fermentados pela microbiota intestinal residente no intestino grosso (SINGH et al., 2017). Essas fibras são substrato para a microbiota intestinal que, no processo de fermentação, produz metabólitos (como os AGCC) que são fonte de energia para as células intestinais do hospedeiro e atuam na modulação da resposta inflamatória (SONNENBURG et al., 2014).

A microbiota intestinal também participa do metabolismo de proteínas, o qual envolve proteinases e peptidases microbianas em conjunto com proteinases humanas. Transportadores de aminoácidos na parede celular bacteriana captam aminoácidos do lúmen intestinal e os convertem em pequenas moléculas de sinalização. Um exemplo é a conversão de L-histidina em Histamina, pela enzima bacteriana Histamina Descarboxilase, e a conversão de Glutamato em Ácido γ -Amino Butírico (GABA) pela Glutamato Descarboxilases (De BIASE; PENNACCHIETTI, 2012).

Os efeitos da ingestão de proteína na microbiota intestinal foram descritos pela primeira vez em 1977 em um estudo que utilizou método de cultura para análise da microbiota. Neste estudo observou-se uma quantidade menor de *Bifidobacterium adolescentis* e um aumento de *Bacteroides* e *Clostridia* em indivíduos que consumiram uma dieta rica em carne bovina quando comparados a indivíduos que não consumiam carne (HENTGES et al., 1977). Estudos recentes, que utilizaram o método de sequenciamento do gene 16S, tem demonstrado que a fonte proteica também pode influenciar a composição da microbiota (COTILLARD et al., 2013; DOMINIKA et al., 2011).

No metabolismo lipídico, por sua vez, a microbiota intestinal pode suprimir o *Fasting Induced Adipose Factor* (FIAP) produzido pelo intestino, fígado e tecido

adiposo. O FIAF é um inibidor da lipase lipoproteica (LPL), que quando suprimido pela ação da microbiota intestinal, provoca um aumento da atividade da LPL que determina a maior absorção de ácidos graxos e acúmulo de triglicerídeos nos adipócitos (BÄCKHED et al., 2004). Além disso, há evidências que a presença da microbiota intestinal suprime a oxidação de ácidos graxos via inibição da AMP-Q, proteína quinase que regula o metabolismo energético celular, de ácidos graxos e de glicose, favorecendo então a adiposidade corporal e a resistência à insulina (KOLA, 2008).

Diante disso, alguns achados que relacionam alimentos ou nutrientes específicos com a composição da microbiota intestinal, em diferentes populações, são expostos no **Quadro 2**.

Quadro 2. Influência da ingestão de nutrientes na Microbiota Intestinal

Autor	Amostra; número	Método de Análise da Microbiota	Dieta	Efeitos na microbiota intestinal
Cani et al., 2007	Camundongos; 32	16S rRNA	Hiperlipídica com oligofrutose	↑ <i>Bifidobacterium spp</i>
David et al., 2013	Adultos; 10	16S rDNA	Rica em proteína animal e baixo teor de fibra	↑ <i>Alistipes</i> , <i>Bilophila</i> e <i>Bacteroides</i> ↓ <i>Firmicutes</i> (<i>Roseburia</i> , <i>Eubacterium rectale</i> e <i>Ruminococcus bromii</i>), <i>Prevotella</i>
De Filippo et al., 2010	Crianças Italianas urbanas; 15 Crianças Africanas rurais, 15	16S rDNA	Hiperlipídica e pobre em fibra Dieta vegetariana	↑ <i>Enterobacteriaceae</i> (<i>Shigella</i> e <i>Escherichia coli</i>) ↓ <i>Bacteroidetes</i> , ↑ <i>Firmicutes</i> ↓ <i>Enterobacteriaceae</i> (<i>Shigella</i> e <i>Escherichia coli</i>) ↑ <i>Bacteroidetes</i> ↓ <i>Firmicutes</i>
Fava et al., 2013	Indivíduos com risco de SM; 88	FISH	Rica em gordura saturada Rica em MUFA e alto IG Rica em MUFA e baixo IG	↑ <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> Não afetaram o número de populações bacterianas individuais, mas reduziram o total de bactérias

			Baixo teor gordura, rica em CHO e alto IG	↑ <i>Bifidobacterium</i> e <i>Bacteroides</i>
			Baixo teor gordura , rica em CHO e baixo IG	↑ <i>Bifidobacterium</i> e <i>Faecalibacterium</i> <i>prausnitzii</i>
Goodman et al., 2011	Camundongos <i>germ-free</i> transplantedos com microbiota humana; 5	16S rRNA	Hiperlipídica e Hiperglicídica	↑ <i>Firmicutes</i> (<i>Erysipilotrichi</i>) ↓ <i>Bacteroidetes</i> (classe <i>Bacteroidia</i>)
Halmos et al., 2014	Indivíduos com SII; 27 Indivíduos saudáveis; 6	PCR	Rica em FODMAP Podre em FODMAP	↑ <i>Clostridium cluster XIVa</i> e <i>Akkermansia muciniphila</i> ↓ <i>Ruminococcus torques</i> ↓ Abundância total de bactérias
Linetzky Waitzberg et al., 2012	Mulheres com Constipação; 60	PCR	Suplemento de fibra Maltodextrina (placebo)	↓ <i>Clostridium sp</i> ↑ <i>Clostridium sp</i>
Liu et al., 2018	Camundongos; 12	16S rRNA	Dieta com Isoflavonas Dieta sem Isoflavonas	↓ <i>Bacteroidetes</i> , <i>Saccharibacteria</i> , <i>Cyanobacteria</i> e <i>Tenericutes</i> ↑ <i>Firmicutes</i> ↑ <i>Blautia</i> , <i>Roseburia</i> , <i>Desulfovibrio</i> , <i>Phascolarctobacterium</i> , <i>Butyricimonas</i> , <i>Collinsella</i> , <i>Paraprevotella</i> e <i>Gemella</i>
Martínez et al., 2013	Indivíduos saudáveis; 28	16S rRNA	Consumo de grão integrais (cevada e arroz – 60g/dia)	↑ <i>Firmicutes</i> / <i>Bacteroidetes</i> ↑ <i>Blautia</i> <i>Roseburia</i> , <i>Bifidobacterium</i> e <i>Dialister</i> ↑ <i>Eubacterium rectale</i> , <i>Roseburia faecis</i> e <i>Roseburia intestinalis</i>

Moraes et al., 2016	Criança com constipação; 39 Crianças sem Constipação; 40	PCR	Sem diferenças na ingestão de frutas, vegetais e junk foods Crianças com constipação: maior consumo de laticínios	↓ <i>Lactobacillus</i> em crianças com constipação
Wan et al., 2019	Adultos saudáveis; 217	16S rRNA	Baixo teor de gordura (20%) Alto teor de gordura (40%)	↑ α-diversidade (Índice Shannon), ↑ <i>Blautia</i> e <i>Faecalibacterium</i> ↑ <i>Alistipes</i> e <i>Bacteroides</i> ↓ <i>Faecalibacterium</i>
Wu et al., 2012	Humanos; 98	16S rRNA	Hiperlipídica e pobre em fibra Hiperglídica e rica em fibra	Rico em <i>Bacteroides</i> (enterótipo 1) Rico em <i>Provetella</i> (enterótipo 2)

CHO: carboidrato; FISH: Fluorescent In Situ Hybridization; FODMAP: dieta baixa em oligossacarídeos, dissacarídeos, monossacarídeos e polióis fermentáveis IG: índice glicêmico; MUFA: Gordura Monoinsaturada; PCR: reação em cadeia da polimerase; SII: Síndrome do Intestino Irritável; SM: Síndrome Metabólica;

Apesar de ser um assunto bastante estudado, ainda há lacunas sobre a influência da dieta na composição da microbiota intestinal, especialmente em indivíduos com CCF. Mais estudos precisam ser realizados, uma vez que os estudos existentes utilizaram diferentes métodos e populações para avaliar a microbiota intestinal e alguns estudos apresentam fatores de confusão não controlados como idade e composição corporal. Neste contexto, considerando a influência da dieta (nutrientes e alimentos) sobre a inflamação e os desfechos em saúde, foi criado o Índice Inflamatório da Dieta, que permite relacionar os efeitos pró ou anti-inflamatórios da dieta de um indivíduo sobre diferentes desfechos e populações (CAVICCHIA, 2009).

1.5 POTENCIAL INFLAMATÓRIO DA DIETA

1.5.1 Desenvolvimento do Índice Inflamatório da Dieta

O Índice Inflamatório da Dieta (IID) foi desenvolvido com o objetivo de quantificar o potencial inflamatório da dieta por meio de um escore, que tem sido relacionado a diversos desfechos de saúde como concentrações sanguíneas de citocinas inflamatórias e doenças crônicas (HEBERT et al., 2019).

O IID foi proposto pela primeira vez por Cavicchia et al. (2009), sendo atualizado e validado por Shivappa et al (2014). Esse índice se baseou em uma revisão de estudos que relacionavam alimentos e nutrientes com a inflamação. Shivappa et al. (2014) realizaram uma revisão de literatura de 1950 a 2010, com o objetivo de avaliar o efeito de alguns parâmetros alimentares sobre os marcadores inflamatórios IL-1B, IL-4, LI-6,IL-10, TNF-a e PCR e estabelecer uma pontuação em escore para cada parâmetro alimentar.

Foram analisados nesta revisão 1943 artigos, em que cada um dos artigos recebeu uma pontuação de acordo com o efeito do parâmetro alimentar sobre a inflamação e o desenho do estudo (Quadro 2). Essas pontuações foram arbitrariamente escolhidas e a partir disso foi calculado um “escore do efeito inflamatório total de um parâmetro alimentar” (SHIVAPPA et al., 2014).

Foram pontuados 45 parâmetros alimentares: ácido fólico, ácidos-graxos mono e poliinsaturados, gorduras saturada, trans e total, álcool, B-caroteno, cafeína, carboidrato, chás verde e preto, eugenol, colesterol, energia, fibras, ferro, flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavononas, flavanóis, antocianidinas, magnésio, ômega-3 e ômega-6, proteína, riboflavina, selênio, tiamina, vitaminas A, B3, B6, B12, CD, E, zinco, orégano, alecrim, cebola, alho, gengibre, açafrão, cúrcuma e pimenta.

Quadro 3. Pontuação dos artigos de acordo com o tipo e desenho dos estudos

Tipo de Estudo	Desenho do estudo	Pontuação
Humanos	Ensaio clínico	10
	Coorte	8
	Caso-Controle	7
	Transversal	6
Animais	Experimental	5
Células	Experimental	3

Fonte: Adaptado de Shivappa et al. (2014)

Em seguida, a partir da pontuação estabelecida para os estudos, calculou-se uma fração pró e uma anti-inflamatória para cada um dos parâmetros alimentares, da seguinte forma:

- Fração pró-inflamatória de um parâmetro alimentar:

$$\frac{\text{Número ponderado de artigos com efeito pró-inflamatório do parâmetro}}{\text{Valor total do número ponderado de artigos com efeito pró-inflamatório, anti-inflamatório e sem efeito para esse mesmo parâmetro}}$$

- Fração anti-inflamatória de um parâmetro alimentar:

$$\frac{\text{Número ponderado de artigos com efeito anti-inflamatório do parâmetro}}{\text{Valor total do número ponderado de artigos com efeito pró-inflamatório, anti-inflamatório e sem efeito para esse mesmo parâmetro}}$$

Por fim, para obter o escore do efeito inflamatório total de um dado parâmetro alimentar, subtraiu-se a fração pró-inflamatória da anti-inflamatória.

Para padronização da ingestão alimentar, a fim de evitar valores arbitrários do consumo e abranger diversas populações, criou-se um banco de dados conjunto

contendo o consumo alimentar representativo de populações de 11 países (Estados Unidos, Dinamarca, Austrália, Barein, Japão, Índia, Nova Zelândia, Taiwan, México, Coreia do Sul e Reino Unido). Esse banco permitiu obter as médias e os desvios-padrão de cada um dos 45 parâmetros alimentares (SHIVAPPA et al., 2014).

Os escores, médias e desvio-padrão de cada parâmetro alimentar foram calculados pelos idealizadores do IID e estão disponíveis no estudo de Shivappa et al. (2014). Entretanto, Hebert et al. (2019) observaram a necessidade de controlar o efeito da ingestão energética sobre a ingestão de nutrientes e propuseram esse ajuste sobre a média de ingestão estabelecida com base no consumo alimentar de 11 países (valores ainda não foram publicados) e sobre a média de ingestão de cada indivíduo pelo consumo energético (E-DII).

Ao contrário dos outros índices, o IID foi desenvolvido para abranger padrões dietéticos de várias populações, usando diferentes tipos de estudos e diferentes métodos de avaliação dietética que estimam o consumo médio. Além disso, é o único índice que busca relacionar a alimentação com desfechos relacionados à inflamação (HEBERT et al., 2019).

Em contrapartida, assim como todo instrumento de avaliação dietética, o IID apresenta limitações. O fato de ser uma ferramenta que abrange todos os tipos de inquéritos de avaliação do consumo alimentar pode tornar os resultados mais vulneráveis a erros sistemáticos ou aleatórios a depender da escolha do instrumento de avaliação do consumo alimentar (INSTITUTE OF MEDICINE, 2000). A escolha arbitrária de algumas pontuações para os artigos utilizados na construção dos escores do IID também pode ser uma limitação para avaliação do grau de evidência e qualidade dos estudos pontuados, uma vez que foram considerados estudos em humanos, experimentos em animais e células.

1.5.2 Cálculo do IID de um parâmetro alimentar e do IID total

Primeiramente, calcula-se o escore-Z do parâmetro alimentar de interesse:

$$\frac{\text{Valor de ingestão alimentar de um indivíduo para um dado parâmetro alimentar (ajustado pela energia)} - \text{Média de referência deste parâmetro (ajustado pela energia)}}{\text{Desvio-padrão de referência do parâmetro alimentar}}$$

Desvio-padrão de referência do parâmetro alimentar

O resultado deste cálculo é um valor em Z-escore, que deve ser convertido para o percentil correspondente. Posteriormente, esse valor em percentil é multiplicado por 2 e subtraído de 1, para obtenção do percentil centralizado. Após isto, para obter o IID especificamente do parâmetro alimentar de interesse, multiplica-se o valor do percentil centralizado pelo escore do efeito inflamatório total do parâmetro alimentar, que está disponível no Anexo A. Por fim, o IID total do indivíduo é a soma do IID de todos os parâmetros. A classificação do resultado final do IID varia entre o máximo pró-inflamatório (7.98) e o mínimo anti-inflamatório (- 8.87).

1.5.3 IID, inflamação e microbiota intestinal

O IID foi avaliado em 2524 indivíduos belgas, por meio de questionário de frequência alimentar, em que os resultados mostraram associações positivas e significativas entre o IID e os marcadores inflamatórios IL-6 e homocisteína. Contudo, não foram observadas associações significativas com PCR e fibrinogênio (SHIVAPPA et al., 2015). Esses resultados reforçaram o fato de que o padrão alimentar, e não apenas seus componentes de maneira isolada, desempenha um papel importante na modificação da inflamação. Em contrapartida, Shivappa et al. (2013) avaliaram o IID em uma população americana, por meio de recordatórios e diários alimentares de 24 horas e observaram que maiores escores de IID foram associados a valores de PCR maior que 3 mg/L.

O IID também foi associado ao risco de Doenças Crônicas Não Transmissíveis em alguns estudos. Abdurahman et al. (2018) observaram uma associação positiva entre os maiores escores de IID (pró-inflamatório) e maiores níveis de glicemia, triglicerídios elevados, colesterol de lipoproteína de alta densidade (c-HDL) baixa, pressão arterial elevada e obesidade abdominal, que são critérios utilizados para o diagnóstico de Síndrome Metabólica (SM). Enquanto que Ren et al. (2018) sugeriram associação limitada entre o IID e a SM, uma vez que o IID foi associado apenas às maiores concentrações de PCR nesses participantes e não aos demais parâmetros da SM.

Esses estudos conseguiram demonstrar a influência do IID sobre marcadores inflamatórios e sua repercussão sistêmica. Entretanto a influência do IID sobre a composição da microbiota foi pouco investigada. Shivappa et al. (2018) utilizaram a concentração de enterolignanas urinárias como um metabólito marcador da

diversidade microbiana e observaram que os indivíduos que apresentaram um maior IID, apresentaram menores concentrações de enterolignanas e, portanto, menor diversidade microbiana. No entanto, o estudo ressaltava a necessidade de se avaliar a influência do IID sobre a composição da microbiota por métodos diretos e não apenas por meio de metabólitos.

Essa investigação foi feita no estudo de Zengh et al. (2020) que avaliou a associação do IID com a composição e diversidade da microbiota intestinal e marcadores inflamatórios entre adultos saudáveis. A microbiota intestinal foi analisada por meio do sequenciamento do gene 16S rDNA em amostras de fezes. A diversidade alfa e beta não diferiu significativamente entre os níveis de IID, no entanto observou-se que as espécies *Ruminococcus torques*, *Eubacterium nodatum*, *Acidaminococcus intestini* e *Clostridium leptum* foram mais abundantes no grupo de dieta mais pró-inflamatória, enquanto *Akkermansia muciniphila* teve maior abundância no grupo de dieta mais anti-inflamatória. Além disso, este estudo não encontrou associação entre o IID e os níveis de marcadores inflamatórios (Lepitina, IL-6, TNF- α , MCP-1, PAI-1).

No entanto, até o momento, nenhum estudo avaliou a influência do potencial inflamatório da dieta sobre a composição da microbiota intestinal e marcadores de inflamação em pacientes com CCF. Considerando que a composição da microbiota tem papel regulador na inflamação e na melhora dos sintomas da CCF e que a dieta tem influência sobre todos esses desfechos, faz-se necessário estudar a relação do potencial inflamatório da dieta sobre a inflamação, a microbiota e a constipação. Neste contexto, o IID é um instrumento validado que apresenta boa capacidade para verificar o papel da dieta na inflamação sistêmica e sua influência em variáveis de saúde, como a composição da microbiota e os distúrbios intestinais.

