



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

Lucas Correia Lins
2020101292 matrícula

**Perfil dos Metabólitos Intestinais em Indivíduos com Doença Inflamatória
Intestinal**

Maceió
2022

Lucas Correia Lins

Perfil dos Metabólitos Intestinais em Indivíduos com Doença Inflamatória Intestinal

Projeto de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Alagoas-UFAL, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Medicina

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Andrea Moura

Coorientador: Prof. Dr. Manoel Álvaro de Freitas

Lins Neto

Maceió
2022

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

L759p Lins, Lucas Correia.
Perfil dos metabólitos intestinais em indivíduos com doença inflamatória interstinal / Lucas Correia Lins. – 2022.
48 f. : il.

Orientadora: Fabiana Andrea Moura.
Coorientador: Manoel Álvaro de Freitas Lins Neto.
Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Universidade Federal de Alagoas. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas. Maceió, 2022.
Inclui produto educacional.

Bibliografia: f. 38-39.
Apêndices: f. 40-44
Anexos: f. 45-48.

1. Doença de Crohn. 2. Colite ulcerativa. 3. Metabolômica. 4. Calprotectina.
I. Título.

CDU: 616.34

Folha de Aprovação

Lucas Correia Lins

Perfil dos Metabólitos Intestinais em Indivíduos com Doença Inflamatória Intestinal

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Alagoas em 28 de Abril de 2022.



Documento assinado digitalmente

FABIANA ANDREA MOURA

Data: 27/09/2022 18:17:37-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

Profa. Dra. Fabiana Andrea Moura

Universidade Federal de Alagoas

Orientadora

Prof. Dr. Manoel Álvaro de Freitas Lins Neto

Universidade Federal de Alagoas

Coorientador

Banca Examinadora:

JORGE ARTUR

PECANHA DE MIRANDA

COELHO:02788815484

Assinado de forma digital por

JORGE ARTUR PECANHA DE

MIRANDA COELHO:02788815484

Dados: 2022.11.08 18:10:56 -03'00'

Prof. Dr. Jorge Artur Peçanha de Miranda Coelho

Universidade Federal de Alagoas

Examinador interno



Documento assinado digitalmente

JULIANA CELIA DE FARIAS SANTOS

Data: 16/11/2022 08:34:25-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

Profa. Dra. Juliana Célia de Farias Santos

Universidade Federal de Alagoas

Examinador interno



Documento assinado digitalmente

ANA LUIZA EXEL DA SILVA

Data: 08/11/2022 13:28:31-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dra. Ana Luiza Exel

Centro Universitário Tiradentes - Alagoas

Examinador externo

Dedico esse trabalho a todas as pessoas que dependem do Sistema Único de Saúde (SUS), em especial aos pacientes de doença inflamatória intestinal.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Universidade Federal de Alagoas e ao Hospital Universitário Professor Alberto Antunes, em especial a Clínica Cirúrgica, e o serviço de Endoscopia e Coloproctologia. Locais onde concluí a graduação em medicina, residência médica em Cirurgia Geral e Coloproctologia, e agora o programa de mestrado pela Faculdade de Medicina (FAMED).

Pela minha formação na Universidade pública e no Sistema Único de Saúde (SUS), não consigo deixar de manifestar aqui o meu repúdio a todos que manifestam discursos de ódio direcionados aos estudantes, professores, serviços e servidores públicos. Discursos tais que muitas vezes são encabeçados pelo presidente da república Bolsonaro.

De forma particular, agradeço meus pais, avós e meu amigo-irmão Thomás que terminou recentemente seu mestrado sendo minha inspiração como profissional e ser humano ímpar. Agradeço aos meus orientadores: professora Fabiana Moura, que me incentivou a terminar o trabalho quando eu achava que seria impossível, e professor Manoel Álvaro, que me acompanha desde a graduação na minha formação, sendo exemplo de pessoa e profissional que tanto admiro.

Aos meus amigos, agradeço a toda equipe do Instituto de Habilidades em Microbiota Intestinal (InHaMMI), em especial a Eliana Almeida, Claudia Costa, João Otávio e Josiete Acioli. Matheus Amaral e Julia Watanabee, estudantes que me ajudaram a todo momento. Minhas amigas Bruna Wanderley e Isabelle Lameirinhas. Ao químico Alexandre, um agradecimento especial, pois foi o grande impulsionador do trabalho. Agradecer minha amiga Júnia Meire, ao meu lado desde o início do projeto. E a minha esposa e companheira Camila Wanderley sempre me ajudando e apoiando a prosseguir no trabalho, amo você!!!