Diante disso, a hipótese desse estudo é que o aumento do potencial inflamatório da dieta está associado à menor diversidade da microbiota intestinal e à maior concentração de marcadores pró-inflamatórios.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se há associação entre o potencial inflamatório da dieta e a composição da microbiota intestinal em indivíduos com constipação intestinal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a composição e a diversidade da microbiota intestinal;
- Avaliar o consumo médio de macro e micronutrientes;
- Determinar o Índice Inflamatório da Dieta;
- Analisar a concentração de marcadores pró e anti-inflamatórios

3. METODOLOGIA

3.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um corte transversal, realizado a partir dos dados do baseline do projeto matriz, denominado “Efeito dos probióticos sobre a saúde intestinal em adultos e idosos saudáveis: influência do tipo de cepa, dose e forma de administração”.

3.2 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás com o nº do parecer 2.281.977 consubstanciado CAAE Nº 69990717.5.0000.5078 em 18 de setembro de 2017. Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), conforme resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (Apêndice A).

3.3 POPULAÇÃO

A amostra foi composta por 68 indivíduos que foram selecionados aleatoriamente e eram de ambos os sexos, com idade entre 19 e 60 anos e diagnóstico de constipação intestinal funcional determinado a partir de um questionário contendo os Critérios de Roma IV (Apêndice B).

Foram excluídos os indivíduos que consumiram, nos últimos 30 dias que antecederem a anamnese: alimentos ou produtos contendo probióticos e/ou prebióticos, fizeram uso de suplementos de vitaminas e minerais, ingestão de alguns tipos de chás (verde, branco ou de hibisco), uso de laxantes, fitoterápicos para melhora do funcionamento intestinal, medicações de atividade antiinflamatória e/ou antibióticos. Também foram excluídos indivíduos com doenças metabólicas, gastrointestinais, disfunções hepáticas, renais, doenças crônicas não-transmissíveis e/ ou gestantes.

3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO E VARIÁVEIS INVESTIGADAS

O recrutamento dos indivíduos foi realizado por meio da divulgação em mídias sociais, universidades e clínicas. Os participantes que demonstraram interesse foram instruídos sobre os detalhes da participação na pesquisa e direcionados a uma triagem para aplicação de um questionário contendo os critérios de inclusão e exclusão (Apêndice C). Os indivíduos que cumpriram esses critérios receberam o TCLE para leitura e assinatura, caso concordasse em participar da pesquisa.

Após a etapa de triagem, os indivíduos que atenderam aos critérios seguiram para a etapa da coleta de dados e foram realizados os seguintes procedimentos:

- **Anamnese:** dados de sexo, idade, Índice de Massa Corporal (IMC), renda, anos de estudo, ingestão e frequência de consumo de bebida alcoólica, ingestão hídrica (Apêndice D).
- **Coleta de sangue:** o sangue foi coletado por uma empresa terceirizada contratada. Os voluntários foram previamente instruídos a realizarem jejum de 12 horas e a não ingerirem bebidas alcoólicas. Foi coletado, aproximadamente, 10 ml de sangue de cada voluntário, em tubo de coleta de sangue a vácuo sem EDTA. As amostras de sangue foram centrifugadas a 700 x g por 10 min a 4°C para obtenção de soro.
- **Consumo alimentar:** os dados do consumo alimentar foram coletados por meio de um Recordatório Alimentar de 24 horas (R24h) e 3 registros/diários alimentares (Apêndice E). O R24h foi aplicado na primeira etapa, pela equipe de pesquisa, como modelo de orientação ao voluntário. Posteriormente, os voluntários receberam três registros alimentares e foram orientados a preenchê-los na mesma semana, sendo dois dias intercalados durante a semana e um dia no final de semana.
- **Coleta de fezes:** as fezes foram coletadas pelos próprios participantes, por meio de swab, segundo as instruções recomendadas pela empresa Neoprospecta® (Anexo B)

- **Dados de atividade física:** foi aplicada a versão curta do Questionário Internacional de Atividade Física (IPAQ) (Anexo C).

3.5 ANÁLISE DO CONSUMO ALIMENTAR E CÁLCULO DO E-IID

Para a conversão de medidas caseiras em gramas dos 4 inquéritos alimentares (1 R24h e 3 registros alimentares) de cada voluntário, foi utilizada a *Tabela para Avaliação de Consumo Alimentar em Medidas Caseiras* (Pinheiro et al., 2004). Para os alimentos e preparações que não estiveram contemplados nesta tabela, foram utilizadas as tabelas de padronização do *Grupo de Pesquisa de Avaliação do Consumo Alimentar da Universidade de São Paulo (GAC-USP)* ou a tabela do *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)*, nesta ordem.

Os dados alimentares em gramas, dos 4 inquéritos alimentares de cada voluntário, foram inseridos no software *Nutrition Data System for Research (NDSR - University of Minnesota – EUA)* para obtenção do teor de macro e micronutrientes e da quantidade (gramas) de alguns alimentos usados para calcular o E-IID.

Não houve diferenças significativas entre R24h e os diários alimentares para a ingestão média de qualquer um dos parâmetros alimentares utilizados no cálculo do E-IID (todos $p > 0,05$). Portanto, a ingestão média dos 4 inquéritos alimentares foi utilizada para o cálculo do IID.

3.5.1 Cálculo do E-IID

No intuito de minimizar os erros de cálculo do E-IID e devido às novas médias e desvio-padrão de referência dos parâmetros alimentares ainda não terem sido publicadas, o cálculo do E-IID foi realizado pelos idealizadores do índice, utilizando o software *Statistical Analysis System (SAS)*. Para o cálculo do IID, foi obtida a média de ingestão de 31 parâmetros alimentares considerados pelo IID: energia, álcool, vitaminas A, C, D, E, B-12, B-6, Niacina, Tiamina, Riboflavina, β -caroteno, cafeína, carboidrato, colesterol, gordura total, fibra, ácido fólico, ferro, magnésio, MUFA, ômega-3, ômega 6, proteína, PUFA, gordura saturada, selênio, gordura trans, zinco, alho e cebola. Para controlar o efeito da ingestão de energia sobre a

ingestão de nutrientes, a ingestão média de cada parâmetro foi ajustada por 1000 kcal (E-DII). Em seguida, a ingestão média ajustada por energia foi transformada em Z-escore, como apresentado abaixo:

Valor médio ajustado da ingestão alimentar do indivíduo para um dado parâmetro alimentar
- Média de Referência

Desvio-padrão de Referência

O Z-escore foi então convertido para o percentil correspondente. Posteriormente, esse valor em percentil foi multiplicado por 2 e subtraído de 1, para obtenção do percentil centralizado. Para obter o E-IID especificamente do parâmetro alimentar de interesse, multiplicou-se o valor do percentil centralizado pelo escore do efeito inflamatório total do parâmetro alimentar. Por fim, o E-IID total do indivíduo foi obtido pela soma do E-IID de todos os parâmetros.

3.6 ANÁLISE DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS

Os marcadores inflamatórios (Fator de Necrose Tumoral α -TNF α , proteína quimiotática de monócitos-1- MCP-1 e interleucinas 1 β , 6, 10 e 12) foram analisadas por meio do *Ensaio Imunoenzimático (ELISA)*, utilizando-se kits comerciais (*eBioscience e R&D System*).

O ensaio foi realizado seguindo-se as instruções do fabricante. Resumidamente, microplacas com 96 poços foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais anti-citocinas diluídos em PBS e incubadas por 18 horas à temperatura ambiente. As placas foram bloqueadas com Soro Fetal Bovino 5% em PBS e incubadas por uma hora à temperatura ambiente. Em seguida, após um ciclo de três lavagens com solução 0,05% *Tween-20* em tampão PBS, foram adicionadas as amostras (50 μ L) e as diluições seriadas da curva padrão. As placas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente e após o término deste período, os respectivos anticorpos anti-citocinas conjugados à biotina foram adicionados às placas e incubados por 1 hora à temperatura ambiente. Após um ciclo de três lavagens, foi adicionada Estreptoavidina Peroxidase e incubada por 20 minutos à temperatura ambiente. Após novas lavagens, o substrato 3, 3', 5, 5' Tetrametilbenzidina foi

adicionado às placas e a reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 1M. A absorbância da reação foi medida por espectrofotometria no comprimento de onda de 450nm.

3.7 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO E DIVERSIDADE DA MICROBIOTA INTESTINAL

As amostras de fezes, coletadas e armazenadas em solução estabilizante, foram submetidas à lise celular e posterior extração de DNA utilizando a técnica de *Beads Magnéticas*, com o protocolo do fabricante (*Neoprosecta Microbiome Technologies, Brasil*).

Amostras de isolados bacterianos, isoladas e identificadas por VITEK®2, (*Salmonella enterica* -ATCC 14028-, *Listeria monocytogenes* -ATCC 19111-, *Staphylococcus aureus* -ATCC 25923-, *Bacillus cereus* -ATCC 10876-, *Escherichia coli* -ATCC 8739-, *Bacillus spizizenii* -ATCC 6633-, *Enterococcus faecalis* -ATCC 29212-, *Pseudomonas aeruginosa* -ATCC27853-, *Staphylococcus epidermidis* -ATCC 12228-, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae*), foram submetidas ao mesmo processamento com *Beads Magnéticas* para obtenção do DNA. Foram realizadas diluições em escala de 10x para DNA e em escala de 1log de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) para os microrganismos isolados. Adicionalmente, uma molécula de DNA sintético foi inserida em algumas amostras, previamente à extração de DNA e em diferentes concentrações (aproximadamente 600, 6.000, 60.000 moléculas), para avaliar o perfil de recuperação após o sequenciamento.

A identificação de bactérias foi realizada utilizando-se o sequenciamento de alto desempenho das regiões V3/V4 do gene *16S rRNA*. O sequenciamento foi feito no equipamento *MiSeq (Illumina Inc., USA)*, utilizando o kit V2 de 300 ciclos, single-end, sem normalização das bibliotecas. As sequências de DNA dos microrganismos foram analisadas através de um pipeline próprio (*Neoprosecta Microbiome Technologies, Brasil*), considerando no máximo 1% de erro acumulado no sequenciamento. Para a identificação das espécies de microrganismos presentes nas amostras, as sequências de DNA obtidas foram comparadas com um banco de dados contendo outras sequências de DNA já caracterizadas para as espécies de

interesse. Posteriormente às análises de bioinformática, os resultados foram carregados na plataforma *Neobiome* para melhor visualização.

Após a conclusão do sequenciamento *Illumina MiSeq*, os arquivos fastq foram colocados para sequências de baixa qualidade e quimeras usando o software *Neotools*. Em seguida, usando o mesmo software, as sequências que passaram nas etapas de qualidade (73.407,56 reads/ amostra) foram identificadas para taxonomias bacterianas usando o banco de dados *Neoref16S* (25.276,28 reads/ amostra). Para as identificações taxonômicas das espécies, o software *blastn v.2.7.1* foi utilizado em Lowest Ancestor (LCA) algoritmo (98,7% de similaridade). Todas as taxonomias que não atenderam a este requisito mínimo foram avaliadas para a definição de gênero, famílias ou outros níveis taxonômicos. A tabela de taxonomia (OTUs), sequências fasta (apenas oligotipos) e a tabela de metadados foram introduzidas no pipeline de análise de diversidade alfa e beta na versão R 3.4.4.

Para a obtenção dos índices de riqueza (Chao1), de alfa diversidade (Shannon, Simpson, InvSimpson, Evennes) e beta diversidade (heatmap), foi utilizado o pacote de software *Phyloseq* versão 1.22.3. Esses dados foram normalizados pela mediana. A identificação das espécies diferencialmente abundantes foi realizada com o pacote de software *DESeq2* versão 1.18.1. O teste de Walt e o modelo binomial negativo foram usados para normalizar os dados. Apenas bactérias que apresentaram valor de $p < 5\%$ e $|\log\text{FoldChanged}| > 2$ foram consideradas diferencialmente abundantes.

O percentual de abundância relativa foi calculado da seguinte forma: o número de bactérias identificadas em cada filo, gênero ou espécie foi dividido pelo número total de bactérias encontradas na amostra e multiplicado por 100.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística da microbiota (desfecho primário) foram considerados os indivíduos que tinham todos os dados coletados e para análise dos marcadores inflamatórios (desfecho secundário), uma sub-amostra foi considerada. As variáveis potencialmente confundidoras (IMC, idade, sexo, ingestão de água e ingestão de álcool) foram controladas no modelo de regressão.

Considerando que nenhum indivíduo apresentou $E-DII = 0$, os participantes do estudo foram divididos em dois grupos de acordo com o E-DII: grupo de dieta anti-inflamatória (DA), que incluiu indivíduos com $E-IID < 0$, e grupo de dieta pró-inflamatória (DP), que incluiu indivíduos com $E-IID \geq 0$. Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão ou contagem (n) e porcentagens. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov.

As diferenças entre os grupos de E-DII para as características dos indivíduos e ingestão alimentar foram avaliadas por teste T-independente, para variáveis paramétricas, ou Mann Whitney para variáveis não paramétricas. As diferenças médias entre os grupos de E-IID para marcadores inflamatórios e percentual de abundância relativa da microbiota foram avaliadas por ANCOVA, ajustada para ingestão de água.

As correlações foram feitas pelo teste de correlação de Pearson ou Spearman para variáveis não paramétricas e regressão hierárquica, ajustada pelas variáveis potencialmente confundidoras, foi realizada apenas para as variáveis que apresentaram correlação significativa com E-IID. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. A análise estatística foi realizada no software SPSS (versão 26).

Referências

AAGAARD, K. et al. The placenta harbors a unique microbiome. **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 237, 2014.

ABDURAHMAN, A. A. et al. Association of dietary inflammatory index with metabolic profile in metabolically healthy and unhealthy obese people. **Nutrition and Dietetics**, v. 76, n. 2, p. 192–198, 2019.

ALBENBERG, L. G.; WU, G. D. Diet and the intestinal microbiome: Associations, functions, and implications for health and disease. **Gastroenterology**, v. 146, n. 6, p. 1564–1572, 2014.

ARTIS, D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 6, p. 411–420, 2008.

AZEVEDO, R. et al. Modelo preditivo de obstipação: O que poderá ser útil para além do Roma IV? **Revista Portuguesa De Coloproctologia**, v. maio/out, p. 12–18, 2017.

BÄCKHED, F. et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 44, p. 15718–15723, 2004.

BÄR, F. et al. Cell-free supernatants of Escherichia coli Nissle 1917 modulate human colonic motility: Evidence from an in vitro organ bath study. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 21, n. 5, 2009.

BASHASHATI, M. et al. Cytokine imbalance in irritable bowel syndrome: A systematic review and meta-analysis. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 26, n. 7, p. 1036–1048, 2014.

BASILISCO, G.; COLETTA, M. Chronic constipation: A critical review. **Digestive and Liver Disease**, v. 45, n. 11, p. 886–893, 2013.

BASSOTTI, G. et al. Cellular and molecular basis of chronic constipation: Taking the functional/idiopathic label out. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 26, p. 4099–4105, 2013.

BHARUCHA, A. E. et al. American gastroenterological association medical position statement on constipation. **Gastroenterology**, v. 144, n. 1, p. 211–217, 2013.

BHATTARAI, Y. et al. Human-derived gut microbiota modulates colonic secretion in mice by regulating 5-HT₃ receptor expression via acetate production. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 313, n. 1, p. G80–G87, 2017.

BHAVSAR, A. P.; GUTTMAN, J. A.; FINLAY, B. B. Manipulation of host-cell pathways by bacterial pathogens. **Nature**, v. 449, n. 7164, p. 827–834, 2007.

BONECA, I. G. et al. A critical role for peptidoglycan N-deacetylation in *Listeria* evasion from the host innate immune system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 3, p. 997–1002, 2007.

CANI, P. D. Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. **Diabetes**. v. 56, p.1761–1772, 2007.

CANI, P. D. Human gut microbiome: Hopes, threats and promises. **Gut**, v. 67, n. 9, p. 1716–1725, 2018.

CAO, H. et al. Dysbiosis contributes to chronic constipation development via regulation of serotonin transporter in the intestine. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.

CAVICCHIA, P.P. et al. A New Dietary Inflammatory Index Predicts Interval Changes in Serum High-Sensitivity. **J Nutr**, v. 139, n. 12, p. 2365–2372, 2009

CHOW, J.; TANG, H.; MAZMANIAN, S. K. Pathobionts of the gastrointestinal microbiota and inflammatory disease. **Current Opinion in Immunology**, v. 23, n. 4, p. 473–480, 2011.

COLLADO, M. C. et al. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. **Scientific Reports**, v. 6, n. October 2015, p. 1–13, 2016.

COTILLARD, A. et al. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. **Nature**, v. 500, n. 7464, p. 585–588, 2013.

DAVID, L. A. et al. Diet Rapidly Alters the Human Gut Microbiota. **Nature**, v. 505, n. 7484, p. 559–563, 2014.

DE BIASE, D.; PENNACCHIETTI, E. Glutamate decarboxylase-dependent acid resistance in orally acquired bacteria: Function, distribution and biomedical implications of the *gadBC* operon. **Molecular Microbiology**, v. 86, n. 4, p. 770–786, 2012.

DE FILIPPIS, F. et al. The same microbiota and a potentially discriminant metabolome in the saliva of omnivore, ovo-lacto-vegetarian and vegan individuals. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, 2014.

DE FILIPPIS, F. et al. High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. **Gut**, v. 65, n. 11, p. 1–10, 2016.

DE FILIPPO, et al., Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n.33, p. 14691-96, 2010

DE MEIJ, T. G. J. et al. Characterization of microbiota in children with chronic functional constipation. **PLoS ONE**, v. 11, n. 10, p. 1–13, 2016.

DIMIDI, E. et al. Mechanisms of action of probiotics and the gastrointestinal microbiota on gut motility and constipation. **Advances in Nutrition**, v. 8, n. 3, p. 484–494, 2017.

DOMINIKA, Š. et al. The study on the impact of glycated pea proteins on human intestinal bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, n. 1, p. 267–272, 2011.

DROSSMAN, D. A. Functional gastrointestinal disorders: History, pathophysiology, clinical features, and Rome IV. **Gastroenterology**, v. 150, n. 6, p. 1262–1279.e2, 2016.

DURACK, J.; LYNCH, S. V. The gut microbiome: Relationships with disease and opportunities for therapy. **Journal of Experimental Medicine**, v. 216, n. 1, p. 20–40, 2019.

FAVA, F. et al. The type and quantity of dietary fat and carbohydrate alter faecal microbiome and short-chain fatty acid excretion in a metabolic syndrome “at-risk” population. **International Journal of Obesity**, v. 37, n. 2, p. 216–223, 2013.

FRANK, D. N. et al. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **Pnas**, v. 104, n. 34, p. 13780–13785, 2007.

GOODMAN, A. L. et al. Extensive personal human gut microbiota culture collections characterized and manipulated in gnotobiotic mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 15, p. 6252–6257, 2011.

HALMOS, E. P. et al. Diets that differ in their FODMAP content alter the colonic luminal microenvironment. **Gut**, v. 64, n. 1, p. 93–100, 2015.

HÉBERT, J. R. et al. Perspective: The Dietary Inflammatory Index (DII) - Lessons Learned, Improvements Made, and Future Directions. **Advances in Nutrition**, v. 10, n. 2, p. 185–195, 2019.

HENTGES, D. J. et al. Effect of a High-Beef Diet on the Fecal Bacterial Flora of Humans. **Cancer Research**, v. 37, n. 2, p. 568–571, 1977.

HOOPER, L. V.; MACPHERSON, A. J. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 3, p. 159–169, 2010.

HUANG, L. et al. Microbial treatment in chronic constipation Springer 2018.pdf. 2018.
HUSEBYE, E. et al. Influence of microbial species on small intestinal myoelectric activity and transit in germ-free rats. **American Journal of Physiology-**

Gastrointestinal and Liver Physiology, v. 280, n. 3, p. G368–G380, 2017.

IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: Tabela de Medidas Referidas para os Alimentos Consumidos no Brasil. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. 2011. 1–63 p. Internet: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv81830.pdf>

INANOV, I.I. et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. **Public Health Nutrition**, v. 139, n. 3, p. 485–498, 2009.

Institute of Medicine. Dietary reference intakes: applications in dietary assessment. Washington (DC): National Academy Press; 2000.

IVANOV, I. I.; HONDA, K. Intestinal commensal microbes as immune modulators. **Cell Host and Microbe**, v. 12, n. 4, p. 496–508, 2012.

IPAQ. Guidelines for Data Processing and Analysis of the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) – Short and Long Forms. **Ipaq**, n. November, p. 1–15, 2005.

JANDHYALA, S. M. et al. Role of the normal gut microbiota. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 29, p. 8836–8847, 2015.

KEDIA, S. et al. Gut microbiome diversity in acute infective and chronic inflammatory gastrointestinal diseases in North India. **Journal of Gastroenterology**, v. 51, n. 7, p. 660–671, 2016.

KHALIF, I. L. et al. Alterations in the colonic flora and intestinal permeability and evidence of immune activation in chronic constipation. **Digestive and Liver Disease**, v. 37, n. 11, p. 838–849, 2005.

KHO, Z. Y.; LAL, S. K. The human gut microbiome - A potential controller of wellness and disease. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. AUG, p. 1–23, 2018.

KIM, S. E. et al. Change of fecal flora and effectiveness of the short-term VSL#3 probiotic treatment in patients with functional constipation. **Journal of Neurogastroenterology and Motility**, v. 21, n. 1, p. 111–120, 2015.

KOLA, B. Role of AMP-activated protein kinase in the control of appetite. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 20, n. 7, p. 942–951, 2008.

LACY, B. E. et al. Bowel disorders. **Gastroenterology**, v. 150, n. 6, p. 1393- 1407.e5, 2016.

LINETZKY WAITZBERG, D. et al. Microbiota benefits after inulin and partially hydrolyzed guar gum supplementation: a randomized clinical trial in constipated women. **Nutrición hospitalaria: organo oficial de la Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral**, v. 27, n. 1, p. 123–129, 2012.

LIU, J. et al. Non-isoflavones Diet Incurred Metabolic Modifications Induced by

Constipation in Rats via Targeting Gut Microbiota. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. December, p. 1–11, 2018.

LOPETUSO, L. R. et al. Commensal Clostridia: Leading players in the maintenance of gut homeostasis. **Gut Pathogens**, v. 5, n. 1, p. 1–8, 2013.

LUPP, C. et al. Host-Mediated Inflammation Disrupts the Intestinal Microbiota and Promotes the Overgrowth of Enterobacteriaceae. **Cell Host and Microbe**, v. 2, n. 2, p. 119–129, 2007.

MA, X. et al. Lactobacillus reuteri ingestion prevents hyperexcitability of colonic DRG neurons induced by noxious stimuli . **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 296, n. 4, p. G868–G875, 2009.

MACPHERSON, A. J.; UHR, T. Induction of Protective IgA by Intestinal Dendritic Cells Carrying Commensal Bacteria Author(s): Andrew J. Macpherson and Therese Uhr Source: v. 303, n. 5664, p. 1662–1665, 2016.

MARCHESI, J. R. et al. The gut microbiota and host health: A new clinical frontier. **Gut**, v. 65, n. 2, p. 330–339, 2016.

MARTÍNEZ, I. et al. Gut microbiome composition is linked to whole grain-induced immunological improvements. **ISME Journal**, v. 7, n. 2, p. 269–280, 2013.

MORAES, J. G. DE et al. Fecal Microbiota and Diet of Children with Chronic Constipation. **International Journal of Pediatrics**, v. 2016, p. 1–8, 2016.

MUNIZ, L. R.; KNOSP, C.; YERETSSIAN, G. Intestinal antimicrobial peptides during homeostasis, infection, and disease. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. OCT, p. 1–14, 2012.

OHKUSA, T. et al. Gut Microbiota and Chronic Constipation: A Review and Update. **Frontiers in Medicine**, v. 6, n. February, p. 1–9, 2019.

PARTHASARATHY, G. et al. Relationship between Microbiota of the Colonic Mucosa vs Feces and Symptoms, Colonic Transit, and Methane Production in Female Patients with Chronic Constipation. **Gastroenterology**, v. 150, n. 2, p. 367- 379.e1, 2016.

PINHEIRO, A.B.V., Lacerda, E.M.A., Benzecry, E.H. Tabela para Avaliação do Consumo Alimentar em Medidas Caseiras. 4°. Atheneu.

PLÉ, C. et al. Maintaining gut ecosystems for health: Are transitory food bugs stowaways or part of the crew? **International Journal of Food Microbiology**, v. 213, p. 139–143, 2015.

PULL, S. L. et al. Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 1, p. 99–104, 2005.

REN, Z. et al. Association between dietary inflammatory index, c-reactive protein and metabolic syndrome: A cross-sectional study. **Nutrients**, v. 10, n. 7, p. 1–13, 2018.
SARTOR, R. B.; MAZMANIAN, S. K. Intestinal Microbes in Inflammatory Bowel Diseases. **The American Journal of Gastroenterology Supplements**, v. 1, n. 1, p. 15–21, 2012.

SCHMULSON, M. J.; DROSSMAN, D. A. What's new in Rome IV? **Neurogastroenterology and Motility**, v. 29, n. 9, p. 151–163, 2017.

SHIVAPPA N, STECK SE, HURLEY TG, HUSSEY JR, H. J. Dietary Inflammatory Index. **Public Health Nutrition**, v. 17, n. 8, p. 1689–1696, 2014.

SHIVAPPA, N. et al. A population-based dietary inflammatory index predicts levels of C-reactive protein in the Seasonal Variation of Blood Cholesterol Study (SEASONS). **Public Health Nutrition**, v. 17, n. 8, p. 1825–1833, 2014.

SHIVAPPA, N. et al. Associations between dietary inflammatory index and inflammatory markers in the Asklepios Study. **British Journal of Nutrition**, v. 113, n. 4, p. 665–671, fev. 2015.

SHIVAPPA, N. et al. Association between the Dietary Inflammatory Index (DII) and urinary enterolignans and C-reactive protein from the National Health and Nutrition Examination Survey-2003–2008. **European Journal of Nutrition**, v. 58, n. 2, p. 797–805, 2019.

SIMPSON, H. L.; CAMPBELL, B. J. Review article: Dietary fibre-microbiota interactions. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 42, n. 2, p. 158–179, 2015.

SIMREŃ, M. et al. Intestinal microbiota in functional bowel disorders: A Rome foundation report. **Gut**, v. 62, n. 1, p. 159–176, 2013.

SINGH, R. K. et al. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. **Journal of Translational Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1–17, 2017.

SMYTHIES, L. E. et al. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 1, p. 66–75, 2005.

SOBRADO, C. W. et al. Diagnosis and treatment of constipation: a clinical update based on the Rome IV criteria. **Journal of Coloproctology**, v. 38, n. 2, p. 137–144, 2018.

SONNENBURG, E. D.; SONNENBURG, J. L. Starving our microbial self: The deleterious consequences of a diet deficient in microbiota-accessible carbohydrates. **Cell Metabolism**, v. 20, n. 5, p. 779–786, 2014.

TACK, J. et al. Diagnosis and treatment of chronic constipation - a European perspective. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 23, n. 8, p. 697–710, 2011.

THIENNIMITR, P. et al. Intestinal inflammation allows Salmonella to use ethanolamine to compete with the microbiota and Andreas J . Bäumler Source : Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.

TOMASELLO, G. et al. Nutrition, oxidative stress and intestinal dysbiosis: Influence of diet on gut microbiota in inflammatory bowel diseases. **Biomedical Papers**, v. 160, n. 4, p. 461–466, 2016.

WALKER, A. W.; LAWLEY, T. D. Therapeutic modulation of intestinal dysbiosis. **Pharmacological Research**, v. 69, n. 1, p. 75–86, 2013.

WAN, Y. et al. Effects of dietary fat on gut microbiota and faecal metabolites, and their relationship with cardiometabolic risk factors: a 6-month randomised controlled-feeding trial. *Gut*, v. 68, n. 8, p. 1417–1429, 2019.

WEI, M. et al. Mice carrying a knock-in mutation of Aicda resulting in a defect in somatic hypermutation have impaired gut homeostasis and compromised mucosal defense. **Nature Immunology**, v. 12, n. 3, p. 264–270, 2011.

WINTER, S. E. et al. Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for Salmonella. **Nature**, v. 467, n. 7314, p. 426–429, 2010.

WU, G. D. et al. Linking Long-Term Dietary Patterns with. **Science**, v. 334, n. October, p. 105–109, 2011.

YANO, J. M. et al. Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. **Cell**, v. 161, n. 2, p. 264–276, 2015.

ZHENG, J. et al. Dietary inflammatory potential in relation to the gut microbiome: Results from a cross-sectional study. **British Journal of Nutrition**, 2020.

ZHU, L. et al. Structural changes in the gut microbiome of constipated patients. **Physiological Genomics**, v. 46, n. 18, p. 679–686, 2014.

ZOPPI, G. et al. The intestinal ecosystem in chronic functional constipation. **Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics**, v. 87, n. 8, p. 836–841, 1998.

CAPÍTULO II

Artigo Original

**Dietary inflammatory index and its relationship with gut in individuals with
intestinal constipation: a cross-sectional study**

Manuscrito submetido ao periódico *The British Journal Of Nutrition*

1 **Dietary inflammatory index and its relationship with gut microbiota in**
2 **individuals with intestinal constipation: a cross-sectional study**

3

4 Lorena M. Costa¹, Marcela M. Mendes¹, Amanda C. Oliveira², Kelly Grace
5 Magalhães³; Nitin Shivappa^{4,5,6}, James R. Hebert^{4,5,6}, Teresa Helena M. da
6 Costa¹, Patrícia B. Botelho^{1*}

7

8 **Affiliations**

9 *¹Department of Nutrition, Faculty of Health Sciences, University of Brasília,*
10 *Brasília, Brazil)*

11 *²Faculty of Nutrition, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil*

12 *³Laboratory of immunology and inflammation, University of Brasília, Brasília, DF,*
13 *Brazil*

14 *⁴ Cancer Prevention and Control Program, University of South Carolina,*
15 *Columbia, SC, USA*

16 *⁵Department of Epidemiology and Biostatistics, Arnold School of Public Health,*
17 *University of South Carolina, Columbia, SC, USA*

18 *⁶Department of Nutrition, Connecting Health Innovations LLC, Columbia, SC,*
19 *USA*

20

21 **Running title:** dietary inflammatory index and gut microbiota

22 **Disclosure:** Dr. James R. Hébert owns controlling interest in Connecting Health
23 Innovations LLC (CHI), a company that has licensed the right to his invention of
24 the dietary inflammatory index (DII®) from the University of South Carolina in
25 order to develop computer and smart phone applications for patient counseling
26 and dietary intervention in clinical settings. Dr. Nitin Shivappa is an employee of
27 CHI.

28

29 ***Corresponding author:** Patrícia Borges Botelho (PBB). Mailing Adress:
30 Campus Universitário Darcy Ribeiro- Faculdade de Ciências da Saúde - Brasília-
31 DF| Zip Code:70910-900; Telephone number: +55 (61) 3107 1957; E-mail:
32 patriciabotelho@unb.br

33 **Abstract**

34 Functional constipation (FC) may be associated with the composition intestinal
35 microbiota and diet. The aim of this study was to assess whether there is an
36 association between the inflammatory potential of the diet, measured by the
37 dietary inflammatory index (DII®), and the composition of intestinal microbiota in
38 adults with FC. Cross-sectional study with 68 adults with FC. Energy-adjusted DII
39 (E-DII) was calculated from data obtained from food surveys, serum inflammation
40 markers were also assessed and the composition of the intestinal microbiota was
41 evaluated using the 16S rRNA gene sequencing method. Individuals were
42 divided into two groups: anti-inflammatory diet (AD: E-DII<0) and pro-
43 inflammatory diet (PD: E-DII≥0). Associations of E-DII scores with microbial
44 diversity and composition were examined using differences between the E-DII
45 groups and regression linear. E-DII was inversely correlated with relative
46 abundance of *Hungatella unclassified species* and *Bacteroides fragillis* and
47 positively correlated with *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Bacteroides caccae*,
48 all $p<0.05$. Moreover, AD group presented higher percentage of relative
49 abundance of the genera *Blautia* and *Hungatella* and lower percentage of relative
50 abundance of species *Bacteroides tetaitaomicron* and of *Bacteroides*
51 *unclassified species* (all $p<0.05$). AD group was associated with a reduction in
52 the abundance of unclassified species of *Desulfovibrio* and *Butyrivibrio*,
53 *Butyrivibrio crossotus*, *Bacteroides clarus*, *Bacteroides coprophilus* and
54 *Bacteroides intestinalis* (all $p<0.05$). There was no significant difference for
55 inflammatory markers. Therefore, the results of this study indicate that the
56 inflammatory potential of the diet is associated with the gut microbiota in
57 individuals with FC.

58 **Keywords:** diet; dietary inflammatory index; microbiota; constipation

59 Introduction

60 Chronic functional constipation (FC) is characterized by incomplete,
61 difficult and/or infrequent bowel evacuation, which affects approximately 16% of
62 the adult western population ⁽¹⁾. Although the cause is not fully understood, FC
63 might be related to food intake and an unbalanced composition of gut microbiota,
64 known as dysbiosis ⁽²⁾.

65 Dysbiosis is characterized by a greater abundance of potentially pathogenic
66 bacteria, such as *Escherichia coli* and *Enterobacteriaceae* species, and can be
67 detrimental to commensal bacteria, such as those belonging to the genus
68 *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* ^(3,4). In addition, the intestinal microbiota is
69 modified according to the individual's dietary pattern since diet provides substrate
70 for bacteria which, in turn, generate products capable of modulating the
71 inflammatory response and intestinal motility ^(5,6).

72 The Dietary Inflammatory Index (DII®) was developed to measure the
73 inflammatory potential of the diet ⁽⁷⁾ and has been shown to be associated with
74 inflammatory markers ^(8,9). Shivappa et al. ⁽¹⁰⁾ investigated, in adult individuals,
75 the influence of DII adjusted for energy (E-DII) on serum C- reactive protein
76 (CRP) and on the concentration of enterolignans, a metabolite marker of
77 microbial diversity present in urine. This study observed that individuals with
78 higher E-DII had lower concentration of enterolignans and less microbial
79 diversity. In addition, higher E-DII score also was associated with CRP ≥ 3
80 mg/L.⁽¹⁰⁾

81 Another study investigated the influence of E-DII on the composition and
82 diversity of the intestinal microbiota and on the concentration of inflammatory
83 markers in adults and observed that the abundance of some species varied
84 between pro and anti-inflammatory diet. However, they found no association
85 between E-DII, inflammatory markers and diversity of the intestinal microbiota ⁽¹¹⁾.
86 Nevertheless, to our knowledge, there are still no studies that have evaluated this
87 relationship in individuals with constipation.