RESUMO

Introdução: A doença inflamatória intestinal (DII) é representada pela doença de Crohn (DC) e pela colite ulcerativa idiopática (CUI). Apresenta-se como afecção de origem autoimune e sem etiologia conhecida, de caráter crônico com períodos de remissão e agudização. Seu diagnóstico é feito através dos sintomas clínicos, exames de imagem e colonoscopia. Para acompanhamento, utiliza-se um marcador biológico, calprotectina fecal. Outra via possível com potencial de identificar biomarcadores para acompanhamento é a metabolômica. Essa técnica analítica faz parte das ciências ômicas e busca analisar os metabólitos presentes em meios biológicos e pode ser utilizada para identificação de fatores patológicos. **Objetivo:** Analisar o perfil da metabolômica fecal dos pacientes com DII e correlacionar com a atividade da doença pelos níveis da calprotectina fecal. **Metodologia:** Estudo observacional, transversal, por conveniência, com amostragem de pacientes com DII. Foram coletados dados clínicos, realizadas dosagens da calprotectina fecal para avaliar atividade da doença e metabolômica fecal através da espectrometria de massas pela técnica de GC-MS. Foram considerados pacientes com doença ativa aqueles que apresentaram calprotectina superior a 200µg/g. Foram realizados testes estatísticos com auxílio do SPSS v21 para análise de qui quadrado/teste de Fisher, sendo considerado significativo quando $p < 0,05$. Para análise da metabolômica fecal, foi utilizado o *software MetaboAnalyst 5.0*, com análise de forma multivariada. **Resultados:** Foram analisados 52 pacientes (n=29 com CUI e n=23 com DC). A atividade inflamatória foi identificada em 36 (69,2%) pacientes. Foram identificados 56 metabólitos através da metabolômica fecal. Na população do nosso estudo, os metabólitos mais sensíveis para diferenciar a DC da CUI foram: ácido hexadecanóico, esqueleno e ácido octadecanoico. Os metabólitos que melhor se correlacionaram com a atividade da doença entre os pacientes com CUI foram: ácido octadecanoico, 11-hexadecen-1, ácido hexadecanoico e a pentadecanona; já entre os pacientes com DC, foram: ácido octadecanoico, ciclodecasiloxona, ácido oleico-1 e ciclo-pentadecanoico. O ácido octadecanoico, 11-hexadecen-1, pentadecanona e ácido oléico-2 foram os mais sensíveis para avaliar maior grau de atividade de doença entre CUI e DC. **Conclusão:** A metabolômica pode ser utilizada como exame não invasivo na propedêutica da doença inflamatória intestinal, auxiliando no diagnóstico e identificação da atividade de doença. **Palavras-chave:** Doença de Crohn. Colite Ulcerativa. Metabolômica. Fezes. Calprotectina.

ABSTRACT

Introduction: Inflammatory bowel disease (IBD) is represented by Crohn's disease (CD) and idiopathic ulcerative colitis (IUC). It presents as an autoimmune condition with unknown etiology. It has a chronic nature with periods of remission and exacerbation. The diagnosis is made through clinical symptoms, imaging tests and colonoscopy. For follow-up, the fecal calprotectin is used as a biomarker. Another possibility with the potential to identify biomarkers for follow-up is metabolomics. This analytical technique is part of the omics sciences, used to find metabolites in biological materials and can be used to identify pathological factors.

Objective: To analyze the fecal metabolomics profile of patients with IBD and correlate it with disease activity by fecal calprotectin levels. **Methodology:** Observational, cross-sectional, convenience sampling study of patients with IBD. Clinical data were collected, measurements of fecal calprotectin were performed to assess disease activity and fecal metabolomics through mass spectrometry using the GC-MS technique. Patients with active disease were considered to be those with calprotectin greater than 200 μ g/g. Statistical tests were performed using SPSS v21 for chi-square analysis/Fisher's test, being considered significant when $p < 0.05$. For analysis of fecal metabolomics, the MetaboAnalyst 5.0 software was used, with multivariate analysis. **Results:** 52 patients were analyzed ($n=29$ with IUC and $n=23$ with CD). Inflammatory activity was identified in 36 (69.2%) patients. 56 metabolites were identified through fecal metabolomics. In the population of our study, the most sensitive metabolites to differentiate CD from ICU were: hexadecanoic acid, squalene and octadecanoic acid. The metabolites that best correlated with disease activity among patients with ICU were octadecanoic acid, 11-hexadecen-1, hexadecanoic acid and pentadecanone. Among patients with CD, the metabolites were octadecanoic acid, cyclodecasiloxona, oleic-1 acid and cyclopentadecanoic. octadecanoic acid, 11-hexadecen-1, pentadecanone and oleic-2 acid were the most sensitive to assess a higher degree of disease activity between ICU and CD.