88 Therefore, considering that dysbiosis is present in individuals with
89 constipation and that the response to the inflammatory potential of the diet may
90 differ according to the population profile, the objective of this study was to
91 evaluate whether there is an association between the inflammatory potential of
92 the diet, measured by the dietary inflammatory index (DII®), and the composition

93 of intestinal microbiota in adults with FC. Our hypothesis is that a more pro-
94 inflammatory diet (E-DII \geq 0) would be associated with lower diversity of the
95 intestinal microbiota and the higher concentration of pro-inflammatory markers in
96 individuals with FC.

97

98 **Methods**

99

100 *Study design and Population*

101 This is a cross-sectional study with 68 individuals with constipation. The
102 participants were recruited convenience sampling between September and
103 October 2017. Recruitment was advertised through social media, leaflets and at
104 the website of the Federal University of Goiás and data were collected at the
105 Faculty of Nutrition of Federal University of Goiás. This manuscript follows the
106 Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology
107 (STROBE) recommendations ⁽¹²⁾. All procedures involving human beings were
108 approved by the Ethics Committee of the Clinical Hospital of the Federal
109 University of Goiás with approval number of 2.281.977.

110 Eligible participants were selected by a screening questionnaire to assess
111 inclusion and exclusion criteria. The inclusion criteria were: being between 19
112 and 60 years of age and presence of intestinal constipation defined in accordance
113 with the ROME IV criteria ⁽¹³⁾. Participants diagnosed with gastrointestinal tract
114 diseases or complications from surgery resulting from these diseases, with liver
115 or kidney dysfunction, who used antibiotics in the previous 4 weeks or were taking
116 vitamins, minerals, foods, herbal products or other supplements to reduce
117 digestive tract symptoms were excluded. Individuals who consumed foods
118 containing probiotics and prebiotics or foods/nutraceuticals with anti-
119 inflammatory activity were also excluded. Participants found to be eligible signed
120 informed consent and proceeded to the data collection phase.

121

122 *Sociodemographic and lifestyle data*

123 Data on sex, age, income, years of study, intake and frequency of alcohol
124 consumption, water intake and smoking were collected using a questionnaire
125 administered by a trained researcher.

126 The level of physical activity was assessed by the International Physical
127 Activity Questionnaire - IPAQ validated for the Brazilian population and
128 categorized as low, moderate and high level according to the Guidelines for Data
129 Processing and Analysis of the International Physical Activity Questionnaire -
130 Short and Long forms ⁽¹⁴⁾.

131

132 *Anthropometric data*

133 Anthropometric measurements were performed by trained researchers to
134 assess body weight (kg), height (cm) and waist circumference (cm, measured at
135 the point with the lowest circumference) ⁽¹⁵⁾. Body mass index
136 (BMI=weight[kg]/height[m]²) was classified according to the World Health
137 Organization (WHO) criteria ⁽¹⁶⁾.

138

139 *Dietary intake and calculation of the E-DII*

140 Food intake data were obtained through one 24-hour recall (24HR) and
141 three consecutive days dietary record (3 DDR) with two days interspersed during
142 the week and one day at the weekend. All records were checked by the team
143 upon return. There were no significant differences between 24-HR and 3DDR for
144 the mean intake of any of the food parameters (all $p > 0.05$), and therefore they
145 were combined in the analysis as the mean intake of 4 days.

146 The data obtained from the food intake records were converted to
147 measures in grams using food composition tables from the book Evaluation of
148 Food Consumption based on Cooking Measures ⁽¹⁷⁾, and also from published
149 work from the research group for the Evaluation of Food Consumption at the
150 University of São Paulo (GAC -USP), and from published data from the Brazilian
151 Institute of Geography and Statistics (IBGE) ⁽¹⁸⁾. After obtaining the food values
152 in grams, these were coded in the Nutrition Data System for Research (NDSR)
153 software (Nutrition Coordinating Center, University of Minnesota, Minneapolis,
154 MN, USA) to obtain the macro and micronutrient contents and the amount
155 (grams) consumed of the foods used to calculate the DII. The NDSR database
156 contains the USDA National Nutrient Database for Standard and the Brazilian
157 foods that were not listed in the program database had their nutritional value
158 inserted manually or a food with similar nutritional value was entered.

159 The calculation of the E- DII was performed as proposed by Shivappa et
160 al (2014) ⁽⁷⁾ and Hebert et al (2019) ⁽¹⁹⁾ using the Statistical Analysis System
161 (SAS) software. In summary, the calculation involves the average consumption
162 of nutrients and foods called dietary parameters. The average consumption
163 between 24HR and 3DDR for each food parameter was used to calculate the E-
164 DII scores for each individual. To control the effect of energy ingestion on nutrient
165 intake, the average intake of each parameter was adjusted by 1000 kcal. This
166 average intake of each parameter was subtracted from the reference average of
167 each parameter and the result was divided by the reference standard deviation
168 of each food parameter to standardize the E-DII score into Z-score. The mean
169 and standard deviation of ingestion reference for each parameter was obtained
170 based on a food consumption database from eleven countries and adjusted for
171 energy ⁽¹⁹⁾. The Z-score value obtained was then converted into the
172 corresponding proportion and, subsequently, the proportion value was multiplied
173 by 2 and subtracted from 1 was to obtain the centered percentile. To obtain the
174 specific inflammatory effect for each food parameter, the centered percentile
175 value was multiplied by the total score of the inflammatory effect of the food
176 parameter. Finally, the individual's total E-DII was the sum of the E-DII for each
177 dietary parameter.

178 Thirty one of the 45 dietary parameters were available in this study:
179 Energy, Carbohydrate, Protein, Total Fat, Alcohol, Fiber, Cholesterol, Saturated
180 Fat Acid (SFA), Monounsaturated Fat Acid (MUFA), Polyunsaturated Fat Acid
181 (PUFA), Omega-3, Trans Fat, vitamins Niacin, Thiamine, Riboflavin, B12, B6, A,
182 C, D, E and Folic Acid, Iron, Magnesium, Zinc, Selenium, β -carotene, Caffeine,
183 Garlic and Onion. For the E-DII 30 parameters were used; i.e., the full list minus
184 Energy.

185

186 *Blood collection and Inflammatory markers analysis*

187 Approximately 10 ml of blood was collected from each volunteer (after a
188 12-hour fast, including no alcohol intake), into a vacuum blood collection tube
189 without EDTA. Blood samples were centrifuged at 700 x g for 10 min at 4°C to
190 obtain serum.

191 Serum cytokines (Tumor Necrosis Factor α -TNF α , monocyte chemotactic
192 protein-1-MCP-1 and interleukins 1 β , 6, 10 and 12) were analyzed using the

193 Immunoenzymatic Assay (ELISA), using commercial kits (eBioscience and R&D
194 System). C-reactive protein Ultra-Sensitive (hs-CRP) was analyzed by the
195 Immunoturbidimetry method and the Immunoglobulins (Ig A, Ig M and Ig G) were
196 evaluated by the Turbidimetry method.

197

198 *Gut microbiota analysis*

199 Fecal samples were collected by the individuals themselves using swabs
200 and stored in a stabilizing solution. The participants were instructed to collect the
201 feces in the same week that other data were collected. Subsequently, stool
202 samples were subjected to cell lysis and DNA extraction using the magnetic
203 sphere technique (Neoprosecta Microbiome Technologies, Brazil).

204 For DNA extraction, samples of bacterial isolates *Salmonella enterica*
205 (ATCC 14028), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111), *Staphylococcus aureus*
206 (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Escherichia coli* (ATCC 8739),
207 *Bacillus spizizenii* (ATCC 6633), *Enterococcus spark* ATCC 29212),
208 *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC
209 12228), *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* (isolated and
210 identified by VITEK®2) were subjected to the same processing with magnetic
211 spheres. The dilutions were performed on a 10X scale for DNA and on a 1 log
212 UFC scale (Colony Formation Units) for the isolated microorganisms. In addition,
213 a synthetic DNA molecule was inserted into some samples before DNA extraction
214 and in different concentrations (approximately 600, 6000, 60,000 molecules) to
215 assess their recovery profile after sequencing. The identification of bacteria was
216 performed by the high performance sequencing method of the V3 / V4 regions of
217 the 16S rRNA gene. The sequencing was performed on the MiSeq equipment
218 (Illumina Inc., USA), using the V2 kit of 300 single-ended cycles, without library
219 normalization. The DNA sequences of the microorganisms were analyzed using
220 a proprietary pipeline (Neoprosecta Microbiome Technologies, Brazil),
221 considering a maximum of 5% of accumulated error in the sequencing. For the
222 identification of the microorganism species present in the samples, the DNA
223 sequences obtained were compared with a database containing other DNA
224 sequences already characterized for the species of interest. For visualization, the
225 results were placed on the Neobiome platform, after bioinformatics analysis.

226

227 *Analysis of gut microbiota composition*

228 After completion of the Illumina MiSeq sequencing, the fastq files
229 (96,952.41 reads/sample) were trimmed to low-quality sequences and chimeras
230 using proprietary Neotools software. Then, using the same software, the
231 sequences that passed the quality steps (73,407.56 reads/sample) were
232 identified for bacterial taxonomies using the Neoref16S database (25,276.28
233 reads/sample). For the taxonomic identifications, the blastn software v.2.7.1⁽²⁰⁾
234 was used Lowest Ancestor (LCA) algorithm for species definition (98.7%
235 similarity). All taxonomies that did not meet this minimum requirement were
236 evaluated for the definition of genus, families or other taxonomic levels⁽²¹⁾. The
237 taxonomy and OTUs table, fasta sequences (clusters only) and metadata table
238 were introduced in the alpha and beta-diversity analysis pipeline in R version
239 3.4.4⁽²²⁾.

240 For the production of the richness indexes (Chao1), alpha (Shannon,
241 Simpson, InvSimpson, Evennes) and beta diversity (heatmap), the Phyloseq
242 software package version 1.22.3 was used⁽²³⁾. These data were normalized by
243 the median. The identification of differentially abundant species was carried out
244 with the DESeq2 software package version 1.18.1⁽²⁴⁾. Walt test and negative
245 binomial model were used to normalize the data. Only bacteria that had p-value
246 <5% and $|\log\text{FoldChanged}| > 2$ were considered to be differentially abundant.

247 The percentage of relative abundance was calculated as follows: the
248 number of bacteria identified in each phylum, genus or species was divided by
249 the total number of bacteria found in the sample and then multiplied by 100⁽²⁵⁾.

250

251 *Statistical analysis*

252 The primary outcome of the study was the composition of the microbiota.
253 In the statistical analysis for the primary outcome, only individuals who had all the
254 data collected were considered. The confounding variables were BMI, age,
255 gender, water and alcohol intake on the composition of the microbiota and,
256 therefore, were considered in the regression model.

257 Considering that no subject presented E-DII = 0, participants were divided
258 into two groups according to the E-DII: anti-inflammatory diet group (AD), which
259 included subjects with E-DII<0, and pro-inflammatory diet group (PD) which
260 included subjects with E-DII ≥0. The results are presented as mean ± standard

261 deviation or count (n) and percentages. Normality was assessed using the
262 Kolmogorov-Smirnov test.

263 The mean differences between groups for individuals' characteristics and
264 dietary intake was assessed by independent T-test, or Mann Whitney for non-
265 parametric variables. As differences between groups were observed only for
266 water intake, the mean differences between groups for percentage of microbiota
267 abundance was assessed by ANCOVA adjusted for water intake. The statistical
268 difference in the indexes of richness and diversity between the AD and PD groups
269 was assessed by the Wilcoxon test.

270 Correlations were analyzed by Pearson's correlation test, or Spearman's
271 for non-parametric variables. Hierarchical regression adjusted for potentially
272 confounding factors (water intake, BMI, age, gender and alcohol intake) was
273 performed for the variables that presented a significant correlation with E-DII. A
274 value of $p < 0.05$ was considered significant. The statistical analysis was
275 performed using the SPSS software (version 26).

276

277 **Results**

278

279 *Characterization of the study population*

280 A total of 141 individuals were screened for eligibility, of which 51 were
281 excluded for not meeting the inclusion criteria. 90 participants met the eligibility
282 criteria and agreed to participate in the study. During the study, 16 subjects were
283 excluded for not having complete dietary data and 6 subjects were excluded
284 because their fecal samples were not viable for analysis. In total, 68 participants
285 were included (**Figure 1**). The characteristics of the participants are presented in
286 **Table 1**.

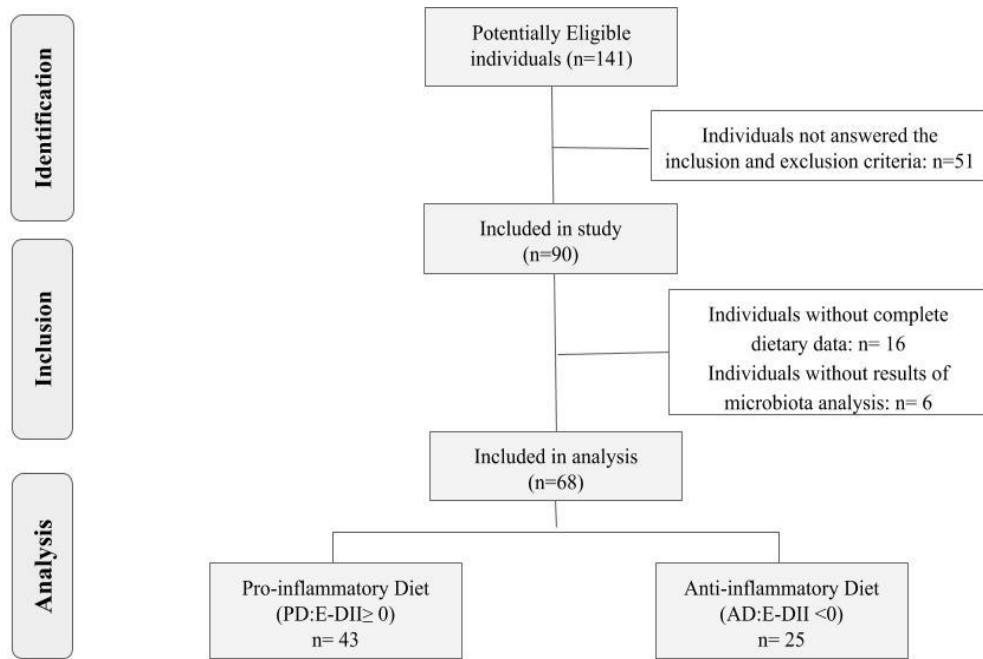


Figure 1. Flowchart of participants selected for the study. Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) (13). E-DII: Energy Adjusted Dietary Inflammatory Index; PD: Pro-Inflammatory Diet; AD: Anti-inflammatory Diet

Table 1. Characteristics of participants in anti-inflammatory diet (AD) and pro-inflammatory diet (PD) groups

Variables	AD: E-DII <0 n=25	PD: E-DII ≥0 n=43	p ¹
Sex			
Female n (%)	22 (88)	36 (83.7)	0.63
Male n (%)	3 (12)	7 (16.3)	
Age (mean±SD years)	30.72±10.66	28.23±10.01	0.36
BMI (kg/m ²)	23.80±4.6	24.50±3.93	0.54
Waist Circumference (mean±SD)	74.23±9.74	76.35±10.25	0.59
Income (R\$)	13,494.80 ± 36,893.15	3,724.30 ± 3,177.32	0.77
Years of study n (%)			
Up to 11 years	4 (16)	9 (21.4)	0.59
12 years and over	21 (84)	33 (78.6)	
Alcoholic beverage intake n (%)			
Yes	10 (40)	19 (44.2)	0.74
No	15 (60)	24 (55.8)	
Alcohol frequency n (%)			
Do not drink	15 (60)	24 (57.1)	0.97
1-2 times per week	3 (12)	5 (11.9)	
1-3 times per month	7 (28)	13 (31)	
Water intake n (%)			
Up to 1L	8 (32)	23 (53.5)	0.04
1-2 L	10 (40)	17 (39.5)	
More than 2L	7 (28)	3 (7)	
Physical activity level n (%)			
Low	7 (28)	24 (55.8)	0.08
Moderate	12 (48)	14 (32.6)	
High	6 (24%)	5 (11.6)	
Smoke n (%)			
Yes	0	2 (4.7)	0.27
No	25 (100%)	41 (95.3)	

AD: Anti-inflammatory Diet; E-DII: Energy Adjusted Dietary Inflammatory Index; PD: Pro Inflammatory Diet; R\$: Real. ¹T-test; Mann-Whitney test

287 There were no statistical differences between the E-DII groups for
 288 individual's characteristics, except for water intake. The E-DII range was -3.73
 289 (the most anti-inflammatory diet) to 4.23 (the most anti-inflammatory diet).

290

291 *Intake of E-DII Dietary parameters*

292 The mean intakes of the 31 dietary parameters selected for calculating the
 293 E-DII are shown in **Table 2**.

Table 2. Differences between anti (AD) and pro-inflammatory (PD) diet groups for dietary parameters of E-DII (mean±SD)

Food Parameters of E-DII	AD: E-DII <0 n= 25	PD: E-DII ≥0 n= 43	p¹
Alcohol (g)	1.13 ± 3.28)	3.45±10.21	0.58
β-Carotene (mcg)	4498.67±4204.60	1629.87±1129.75	<0.001
Caffeine (g)	0.04±0.02	0.03±0.03	0.08
Carbohydrate (g)	177.98±57.71	201.70±83.58	0.42
Cholesterol (mg)	262.72±152.96	280.04±120.61	0.43
Energy (kcal)	1420.99±370.41	1749.34±595.44	0.03
Fiber (g)	16.95±7.15	13.59±6.82	0.03
Folic Acid (mcg)	60.02±34.62	80.44±52.89	0.12
Garlic (g)	0.28±0.67	0.21±0.60	0.67
Iron (mg)	10.43±3.77	11.70±4.69	0.24
Magnesium (mg)	236.26±81.51	218.98±80.75	0.28
MUFA (g)	17.13±5.72	23.51±10.49	0.006
Niacin (mg)	17.20±6.12	19.98±8.97	0.45
Onion (g)	8.07±7.93	4.93±4.63	0.16
Omega-3 (g)	1.44±0.52	1.53±0.92	0.82
Omega-6 (g)	10.35±3.94)	11.74±7.61	0.78
Protein (g)	68.69±20.25	81.94±30.68	0.20
PUFA (g)	12.01±4.35	13.51±8.56	0.90
Riboflavin (mg)	1.30±0.34	1.28±0.37	0.78
Selenium (mcg)	87.31±27.84	108.64±36.92	0.03
SFA (g)	16.55±5.03	24.20±10.17	<0.001
Thiamin (mg)	1.11±0.25	1.28±0.44	0.12
Total Fat (g)	50.40±14.94	67.16±28.37	0.01
Trans Fat (g)	1.13±0.57	2.27±1.41	<0.001
Vitamin A (RE)	1255.30±985.85	627.77±441.85	0.001
Vitamin B-6 (mcg)	1.53±0.59	1.55±0.68	0.66
Vitamin B-12 (mcg)	4.54±5.96	3.86±2.74	0.47

Vitamin C (mg)	157.36±221.57	104.65±253.54	0.001
Vitamin D (mcg)	3.49±2.06	2.54±0.95	0.02
Vitamin E (mg)	5.83±2.69	5.15±2.31	0.27
Zinc (mg)	8.88±3.00	11.38±4.88	0.06

E-DII: Energy Adjusted Dietary Inflammatory Index. ¹Mann-Whitney test;

294 Significant differences were observed in the average intake between the
 295 AD and PD groups for 11 dietary parameters: Energy, β -Carotene, Total fat,
 296 MUFA, SFA, trans fats, fiber, selenium and vitamins A, C and D.

297

298 *E-DII and Inflammatory Markers*

299 There were no statistically significant differences between the E-DII groups
 300 for any of the inflammatory markers (**Table 3**).

301

Table 3. Differences between anti (AD) and pro-inflammatory (PD) diet groups for inflammatory markers (mean±SD)

Inflammatory markers	AD: E-DII <0 n= 25	PD: E-DII≥0 n= 43	p ¹
IgG (mg/dL)	1161.88±203.02	1218.09±220.14	0.34
IgM (mg/dL)	135.08±44.93	141.47±59.39	0.88
IgA (mg/dL)	212.76±75.60	218.14±78.71	0.27
hs-CRP (mg/dL)	0.29±0.35	0.35±0.42	0.75
IL-10 (pg/mL) ¹	5.41±2.18	6.13±2.08	0.35
IL-12 (pg/mL) ²	1042.58±687.52	1007.59±412.42	0.80
IL-6 (pg/mL) ²	6.99±5.32	6.96±5.35	0.80
IL-1 β (pg/mL) ²	1.67±1.87	1.92±1.38	0.53
TNF- α (pg/mL) ²	7.41±5.26	14.73±34.27	0.47
MCP-1 (pg/mL) ²	244.30±148.35	296.22±143.36	0.39

¹ANCOVA: adjusted for water intake. ¹AD: n=16; PD: n= 23 ²AD: n=17; PD: n= 24; AD: Anti-inflammatory diet; PD: Pro-inflammatory diet

302 No significant correlation was observed between E-DII and CRP ($r = 0.047$;
 303 $p = 0.70$) and this result remained after controlling for age and BMI ($r = 0.090$; p
 304 $= 0.47$). There were also no significant correlations between E-DII and Ig A ($r = -$
 305 0.123 , $p = 0.319$), Ig M ($r = 0.041$, $p = 0.74$), Ig G ($r = 0.113$, $p = 0.36$) and any of
 306 the others cytokines (all $p > 0.05$).

307

308 *E-DII and Alpha diversity indices*

309 There were no significant differences between AD and PD groups for
 310 Shannon, Simpson, InvSimpson, Evenness and CHAO indices (all $p > 0.1$). (**Figure**
 311 **2A, 2B and 2C**).

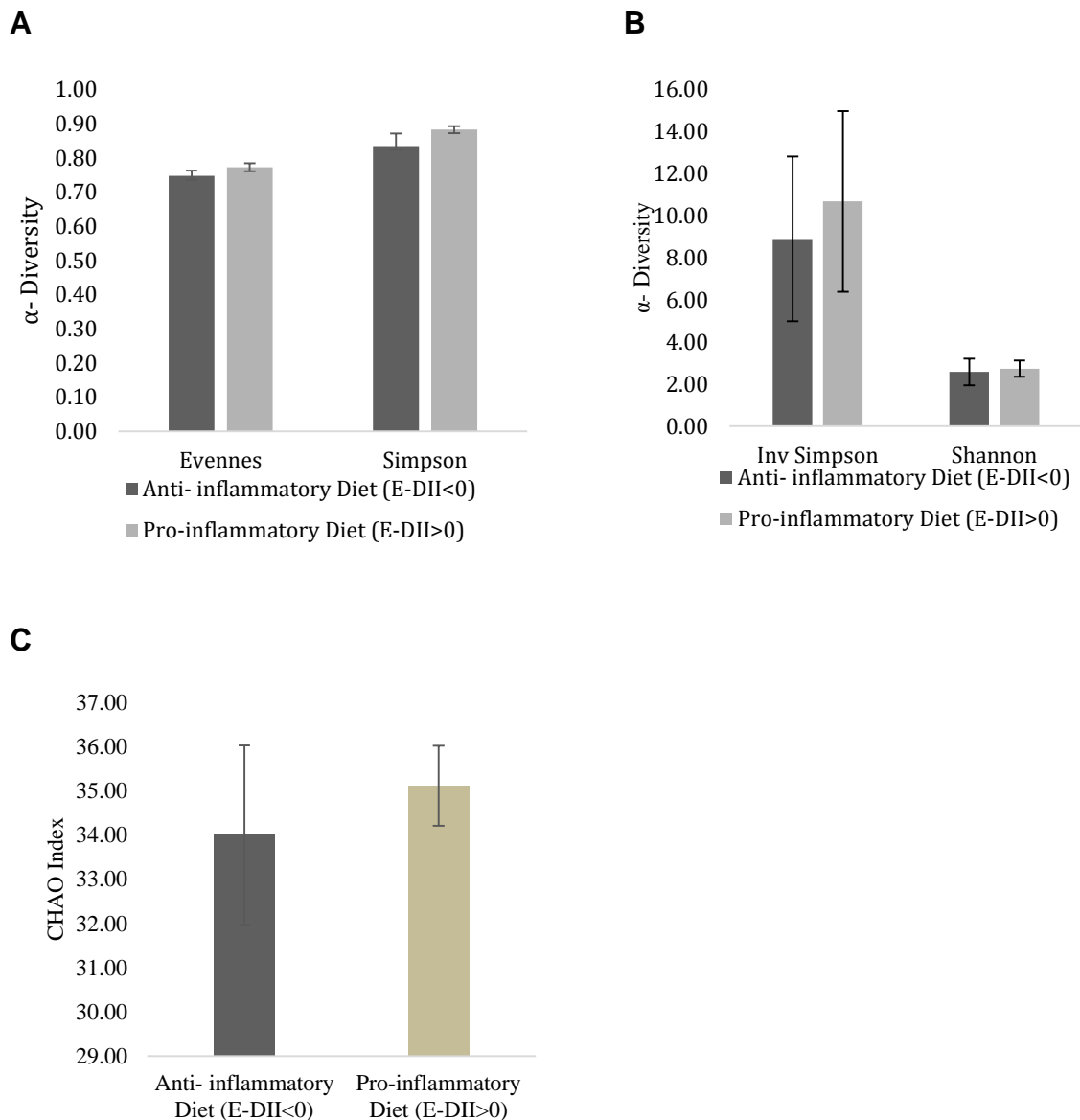


Figure 2. Differences between anti (AD) and pro-inflammatory (PD) diet groups for the α -diversity index (2A- Evenness, Simpson; 2B- Shannon, Inv Simpson) and the Richness index (2C- CHAO index). ANCOVA - adjusted by water intake. Bars represent adjusted mean and error bars represent adjusted standard error.

312 There were no significant correlations between the microbiota richness
 313 and diversity indexes and the E-DII (CHAO: $r = 0.133$, $p = 0.28$; Inv Simpson: $r =$
 314 0.042 , $p = 0.73$; Shannon: $r < 0.001$, $p = 1.00$; Simpson: $r = 0.056$, $p = 0.65$;
 315 Evenness: $r = 0.083$, $p = 0.50$).

316 *E-DII and Beta diversity index*

317

318 In total, 153 bacteria species were identified among the samples. Of these,
319 36 species presented $p < 5\%$ (corrected by FDR) and 6 differed in absolute
320 frequency between groups (*Desulfovibrio unclassified species*, *Butyrivibrio*
321 *unclassified species*, *Butyrivibrio crossotus*, *Bacteroides clarus*, *Bacteroides*
322 *coprophilus*, *Bacteroides intestinalis*) being considered differentially abundant for
323 presenting $p < 5\%$ and $\log_2\text{FoldChange} > 2$ by DEseq. **(Figure 3).**

324

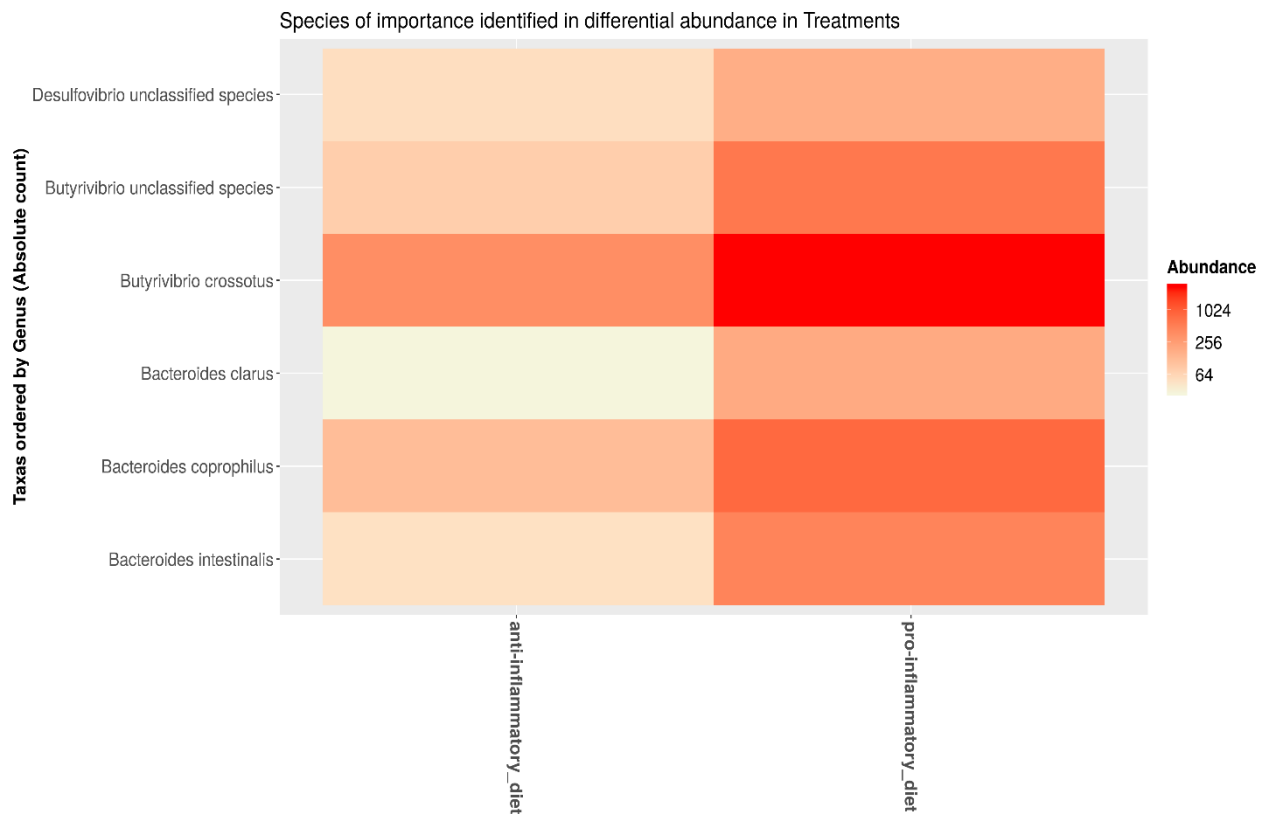


Figure 3. Heatmap with frequency of bacterial species identified as differentially abundant by DESeq2 ($\log_2\text{FoldChange} > \pm 2$).

325 The grouping profile of the samples by principal coordinates analysis
326 (PCoA) varied modestly between treatments. The observed variation can be
327 explained by the sum of the two main components, which results in 49.91%
328 **(Figure 4).**

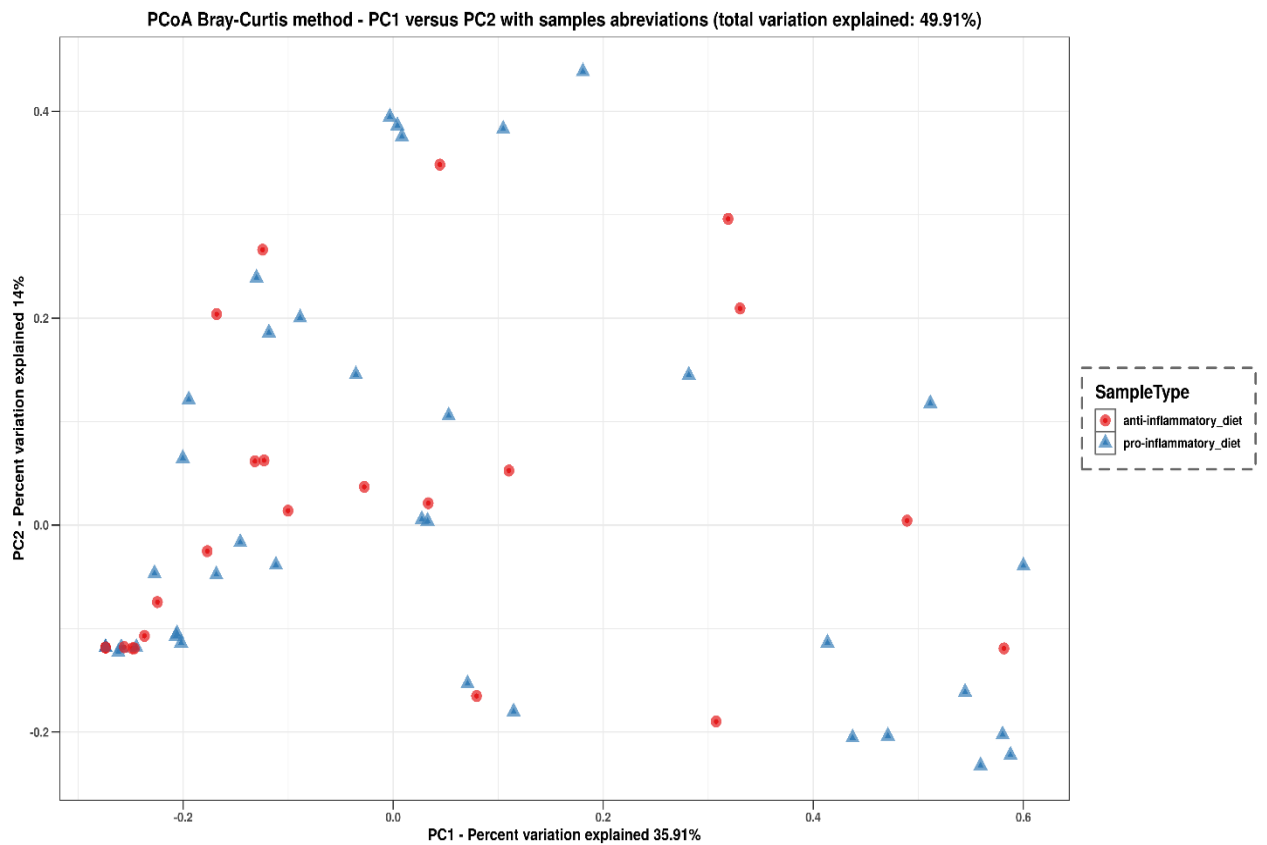


Figure 4. Principal Coordinate Analysis (PCoA) - Microbial community differences, as assessed by Bray-Curtis dissimilarity, between individuals with the most anti-inflammatory vs. pro-inflammatory diet, among all study subjects.

329 *E-DII and Relative percentual of gut microbiota abundance*

330 Analyses were also conducted to determine differences in percentual of

331 relative abundance of phylum and genus between AD and PD groups (**Table 4**).

Table 4. Differences between anti (AD) and pro-inflammatory (PD) diet groups in percentage of relative abundance of phylum and genus (mean±SD)

Bacterias (% Abundance)	AD: E-DII<0 n= 25	PD: E-DII≥0 n= 43	p¹
<i>Firmicutes</i>	34.97±16.53	33.20±14.09	0.19
<i>Blautia</i>	1.16±1.80	0.55±1.17	0.03
<i>Clostridium</i>	0.09±0.34	0.06±0.19	0.42
<i>Lactobacillus</i>	0.05±0.17	0.00±0.00	0.05
<i>Ruminococcus</i>	0.36±0.54	0.31±0.50	0.67
<i>Hungatella</i>	2.59±3.70	1.26±1.92	0.02
<i>Faecalibacterium</i>	3.06±2.45	3.09±2.41	0.92
<i>Lactococcus</i>	0.012±0.06	0.013±0.09	0.98
<i>Bacteroidetes</i>	54.33±22.02	59.67±18.37	0.17
<i>Bacteroides</i>	35.23±24.15	40.91±22.73	0.43
<i>Prevotella</i>	10.09±18.35	9.72±16.70	0.75
<i>Alistipes</i>	1.44±1.55	2.02±1.75	0.38
<i>Barnesiella</i>	0.68±1.02	0.65±2.02	0.74
<i>Actinobacteria</i>	0.10±0.26	0.12±0.27	0.92
<i>Bifidobacterium</i>	0.10±0.26	0.12±0.27	0.92
<i>Proteobacteria</i>	1.44±1.89	1.11±2.12	0.62
<i>Escherichia</i>	0.09±0.18	0.42±1.60	0.36
<i>Bilophila</i>	0.07±0.14	0.05±0.12	0.67
<i>Klebsiella</i>	0.00±0.00	0.04±0.25	0.58
<i>Verrumicrobia</i>	0.37±0.76	0.39±0.86	0.73
<i>Akkermansia</i>	0.29±0.67	0.39±0.86	0.87
<i>Spirochaetes</i>	0.07±0.37	0.00±0.00	0.19
<i>Fusobacteria</i>	0.02±0.07	0.08±0.37	0.54
<i>Firmicutes/Bacteroidetes</i>	0.89±1.00	0.72±0.60	0.11

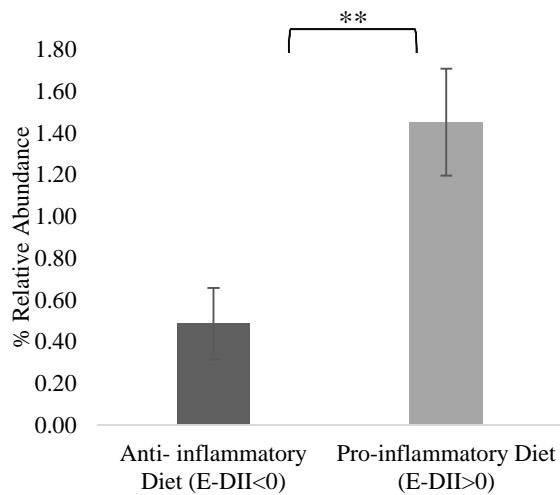
¹ANCOVA: adjusted for water intake

332 Bacteria belonging to eight phyla and 70 main genera were identified. The
333 most abundant phyla were *Bacteroidetes* (AD: 54.33 ± 22.02; PD: 59.67 ± 18.37)
334 and *Firmicutes* (AD: 34.97 ± 16.53; PD: 33.20 ± 14.90). There were no significant
335 differences for the percentage of relative abundance of any phylum between
336 groups. At the gender level, the percentage of relative abundance of *Blautia* and
337 *Hungatella* were significantly higher in the AD group (AD: 1.16 ± 1.80; PD: 0.55
338 ± 1.17; p = 0.03 and AD: 2.59 ± 3.70; PD: 1.26 ± 1.92; p = 0.02, respectively).
339 There was also a higher and marginally significant percentage of abundance of

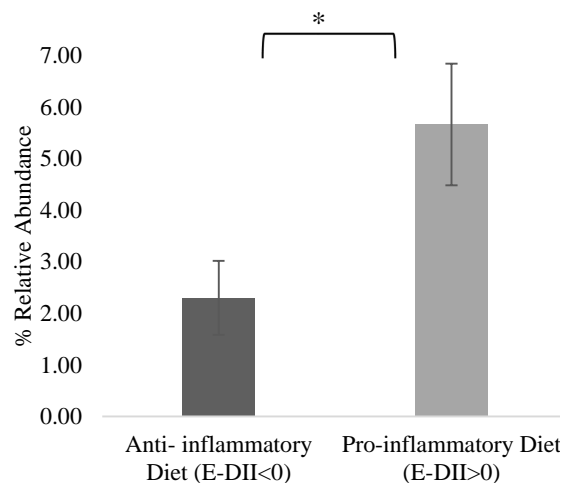
340 the genus *Lactobacillus* in the AD group (AD: 0.05 ± 0.17 ; PD: 0.00 ± 0.00 ; $p =$
 341 0.05).

342 At the species level, within the AD group there was a higher and significant
 343 percentage of relative abundance of the of *Blautia unclassified species* (AD: 0.71
 344 ± 0.21 and PD: 0.31 ± 0.08 ; $p = 0.009$), *Hungatella unclassified species* (AD: 2.58
 345 ± 0.74 and PD: 1.26 ± 0.29 ; $p = 0.02$). Within the PD group there was a greater
 346 abundance of *Bacteroides thetaiotaomicron* and of *Bacteroides unclassified*
 347 *species* (AD: 0.49 ± 0.17 and PD: 1.45 ± 0.26 ; $p = 0.006$ and AD: 2.30 ± 0.72 and
 348 PD: 5.66 ± 1.18 ; $p = 0.03$, respectively) (**Figure 5A, 5B, 5C e 5D**).

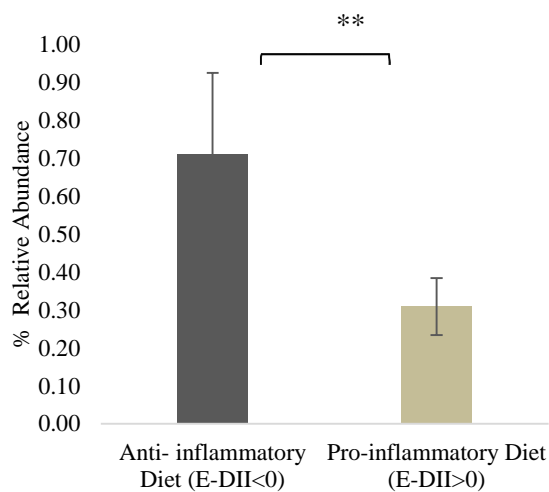
A *Bacteroides thetaiotaomicron*



B *Bacteroides unclassified species*



C *Blautia unclassified species*



D *Hungatella unclassified species*

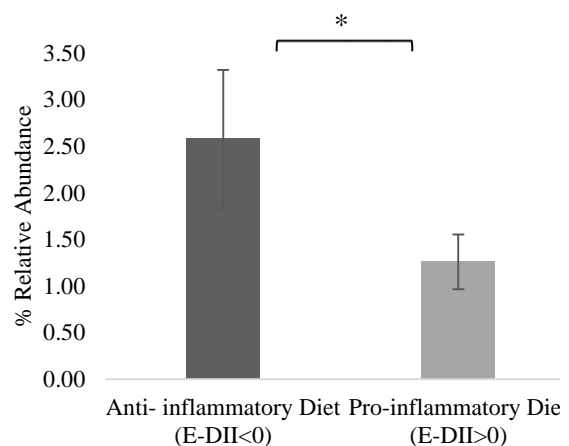


Figure 5. Differences between anti (AD) and pro-inflammatory (PD) diet groups of percentual relative abundance of *Bacteroides thetaiotaomicron* (4A), *Bacteroides unclassified species* (4B), *Blautia unclassified species* (4C),

Hungatella unclassified species (4D), according E-DII. * $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.01$. ANCOVA – Adjusted for Water Intake. Bars represent adjusted mean and error bars represent adjusted standard error.

349 The species *Bacteroides Xylanisolvens* and *Fusobacterium nucleatum*
350 also showed a statistically significant difference between the AD and PD groups
351 (data not shown). However, none of the participants in the PD group had these
352 bacteria and the presence of *Fusobacterium nucleatum* was verified in only two
353 individuals in the AD group (AD: 0.02 ± 0.01 and PD: 0.00; $p = 0.021$) and
354 *Bacteroides Xylanisolvens* was found in three individuals in the AD group (AD:
355 0.04 ± 0.02 and PD: 0.00; $p = 0.012$). Considering the total sample, although
356 statistically significant, this result has no clinical relevance due to the small
357 number of people who presented these species.

358 Additional correlation analyzes were performed between the E-DII and the
359 relative percentage of abundance for phylum, genus and species. At phylum
360 level, no significant correlations were observed with E-DII (*Firmicutes*: $r = -0.156$,
361 $p = 0.20$; *Bacteroidetes*: $r = 0.148$, $p = 0.23$; *Actinobacteria*: $r = 0.077$, $p = 0.53$;
362 *Proteobacteria*: $r = -0.048$, $p = 0.70$; *Verrucomicrobia*: $r = 0.032$, $p = 0.79$;
363 *Spirochaetes*: $r = -0.146$, $p = 0.23$; *Fusobacteria*: $r = -0.103$, $p = 0.40$). However, for
364 genus, *Hungatella* presented a significant inverse correlation with E-DII ($r = -$
365 0.369 ; $p = 0.002$).

366 There was also an inverse correlation between E-DII and *Hungatella*
367 *unclassified species* ($r = -0.369$; $p = 0.002$) and *Bacteroides fragilis* ($r = -0.061$; p
368 $= 0.62$). In contrast, a positive correlation was observed between E-DII and
369 *Bacteroides tetaoitamicron* ($r = 0.321$; $p = 0.008$) and *Bacteroides caccae* ($r =$
370 0.252 ; $p = 0.04$).

371 A linear regression model showed that 9.4% of the variation observed in
372 the abundance of *Hungatella unclassified species* was explained by the E-DII (F
373 (1,66) = 6.858; $\beta = -0.307$; $p = 0.01$). For *Bacteroides fragilis*, 5.7% of the
374 variation observed was explained by the E-DII (F (1,66) = 4.014; $\beta = -0.239$; $p =$
375 0.049). There was no statistical significance in the regression models for species
376 *Bacteroides caccae* ($r^2 = 0.014$; F (1,66) = 0.937; $\beta = 0.118$; $p = 0.337$) and
377 *Bacteroides tetaoitamicron* ($r^2 = 0.041$; F (1,66) = 2.851; $\beta = 0.203$; $p = 0.096$).
378 When controlling the model by water intake, sex, BMI, alcohol intake and age,
379 only the *Hungatella unclassified species* remained significant and 19.9% of the

380 variation observed was explained by the E-DII ($F(1,66) = 2.528$; $\beta = -0.370$; $p =$
381 0.03).

382

383 Discussion

384

385 In the present study, we observed that the E-DII was inversely correlated
386 with *Hungatella unclassified species* and *Bacteroides fragillis* and positively
387 correlated with *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Bacteroides caccae*. In
388 addition, individuals with the most anti-inflammatory diet had a higher percentage
389 relative abundance of the genera *Blautia* and *Hungatella* and a tendency to
390 increase the genera *Lactobacillus*. In contrast, the pro-inflammatory diet was
391 associated with greater abundance of species *Desulfovibrio unclassified species*,
392 *Butyrivibrio unclassified species*, *Butyrivibrio crossotus*, *Bacteroides clarus*,
393 *Bacteroides coprophilus* and *Bacteroides intestinalis* and percentage relative
394 abundance *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Bacteroides unclassified species*.

395 An inverse correlation between E-DII and *Hungatella unclassified*
396 *species* and *Bacteroides fragillis* indicates that a more anti-inflammatory diet
397 increases the abundance of these species. When characterizing the gut
398 microbiota of individuals with FC after fecal microbiota transplantation, one study
399 observed a change in the composition of the recipient's fecal microbiota to a
400 composition similar to the gut microbiota of the donor without FC. This change in
401 the composition of the recipient's intestinal microbiota was characterized
402 particularly by a significant increase in the abundance of *Hungatella hathewayi*
403 and *Bacteroides fragillis*, one month after transplantation⁽²⁶⁾. In our study, a more
404 anti-inflammatory diet was associated with a greater abundance of these species
405 in the gut microbiota. Since these bacteria appear to be a characteristic of the gut
406 microbiota of individuals without FC and can produce short-chain fatty acids
407 (SCFA), it may be that an increase in the abundance of these bacteria, by a diet
408 with more anti-inflammatory action, may be beneficial.

409 These species belong to the phyla *Firmicutes* and *Bacteroidetes*,
410 respectively, which are the most abundant in the intestinal microbiota in humans
411⁽²⁷⁾. The bacteria in these phyla have genes related to the metabolism of non-
412 digestible polysaccharides, such as fibers, which result in SCFA that stimulate
413 colonic motility by inducing the release of serotonin and neurotransmitters⁽²⁸⁾. In

414 our study, the group with the most anti-inflammatory diet (E-DII<0) had a higher
415 fiber intake when compared to the group with the most pro-inflammatory diet (E-
416 DII≥0). Therefore, this could be one of the reasons for the increase of these
417 species in the AD group.

418 Enterotypes of *Bacteroides* are resistant to bile acids and grow in the
419 presence of bile and fat ^(29,30). For example, *Bacteroides thetaiotaomicron* and
420 *Bacteroides coprophilus* act in the biotransformation of primary bile acids, which
421 are released in the intestine with the presence of dietary fat ^(31,32). This may
422 explain the increase in *Bacteroides* species (*Bacteroides intestinalis*, *Bacteroides*
423 *caccae*, *Bacteroides clarus*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides*
424 *coprophilus*) in the PD group in our study, since this group had a higher intake of
425 total fat, SFA, trans fat and MUFA. The same was observed in a randomized
426 clinical trial conducted with 217 healthy adults showed that consumption of a high
427 fat diet (40%) increased the abundance of *Bacteroides* ⁽³³⁾.

428 In addition, another reason that may explain the greater abundance of
429 *Bacteroides intestinalis* in the PD group may be the presence/absence of inulin-
430 type fructans found in fruits, garlic and onions. Some bacterial species are
431 stimulated in the presence of inulin, such as Bifidobacteria and Lactobacillus,
432 others are not affected and others are inhibited⁽³⁴⁾. A more anti-inflammatory diet
433 is usually characterized by a greater intake of sources of inulin. In our study,
434 individuals in the AD group had a higher consumption of garlic and onion.
435 Although this difference was not significant, it may have contributed to the
436 inhibition of this species in the AD group and a greater abundance in the PD
437 group. The same was observed in a study with obese women, a reduction in
438 *Bacteroides intestinalis* was also demonstrated in the group supplemented with
439 fructan prebiotics of the inulin type ⁽³⁵⁾.

440 *Bacteroides caccae* has also been associated as a biomarker of
441 Inflammatory Bowel Disease (IBD) due to the production of the OmpW protein by
442 this species ⁽³⁶⁾. This protein was identified as the target of immune response
443 associated with IBD. The same was observed in other study for *Bacteroides*
444 *clarus* by evaluating the composition of the intestinal microbiota in stool samples
445 from children with Chron's disease. The authors found a significant abundance of
446 this species ⁽³⁷⁾. In our study, individuals who had a more pro-inflammatory diet
447 appeared to have a greater abundance of *Bacteroides caccae* and *Bacteroides*

448 *clarus*, indicating that this type of diet can potentially induce an inflammatory
449 response in these individuals and contribute to the development or progression
450 of intestinal diseases.

451 In our study, there was also a higher abundance of *Butyrivibrio unclassified*
452 *species* and *Butyrivibrio crossotus* in the PD group. These bacteria belong to the
453 genus *Butyrivibrio* and are members of the *Lachnospiraceae family*. In a study
454 with individuals with FC, it was identified a greater abundance of *Unclassified*
455 *member of Lachnospiraceae* in these individuals ⁽³⁸⁾. A recent review has shown
456 that although members of the *Lachnospiraceae family* are metabolizers of non-
457 digestible carbohydrates and produce SCFA, they are also increased in
458 individuals with intra and extra intestinal diseases, including IBD⁽³⁹⁾. Therefore, a
459 more pro-inflammatory diet may provide increased levels of *Butyrivibrio*
460 *unclassified species* and *Butyrivibrio crossotus* and be related to the presence of
461 FC.

462 The genus *Blautia* also belongs to the *Lachnospiraceae family* and
463 generally has its abundance reduced in situations such as IBD ^(40,41) and rectal
464 colon cancer ⁽⁴²⁾. Species of this genus are associated with the control of the
465 inflammatory process mediated by SCFA and with the maturation of the immune
466 system (mainly acetate) ⁽³⁹⁾. This is because *Blautia* metabolizes non-digestible
467 carbohydrates to produce compounds that control inflammation (SCFA)⁽⁴³⁾.
468 Studies demonstrated, in healthy individuals, that consumption of barley, brown
469 rice or a mixture of them increased the abundance of the genus *Blautia* in fecal
470 samples ⁽⁴⁴⁾ and that the low-fat diet was associated with increased abundance
471 of that genus ⁽⁴⁵⁾. Thus, we can assume that individuals with a more anti-
472 inflammatory diet had a greater abundance of bacteria of the genus *Blautia*, due
473 to the higher fiber content and lower fat content, which contributes to intestinal
474 health.

475 On the other hand, *Desulfovibrio species* have been correlated with
476 ulcerative colitis ⁽⁴⁶⁾. Rowan et al. ⁽⁴⁷⁾ observed an increase in the abundance of
477 *Desulfovibrio* in the colonic mucosa of patients with acute and chronic ulcerative
478 colitis, when compared to healthy controls. The genus *Desulfovibrio* belongs to
479 the phylum *Proteobacteria* and it was demonstrated in a randomized study with
480 overweight and obese adult individuals that the consumption of a diet rich in
481 saturated fat increased the abundance of *Proteobacteria* and this increase was

482 attributed mainly to the family *Desulfovibrionaceae* ⁽⁴⁸⁾. Therefore, the higher
483 consumption of saturated fat in the group of the most pro-inflammatory diet (E-
484 DII \geq 0) may have contributed to the growth of *Desulfovibrio*.

485 This increase can be harmful to intestinal health since the genus
486 *Desulfovibrio* comprises bacteria that produce intestinal sulfate such as hydrogen
487 sulfide (H₂S). H₂S has a pro-inflammatory characteristic, as it inhibits mucin
488 synthesis and the use of butyrate, increasing the intestinal permeability, being
489 one of the main factors that contribute to the development of inflammatory bowel
490 diseases ⁽⁴⁶⁾.

491 In addition to the macronutrients discussed above, micronutrients such as
492 vitamins A, C, D and E, Beta-Carotene, Selenium and Zinc may have had an
493 influence on the modulation of the intestinal microbiota. Individuals in the AD
494 group had a higher intake of selenium and vitamins A, C and D. A review pointed
495 out the immunomodulatory role of these micronutrients in individuals with IBD⁽⁴⁹⁾.
496 This study also reported that Vitamin D has an important role in the intestinal
497 barrier, suppressing bacterial invasion and influencing the immune response.

498 Considering that intestinal constipation is also characterized by dysbiosis,
499 it can be assumed that the higher consumption of Selenium, β -Carotene and
500 vitamins A, C and D in the AD group (E-DI <0) found in our study may contribute
501 for the improvement of dysbiosis and for the modulation of the inflammatory
502 response in these individuals.

503 Contrary to our expectations, we did not observe significant differences
504 between the AD and PD groups for inflammation markers. However, as shown in
505 Table 3, differences in the AD and PD were in the expected direction. Similarly,
506 Zheng et al (11) also did not find an association between E-DII and diversity of
507 gut microbiota and inflammatory markers.

508 Among the strengths of this study, we can highlight its originality; this was
509 the first study to evaluate the effect of the dietary inflammatory potential, as
510 measured by E-DII, on the composition of the intestinal microbiota in individuals
511 with FC. Moreover, we used a sophisticated sequencing method for the analysis
512 of fecal microbiota and four food inquiries to assess DII, while most studies
513 usually use only one food record or one 24-HR. However, a limitation of the study
514 is the lack of assessment of the level of psychological stress.

515 The results of this study indicate that the inflammatory potential of the diet
516 is associated with the gut microbiota in individuals with FC. Moreover, the
517 differences in the relative abundance of various FC related bacterial strains
518 between the AD and PD groups might be associated with the average
519 consumption of components that characterize an anti-inflammatory diet vs. a pro-
520 inflammatory diet. However, it is important to note that these findings may not be
521 generalizable to other groups such as children, adolescents and pregnant or older
522 subjects and other ethnic groups with different characteristics, habits or culture.

523 **Financial support**

We thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES) for the scholarship (LMC).

524

525 **Author Contributions**

526 The authors' responsibilities were as follows – Designed research: PBB,
527 LMC; conducted research: LMC, ACO, PBB; Provided essential reagents or
528 provided essential materials: KGM, NS, JRH, THMC; Analyzed data or
529 performed statistical analysis: LMC, MMM, PBB, THMC; Wrote paper: LMC,
530 PBB; Had primary responsibility for final content: LMC, PBB. The authors had
531 no conflicts of interest to disclose.

532

533 **Conflict of Interest**

534 None conflict of interest.

References

1. Sobrado CW, Neto IJFC, Pinto RA, Sobrado LF, Nahas SC, Cecconello I. Diagnosis and treatment of constipation: a clinical update based on the Rome IV criteria. *J Coloproctology. Sociedade Brasileira de Coloproctologia*; 2018;38:137–44. doi:10.1016/j.jcol.2018.02.003
2. Ohkusa T, Koido S, Nishikawa Y, Sato N. Gut Microbiota and Chronic Constipation: A Review and Update. *Front Med*. 2019;6:1–9.
3. Khalif IL, Quigley EMM, Konovitch EA, Maximova ID. Alterations in the colonic flora and intestinal permeability and evidence of immune activation in chronic constipation. *Dig Liver Dis*. 2005;37:838–49.
4. Zhu L, Liu W, Alkhouri R, Baker RD, Bard JE, Quigley EM, Baker SS. Structural changes in the gut microbiome of constipated patients. *Physiol Genomics*. 2014;46:679–86.
5. Albenberg LG, Wu GD. Diet and the intestinal microbiome: Associations, functions, and implications for health and disease. *Gastroenterology*. Elsevier, Inc; 2014;146:1564–72. doi: 10.1053/j.gastro.2014.01.058
6. Kedia S, Rampal R, Paul J, Ahuja V. Gut microbiome diversity in acute infective and chronic inflammatory gastrointestinal diseases in North India. *J Gastroenterol*. Springer Japan; 2016;51:660–71.
7. Shivappa N, Steck SE, Hurley TG, Hussey JR HJ. Dietary Inflammatory Index. *Public Health Nutr*. 2014;17:1689–96.
8. Shivappa N, Hebert JR, Rietzschel ER, De Buyzere ML, Langlois M, Debruyne E, Marcos A, Huybrechts I. Associations between dietary inflammatory index and inflammatory markers in the Asklepios Study. *Br J Nutr*. England; 2015;113:665–71.
9. Mtintsilana A, Micklesfield LK, Chorell E, Olsson T, Shivappa N, Hebert JR, Kengne AP, Goedecke JH. Adiposity mediates the association between the dietary inflammatory index and markers of type 2 diabetes risk in middle-aged black South African women. *Nutrients*. 2019;11.
10. Shivappa N, Wirth MD, Murphy EA, Hurley TG, Hébert JR, N. S, M.D. W, E.A. M, T.G. H, J.R. H. Association between the Dietary Inflammatory Index (DII) and urinary enterolignans and C-reactive protein from the National Health and Nutrition Examination Survey-2003–2008. *Eur J Nutr*. N. Shivappa, College of Nursing, University of South Carolina, 915 Greene Street, Suite 200, Columbia,

- SC, United States: Springer; 2019;58:797–805.
11. Zheng J, Hoffman KL, Chen JS, Shivappa N, Sood A, Browman GJ, Dirba DD, Hanash S, Wei P, Hebert JR, et al. Dietary inflammatory potential in relation to the gut microbiome: Results from a cross-sectional study. *Br J Nutr.* 2020;
 12. von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP; STROBE Initiative. The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *J Clin Epidemiol* 2008;61:344–9.
 13. Tack J, Drossman DA. What's new in Rome IV? *Neurogastroenterol Motil.* 2017;29:151–63.
 14. Ipaq. Guidelines for Data Processing and Analysis of the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) – Short and Long Forms. Ipaq. 2005;1–15.
 15. Timothy G. Lohman AFR. Anthropometric Standardization Reference Manual. Martore R, editor. Champaign, IL: Human Kinetics Books; 1988.
 16. World Health Organization. 1995. Internet: <https://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/nutrition/a-healthy-lifestyle/body-mass-index-bmi>
 17. Ana Beatriz V. Pinheiro, Elisa Maria de A.Lacerda, Esther Hain Benzecry MC da SG. Tabela para Avaliação do Consumo Alimentar em Medidas Caseiras. 4°. Atheneu.
 18. IBGE IB de G e E. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: Tabela de Medidas Referidas para os Alimentos Consumidos no Brasil. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. 2011. 1–63 p. Internet: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv81830.pdf>
 19. Hébert JR, Shivappa N, Wirth MD, Hussey JR, Hurley TG. Perspective: The Dietary Inflammatory Index (DII) - Lessons Learned, Improvements Made, and Future Directions. *Adv Nutr.* Oxford University Press; 2019;10:185–95.
 20. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990;215:403–10.
 21. Christoff AP, Cruz GNF, Sereia AFR, EikoYamanaka L, Silveira PP, Oliveira LFV. End-to-end assessment of fecal bacteriome analysis: from sample processing to DNA sequencing and bioinformatics results. *bioRxiv.* 2019;646349.
 22. R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.

23. McMurdie PJ, Holmes S. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One*. 2013;8.
24. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15:1–21.
25. Siniscalchi LAB, Vale ICC, Antunes JD, Chernicharo CA de L, Araújo JC de. Enriquecimento de microrganismos metanotróficos a partir de lodo de reator UASB tratando esgotos domésticos. *Eng Sanit e Ambient*. 2016;21:109–22.
26. Ohara T. Identification of the microbial diversity after fecal microbiota transplantation therapy for chronic intractable constipation using 16s rRNA amplicon sequencing. *PLoS One*. 2019;14:1–12.
27. Walker AW, Lawley TD. Therapeutic modulation of intestinal dysbiosis. *Pharmacol Res*. doi:10.1016/j.phrs.2012.09.008
28. Cao H, Liu X, An Y, Zhou G, Liu Y, Xu M, Dong W, Wang S, Yan F, Jiang K, et al. Dysbiosis contributes to chronic constipation development via regulation of serotonin transporter in the intestine. *Sci Rep*. Springer US; 2017;7:1–12. doi: 10.1038/s41598-017-10835-8
29. Tan H, Zhai Q, Chen W. Investigations of *Bacteroides* spp. towards next-generation probiotics. *Food Res Int*. Elsevier Ltd; 2019;116:637–44. doi: 10.1016/j.foodres.2018.08.088
30. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011;473(7346):174–80.
31. Lynch A, Tammireddy SR, Doherty MK, Whitfield PD, Clarke DJ. The glycine lipids of *Bacteroides thetaiotaomicron* are important for fitness during growth in vivo and in vitro. *Appl Environ Microbiol*. 2019;85:1–14.
32. Christopher Staley, Alexa R. Weingarden AK and MJS. Interaction of Gut Microbiota with Bile Acid Metabolism and its Influence on Disease States. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2017;
33. Wan Y, Wang F, Yuan J, Li J, Jiang D, Zhang J, et al. Effects of dietary fat on gut microbiota and faecal metabolites, and their relationship with cardiometabolic risk factors: a 6-month randomised controlled-feeding trial. *Gut* 2019;68(8):1417–29
34. Pimentel TC, Garcia S, Prudencio SH. De Frutanos Tipo Inulina. 2012;103–18.
35. Dewulf EM, Cani PD, Claus SP, Fuentes S, Puylaert PGB, Neyrinck AM, Bindels LB, De Vos WM, Gibson GR, Thissen JP, et al. Insight into the prebiotic concept:

- Lessons from an exploratory, double blind intervention study with inulin-type fructans in obese women. *Gut*. 2013;62:1112–21.
36. Bo W, Darnisha D, Lynn KG, Carol L, David B, Stephan RT, Jonathan B. Molecular Cloning of a *Bacteroides caccae* TonB-Linked Outer Membrane Protein Identified by an Inflammatory Bowel Disease Marker Antibody. *Infection and Immunity*
 37. El Mouzan MI, Winter HS, Assiri AA, Korolev KS, Al Sarkhy AA, Dowd SE, Al Mofarreh MA, Menon R. Microbiota profile in new-onset pediatric Crohn's disease: Data from a non-Western population. *Gut Pathog. BioMed Central*; 2018;10:1–10. doi: 10.1186/s13099-018-0276-3
 38. Mancabelli L, Milani C, Lugli GA, Turrone F, Mangifesta M, Viappiani A, Ticinesi A, Nouvenne A, Meschi T, Van Sinderen D, et al. Unveiling the gut microbiota composition and functionality associated with constipation through metagenomic analyses. *Sci Rep. Springer US*; 2017;7:1–9. doi: 10.1038/s41598-017-10663-w
 39. Vacca M, Celano G, Calabrese FM, Portincasa P, Gobbetti M, De Angelis M. The controversial role of human gut lachnospiraceae. *Microorganisms*. 2020;8:1–25.
 40. Frank DN, Amand ALS, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Pnas*. 2007;104:13780–5. doi: 10.1073_pnas.0706625104
 41. Gevers D, Kugathasan S, Denson LA, Vázquez-Baeza Y, Van Treuren W, Ren B, Schwager E, Knights D, Song SJ, Yassour M, et al. The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe*. 2014;15:382–92.
 42. Chen W, Liu F, Ling Z, Tong X, Xiang C. Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. *PLoS One*. 2012;7.
 43. Nilsson A, Granfeldt Y, Östman E, Preston T, Björck I. Effects of GI and content of indigestible carbohydrates of cereal-based evening meals on glucose tolerance at a subsequent standardised breakfast. *Eur J Clin Nutr*. 2006;60:1092–9.
 44. Martínez I, Lattimer JM, Hubach KL, Case JA, Yang J, Weber CG, Louk JA, Rose DJ, Kyureghian G, Peterson DA, et al. Gut microbiome composition is

- linked to whole grain-induced immunological improvements. *ISME J.* 2013;7:269–80.
45. Wan Y, Wang F, Yuan J, Li J, Jiang D, Zhang J, Li H, Wang R, Tang J, Huang T, et al. Effects of dietary fat on gut microbiota and faecal metabolites, and their relationship with cardiometabolic risk factors: a 6-month randomised controlled-feeding trial. *Gut.* 2019;68:1417–29.
 46. Kushkevych I, Dordević D, Vítězová M, Kollár P. Cross-correlation analysis of the *Desulfovibrio* growth parameters of intestinal species isolated from people with colitis. *Biologia (Bratisl).* 2018;73:1137–43.
 47. Rowan F, Docherty NG, Murphy M, Murphy B, Coffey JC, O’Connell PR. *Desulfovibrio* Bacterial Species Are Increased in Ulcerative Colitis. *Dis Colon Rectum.* 2010;53:1530–6.
 48. Jian C, Luukkonen P, Sädevirta S, Yki-Järvinen H, Salonen A. Impact of short-term overfeeding of saturated or unsaturated fat or sugars on the gut microbiota in relation to liver fat in obese and overweight adults. *Clin Nutr* 2020;(May):1–10.
 49. Aleksandrova K, Romero-Mosquera B, Hernandez V. Diet, gut microbiome and epigenetics: Emerging links with inflammatory bowel diseases and prospects for management and prevention. *Nutrients* 2017;9(9):1–13.

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), em uma pesquisa. Meu nome é Patrícia Borges Botelho, sou nutricionista e Professora na Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Goiás. Após ler com atenção este documento você será esclarecido (a) sobre as informações a seguir. No caso de aceitar fazer parte do estudo, assine todas as folhas e ao final deste documento, que está em duas vias. Este documento também será assinado por mim. Uma das vias é sua e a outra é minha. Em caso de recusa ou de desistência, você não será penalizado (a) de forma alguma.

Em caso de dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato a cobrar comigo: Patrícia Borges Botelho (62) 98136-7786. Endereço: Rua 227 Qd. 68 s/nº - Setor Leste Universitário - Goiânia - Goiás - Brasil - CEP: 74.605-08. Em caso de dúvidas sobre os seus direitos como participante nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, situado na 1ª Avenida, s/n - Setor Leste Universitário, CEP 74605-020, Goiânia – Goiás. Contato: (62) 3269-8497.

INFORMAÇÕES IMPORTANTES QUE VOCÊ PRECISA SABER SOBRE A PESQUISA:

Título do projeto: Efeito dos probióticos sobre a saúde intestinal em adultos e idosos saudáveis: influência do tipo de cepa, dose e forma de administração.

Probióticos são produtos contendo micróbios considerados benéficos para o seu organismo, pois ajudam a proteger o nosso corpo de outras bactérias, vírus e fungos que causam diarreia e outras infecções.

O objetivo desse estudo será avaliar o efeito do uso do probiótico sobre a saúde intestinal e escolher qual o tipo de probiótico mais indicado para isso entre 6 opções.

Você será informado de cada passo do estudo, que são:

1 – Consulta inicial: Neste momento, você será informado de todas as etapas do estudo e em caso de aceitar participar do estudo dará o seu livre consentimento. Durante o estudo você não poderá consumir suplementos, leite fermentado e iogurtes.

2 – Segunda consulta: Coleta de dados socioeconômicos e estilo de vida: Entrevista que ocorrerá na Clínica escola da FANUT-UFG, por aproximadamente 20 minutos. São informações sobre dados pessoais, renda da família, histórias de doenças na família e outras perguntas sobre estilo de vida. Você tem direito de não responder as perguntas que possam trazer constrangimentos de qualquer natureza.

- Avaliação do consumo alimentar: Será realizado também o recordatório de 24h em que você relatará todos os alimentos consumidos durante o dia anterior, bem como as quantidades e horários das refeições. Com isso, poderemos conhecer um pouco

mais sobre sua alimentação.

- Questionário sobre saúde intestinal e entrega de um caderno que será seu diário, onde você anotará tudo o que sentiu durante o tratamento, a frequência e a consistência de suas fezes.

- Coleta de sangue e de fezes: Você deverá ficar em jejum por 12h e serão coletados cerca de 10 mL de sangue.

- Neste momento, você deve entregar também o frasco contendo as fezes. A coleta é feita evacuando sobre plástico limpo e seco, evitando o contato com água ou urina. Transferir uma parte do material para o frasco de coleta. É importante que esta coleta das fezes seja realizada no dia da entrega ou na noite anterior. Nesse caso o frasco pode ser guardado na geladeira para ser entregue na manhã seguinte. Após todos os procedimentos, será servido um lanche.

- Entrega dos produtos: Você receberá 30 sachês ou cápsulas contendo o probiótico ou placebo os quais deverá ingerir diariamente durante os 30 dias, em jejum à noite, antes de dormir com 100ml de água. Durante este período, pedimos que mantenha os hábitos alimentares apresentados no início do estudo.

- Serão entregues 3 formulários de Registro Alimentar os quais você deverá preencher 3 dias antes de retornar à Clínica Escola.

3 - Terceira consulta: Após 30 dias, você deverá retornar a Clínica Escola FANUT/UFG e serão realizados os mesmos procedimentos da segunda consulta.

4- Quarta consulta- Ao final do estudo será agendado uma última consulta em que você receberá os resultados dos seus exames e orientações nutricionais.

DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados desta pesquisa serão divulgados das seguintes maneiras:

- Retorno dos resultados dos exames de sangue e da avaliação nutricional aos pacientes por meio de consultas individuais.

- Publicação em artigos científicos de revistas internacionais e nacionais;

- Divulgação da dissertação de mestrado no site do Mestrado em Nutrição e Saúde da UFG. No entanto, todas as informações coletadas nesse estudo são confidenciais e somente os pesquisadores terão acesso aos dados e os mesmos serão divulgados de forma conjunta, sem citar nomes dos participantes.

DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS

Sua participação será limitada a responder o questionário, preencher o recordatório de 24h e se submeter à coleta de sangue.

Os riscos potenciais esperados são: desconforto da coleta de sangue (inchaço e rubor), um possível constrangimento durante a entrevista, extravio de material e quebra de sigilo, os quais serão minimizados pelos pesquisadores que codificarão e acompanharão todas as amostras desde a coleta até o término das análises, certificando-se do correto procedimento de descarte. As coletas de sangue, entrevistas e avaliação nutricional serão realizadas por profissionais treinados. Mas como foi dito anteriormente, você pode se recusar a responder qualquer uma das perguntas ou desistir de participar do estudo em qualquer etapa sem que isto lhe traga qualquer prejuízo. Não foram identificados riscos em pacientes submetidos ao

consumo controlado de probióticos em pesquisas anteriores.

BENEFÍCIOS QUE PODERÃO SER OBTIDOS

Uma vez que a composição da flora intestinal influencia a nossa saúde geral, o uso de probióticos pode ser utilizado por indivíduos saudáveis para manter o estado de saúde e reduzir o risco de doenças.

ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE A GARANTIA DO PARTICIPANTE DA PESQUISA

- 1- Todos os participantes terão acesso, a qualquer momento, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer eventuais dúvidas;
- 2- Os dados coletados nesta pesquisa e o material biológico servirão apenas para análises deste estudo e não serão utilizados para outros fins. Após as análises laboratoriais, todo o material será descartado conforme a natureza do mesmo.
- 3- Os recordatórios alimentares de 24h e questionários serão picotados e descartados após cinco anos.
- 4- Os participantes também terão liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto lhe cause nenhum prejuízo.
- 5- Todos os resultados obtidos serão confidenciais, sigilosos e privativos. Também é garantido o acesso irrestrito dos voluntários aos resultados do estudo, tendo eles a opção de tomar ou não conhecimento dessas informações.
- 6- Dados individuais, resultados de exames somente serão acessíveis aos pesquisadores envolvidos e não será permitido o acesso de terceiros, garantindo o sigilo das informações adquiridas.
- 7- Você tem o direito de pleitear indenização em caso de se sentir prejudicado em decorrência de sua participação na pesquisa e receberá ressarcimento das despesas com transporte.
- 8- Todos os voluntários estarão protegidos contra qualquer tipo de discriminação e/ou estigmatização, individual ou coletiva, uma vez que todos os resultados serão confidenciais.

Nome e assinatura do pesquisador:

**CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO
PESSOA COMO PARTICIPANTE DA
PESQUISA**

DA

Eu, _____, RG/CPF/nº de prontuário/ nº de matrícula _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo “Efeito dos probióticos sobre a saúde intestinal em adultos e idosos saudáveis: influência do tipo de cepa, dose e forma de administração”, como participante. Fui devidamente informado e esclarecido pela pesquisadora Patrícia Borges Botelho sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção do meu acompanhamento.

Local e data _____

Nome e Assinatura do participante ou responsável:

Assinatura Dactiloscópica:



Nome e assinatura do Pesquisador Responsável

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimento sobre a pesquisa e aceite do participante.

Testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: _____ Assinatura: _____

Nome: _____ Assinatura: _____

APÊNDICE B - Critérios de Roma IV

Nome: _____ Ordem: _____

Dia: ___/___/___

CRITÉRIOS DE ROMA IV

Responda a essas perguntas sobre como funciona o seu intestino no último mês.

- 1) Realizou esforço excessivo para fazer cocô em pelo menos uma de cada quatro vezes que você fez?

Sim () Não ()

- 2) Em pelo menos uma de cada quatro vezes que você fez cocô apresentou fezes endurecidas ou ressecadas (Tipos 1 e 2 Bristol)?

Sim () Não ()

- 3) Apresentou sensação de defecação incompleta em pelo menos uma de cada quatro vezes que você fez cocô?

Sim () Não ()

- 4) Sensação de bloqueio ou obstrução anorretal pelo menos em uma a cada quatro vezes que você fez cocô?

Sim () Não ()

- 5) Realizou manobra manual em pelo menos uma de cada quatro vezes que você fez cocô?

Sim () Não ()

- 6) Com que frequência você fez cocô?

Menos de 3 vezes por semana ()

Menos de uma vez por semana ()

Uma vez por semana ()

Menos que três vezes por semana? () Mais que quatro vezes por semana ()

- 7) Você eventualmente apresentou fezes líquidas? Sim () Não () Raramente

APÊNDICE C – Questionário com Critérios de Inclusão e Exclusão

Data: ____ / ____ / ____

1. Qual é o seu nome completo?
2. Qual a sua idade?
2. Nos últimos 3 meses, em pelo menos uma de cada 4 vezes que você fez cocô precisou fazer esforço?
3. Nos últimos 3 meses, em pelo menos uma de cada 4 vezes que você fez cocô apresentou fezes endurecidas ou fragmentadas?
4. Nos últimos 3 meses, em pelo menos uma de cada 4 vezes que você fez cocô teve sensação de não ter terminado completamente?
5. Nos últimos 3 meses, em pelo menos uma de cada 4 vezes que você fez cocô teve sensação de bloqueio das fezes ou obstrução anal?
6. Nos últimos 3 meses, em pelo menos uma de cada 4 vezes que você fez cocô precisou fazer manobra manual ou digital para facilitar a saída das fezes?
7. Com que frequência você faz cocô?
8. Você sente dor abdominal enquanto faz cocô?
9. Consumiu algum desses produtos relacionados abaixo no último mês?
(Probióticos em sachê ou cápsula)
10. Consumiu algum desses produtos relacionados abaixo no último mês?
Fibras solúveis (pó ou goma)
11. Consumiu algum desses produtos relacionados abaixo no último mês?
Complexo de vitaminas e minerais
12. Consumiu algum desses produtos relacionados abaixo no último mês?
(Chá verde, chá branco, chá de Hibiscus)
13. Consumiu algum desses produtos relacionados abaixo no último mês?
(Tamarine ou outro medicamento para soltar o intestino)
14. Consumiu algum desses produtos relacionados abaixo no último mês?
(Qualquer fitoterápico para melhorar o funcionamento intestinal)
15. Tomou antibiótico no último mês?
16. Fez alguma cirurgia abdominal nos últimos 6 meses?

17. Possui alguma doença no fígado? Qual?
18. Possui alguma doença nos rins? Qual?
19. Possui alguma doença no coração? Qual?
20. Possui alguma doença no intestino (intolerância, alergia, câncer, diverticulite, entre outras)? Qual?
21. Possui alguma doença que não foi relacionada acima?

APÊNDICE D – Anamnese

Data: ____ / ____ / ____ Sexo: M() F()

1. Qual é o seu nome completo?
2. Qual sua idade? (Responda apenas em números)
3. Qual é o seu endereço residencial?
4. Endereço de e-mail
5. Qual é o número do seu telefone para contato?
6. Qual é sua renda familiar? (em reais) (Este dado é somente para fins de caracterização da população)
7. Quantas pessoas moram na sua casa?
8. Quantos anos você estudou?
9. Qual a sua situação de trabalho?
10. Na sua família tem casos de algumas dessas doenças?
11. Se você marcou outros na pergunta anterior, especifique quais doenças.
12. Quais medicamentos você faz uso atualmente? (nome do remédio, dose, quantas vezes por dia)
13. Você fuma?
14. Caso sua resposta tenha sido sim, quantos cigarros por dia você fuma?
15. Caso já tenha fumado, por quanto tempo fumou?
16. Você consome bebida alcoólica?
17. Caso consuma bebida alcoólica, o que costuma beber com maior frequência?
18. Caso consuma bebida alcoólica, com que frequência você bebe?
19. Quanto de água você bebe em um dia? (considere em garrafas de água: 500ml)
20. Antropometria:

Medida	Valor
Peso (kg)	
Altura (m)	
IMC (kg/m ²)	
Circunferência da cintura (cm)	

APÊNDICE E – Recordatório 24 horas/ Diário Alimentar

Data:

<i>Horário</i>	<i>Alimento/Quantidade</i>

ANEXO 1 - Valores padronizados dos parâmetros alimentares para o cálculo do IID

Food parameter	Weighted number of articles	Raw inflammatory effect score ⁶	Overall inflammatory effect score ⁷	Global daily mean intake ⁸ (units/d)	SD ⁹
Alcohol (g)	417	-0.278	-0.278	13.98	3.72
Vitamin B ₁₂ (µg)	122	0.205	0.106	5.15	2.70
Vitamin B ₆ (mg)	227	-0.379	-0.365	1.47	0.74
β-Carotene (µg)	401	-0.584	-0.584	3718	1720
Caffeine (g)	209	-0.124	-0.110	8.05	6.67
Carbohydrate (g)	211	0.109	0.097	272.2	40.0
Cholesterol (mg)	75	0.347	0.110	279.4	51.2
Energy (kcal)	245	0.180	0.180	2056	338
Eugenol (mg)	38	-0.868	-0.140	0.01	0.08
Total fat (g)	443	0.298	0.298	71.4	19.4
Fibre (g)	261	-0.663	-0.663	18.8	4.9
Folic acid (µg)	217	-0.207	-0.190	273.0	70.7
Garlic (g)	277	-0.412	-0.412	4.35	2.90
Ginger (g)	182	-0.588	-0.453	59.0	63.2
Fe (mg)	619	0.032	0.032	13.35	3.71
Mg (mg)	351	-0.484	-0.484	310.1	139.4
MUFA (g)	106	-0.019	-0.009	27.0	6.1
Niacin (mg)	58	-1.000	-0.246	25.90	11.77
n-3 Fatty acids (g)	2588	-0.436	-0.436	1.06	1.06
n-6 Fatty acids (g)	924	-0.159	-0.159	10.80	7.50
Onion (g)	145	-0.490	-0.301	35.9	18.4
Protein (g)	102	0.049	0.021	79.4	13.9
PUFA (g)	4002	-0.337	-0.337	13.88	3.76
Riboflavin (mg)	22	-0.727	-0.068	1.70	0.79
Saffron (g)	33	-1.000	-0.140	0.37	1.78
Saturated fat (g)	205	0.429	0.373	28.6	8.0
Se (µg)	372	-0.191	-0.191	67.0	25.1
Thiamin (mg)	65	-0.354	-0.098	1.70	0.66
Trans fat (g)	125	0.432	0.229	3.15	3.75
Turmeric (mg)	814	-0.785	-0.785	533.6	754.3
Vitamin A (RE)	663	-0.401	-0.401	983.9	518.6
Vitamin C (mg)	733	-0.424	-0.424	118.2	43.46
Vitamin D (µg)	996	-0.446	-0.446	6.26	2.21
Vitamin E (mg)	1495	-0.419	-0.419	8.73	1.49
Zn (mg)	1036	-0.313	-0.313	9.84	2.19
Green/black tea (g)	735	-0.536	-0.536	1.69	1.53

Food parameter	Weighted number of articles	Raw inflammatory effect score [*]	Overall inflammatory effect score [†]	Global daily mean intake [‡] (units/d)	SD [‡]
Flavan-3-ol (mg)	521	-0.415	-0.415	95.8	85.9
Flavones (mg)	318	-0.616	-0.616	1.55	0.07
Flavonols (mg)	887	-0.467	-0.467	17.70	6.79
Flavonones (mg)	65	-0.908	-0.250	11.70	3.82
Anthocyanidins (mg)	69	-0.449	-0.131	18.05	21.14
Isoflavones (mg)	484	-0.593	-0.593	1.20	0.20
Pepper (g)	78	-0.397	-0.131	10.00	7.07
Thyme/oregano (mg)	24	-1.000	-0.102	0.33	0.99
Rosemary (mg)	9	-0.333	-0.013	1.00	15.00

RE, retinol equivalents.

* This is referred to as the 'food parameter-specific raw inflammatory effect score' in the text and is abbreviated here for ease of presentation. Note that the effect is per unit amount noted for each food parameter.

† This refers to the 'food parameter-specific overall inflammatory effect score' accounting for the robustness of the literature, which is considered optimal at the median of 236 articles, and is computed as described in the text and illustrated for saturated fat in Fig. 2.

‡ From the world composite database, as described in the text.

Food parameter	Weighted number of articles	Raw inflammatory effect score [*]	Overall inflammatory effect score [†]	Global daily mean intake [‡] (units/d)	SD [‡]
Alcohol (g)	417	-0.278	-0.278	13.98	3.72
Vitamin B ₁₂ (µg)	122	0.205	0.106	5.15	2.70
Vitamin B ₆ (mg)	227	-0.379	-0.365	1.47	0.74
β-Carotene (µg)	401	-0.584	-0.584	3718	1720
Caffeine (g)	209	-0.124	-0.110	8.05	6.67
Carbohydrate (g)	211	0.109	0.097	272.2	40.0
Cholesterol (mg)	75	0.347	0.110	279.4	51.2
Energy (kcal)	245	0.180	0.180	2056	338
Eugenol (mg)	38	-0.868	-0.140	0.01	0.08
Total fat (g)	443	0.298	0.298	71.4	19.4
Fibre (g)	261	-0.663	-0.663	18.8	4.9
Folic acid (µg)	217	-0.207	-0.190	273.0	70.7
Garlic (g)	277	-0.412	-0.412	4.35	2.90
Ginger (g)	182	-0.588	-0.453	59.0	63.2
Fe (mg)	619	0.032	0.032	13.35	3.71
Mg (mg)	351	-0.484	-0.484	310.1	139.4
MUFA (g)	106	-0.019	-0.009	27.0	6.1
Niacin (mg)	58	-1.000	-0.246	25.90	11.77
n-3 Fatty acids (g)	2588	-0.436	-0.436	1.06	1.06
n-6 Fatty acids (g)	924	-0.159	-0.159	10.80	7.50
Onion (g)	145	-0.490	-0.301	35.9	18.4
Protein (g)	102	0.049	0.021	79.4	13.9
PUFA (g)	4002	-0.337	-0.337	13.88	3.76
Riboflavin (mg)	22	-0.727	-0.068	1.70	0.79
Saffron (g)	33	-1.000	-0.140	0.37	1.78

Saturated fat (g)	205	0.429	0.373	28.6	8.0
Se (µg)	372	-0.191	-0.191	67.0	25.1
Thiamin (mg)	65	-0.354	-0.098	1.70	0.66
Trans fat (g)	125	0.432	0.229	3.15	3.75
Turmeric (mg)	814	-0.785	-0.785	533.6	754.3
Vitamin A (RE)	663	-0.401	-0.401	983.9	518.6
Vitamin C (mg)	733	-0.424	-0.424	118.2	43.46
Vitamin D (µg)	996	-0.446	-0.446	6.26	2.21
Vitamin E (mg)	1495	-0.419	-0.419	8.73	1.49
Zn (mg)	1036	-0.313	-0.313	9.84	2.19
Green/black tea (g)	735	-0.536	-0.536	1.69	1.53

ANEXO 2 – Orientações para coleta de fezes



COLETA DE AMOSTRAS DE FEZES FRESCAS EM SOLUÇÃO ESTABILIZANTE

INFORMAÇÕES GERAIS

A análise de fezes para avaliação da composição microbiana intestinal é uma análise bastante sensível quanto à coleta e armazenamento apropriado das amostras. O manuseio adequado das amostras é essencial para evitar alterações na comunidade microbiana que possam ser introduzidas pós-coleta devido à morte e/ou favorecimento do crescimento dos diversos tipos microorganismos, juntamente com processos de oxidação e aerobiose.

PROCEDIMENTO DE PREPARO DO PACIENTE

- Não é necessário a adoção de qualquer dieta especial.
- Não é necessário interrupção de qualquer tipo de terapia medicamentosa.
- A coleta deve ser realizada com fezes recém-emitidas.
- O material deve ser coletado conforme as instruções a seguir.

PROCEDIMENTO DE COLETA E PREPARO DA AMOSTRA

Você recebeu os seguintes materiais:

- 01 microtubo de 2mL contendo 1mL de solução estabilizante estéril.
- 01 swab estéril.
- 01 frasco seco para coleta de fezes.



Colete as fezes em frasco apropriado (fornecido), evitando contato com urina.



Introduzir o swab nas fezes recém emitidas, o suficiente para deixar o swab sujo.



Abra o microtubo contendo a solução estabilizante e introduza o swab. Quebre o swab, observando o ponto de quebra (utilize a parede do microtubo para auxiliar na quebra).



Feche bem o microtubo. Armazenar em temperatura ambiente, protegido da luz solar. Entregar no laboratório em até 24 horas

CRITÉRIOS DE DESCARTE E REJEIÇÃO DE AMOSTRA

Amostras recebidas fora do padrão estabelecido pelo laboratório não serão processadas:

- Amostras não enviadas em microtubos apropriados.
- Microtubos danificados, expostos, não devidamente fechados ou extravasados.
- Amostras com volume excedente ao determinado no procedimento de coleta.
- Amostras que chegaram ao laboratório fora da temperatura estabelecida.
- Amostras não devidamente identificadas.

Av. Luiz Boiteux Piazza, 1302
Florianópolis - Canasvieiras
Sapiens Parque - Inovalab - CEP: 88054-700

+55 48 3012-1322
comercial@neopropecta.com
www.neopropecta.com

ANEXO 3 – Questionário IPAQ

QUESTIONÁRIO INTERNACIONAL DE ATIVIDADE FÍSICA – VERSÃO CURTA

Nome: _____

Data: ____/____/____ Sexo: M() F()

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

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

Dias ____ por **SEMANA** () Nenhum

1b Nesses dias, que você me disse, quanto tempo no total você gastou caminhando **por dia**? horas: _____ Minutos: _____

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

dias ____ por **SEMANA** () Nenhum

2b. Nesses dias, que você me disse, quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades **por dia**? horas: _____ Minutos: _____

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

dias ____ por **SEMANA** () Nenhum

3b Nesses dias, que você me disse, quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades **por dia**? horas: _____ Minutos: _____

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

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

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