Conclusion: Metabolomics can be used as a non-invasive test in the workup of inflammatory bowel disease, helping in diagnosis and identification of disease activity.

Keywords: Crohn Disease; Ulcerative Colitis. Metabolomic. Feces. Calprotectin.

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Associação entre atividade da doença, identificada pelos níveis de calprotectina fecal, e os tipos de doença inflamatória intestinal dos pacientes avaliados

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Visão geral dos padrões de separação entre doença de Crohn (DC) e colite ulcerativa indeterminada (CUI) com resultados da análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) (A). Acurácia, R2 e Q2 por permutação dos cinco metabólitos mais sensíveis (B).

Figura 2: Impressões por variação dos metabólitos pela análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) (A). Sensibilidade e especificidade segundo a curva ROC (B). Resultados segundo a atividade doença medida pelos níveis de calprotectina fecal (CF: em atividade (CF > 200 µg/g), em remissão (CF < 200 µg/g).

Figura 3: Colite ulcerativa idiopática - Padrão de separação dos valores de calprotectina fecal (CF) (A). Impressão por concentração de metabólitos pela análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA); resultado segundo a atividade da doença medida pelos níveis de CF: em atividade (CF > 200 µg/g), em remissão (CF < 200 µg/g).

Figura 4: Colite Ulcerativa Idiopática - Impressões por variação dos metabólitos pela análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) (A); sensibilidade e especificidade segundo a curva ROC (B). Resultados segundo a atividade doença medida pelos níveis de calprotectina fecal (CF: em atividade (CF > 200 µg/g), em remissão (CF < 200 µg/g).

Figura 5: Doença de Crohn – Padrão de separação dos valores de calprotectina (A); e impressão por concentração de metabólitos pela análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). Resultados segundo a atividade da doença medida pelos níveis de calprotectina fecal (CF): em atividade (CF > 200 µg/g), em remissão (CF < 200 µg/g).

Figura 6: Doença de Crohn - Impressões por variação dos metabólitos pela análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) (A); sensibilidade e especificidade segundo a curva ROC (B). Resultados segundo a atividade doença medida pelos níveis de calprotectina fecal (CF: em atividade (CF > 200 µg/g), em remissão (CF < 200 µg/g).

Figura 7: Impressões por variação dos metabólitos pela análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) (A); e sensibilidade e especificidade segundo a curva ROC (B) dos pacientes com doença inflamatória intestinal com maior atividade da doença (calprotectina fecal - CF > 800 µg/g).

Figura 8: Sensibilidade e especificidade segundo a curva ROC do ácido octadecanóico dos pacientes com doença inflamatória intestinal com maior atividade da doença (calprotectina > 800 µg/g).

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACU	Área abaixo da curva
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
CEP	Comitê de ética e pesquisa
CF	Calprotectina fecal
CUI	Colite ulcerativa indeterminada
CVOs	Compostos voláteis orgânicos
D2O	Óxido de deutério
DC	Doença de Crohn
DII	Doença inflamatória intestinal
HMDB	Do inglês <i>Human Metabolome Database</i>
R2	Coefficiente de determinação
TALE	Termo de assentimento livre e esclarecido
TCLE	Termo de compromisso livre e esclarecido
PLS-DA	Análise discriminante por mínimos quadrados parciais, do inglês <i>Partial Least Squares Discriminant Analysis</i>
Q2	Segundo quartil
ROC	Característica de operação do receptor
VIP	Variável de projeção

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Doença de Crohn	15
2.2 Colite ulcerativa idiopática	15
2.3 Etiologia e a microbiota na doença inflamatória intestinal	16
2.3.1 <i>Fatores genéticos</i>	16
2.3.2 <i>Sistema imunológico</i>	16
2.3.3 <i>Fatores ambientais</i>	17
2.3.4 <i>Microbiota intestinal</i>	17
2.4 Diagnóstico e acompanhamento na doença inflamatória intestinal	18
2.5 Papel da calprotectina fecal na doença inflamatória intestinal	18
2.6 Metabolômica e a medicina de precisão	19
3. OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo geral	20
3.2 Objetivos específicos	20
4. METODOLOGIA	21
4.1 Caracterização do estudo	21
4.2 Critérios de elegibilidade	21
4.3 Métodos	21
4.3.1 <i>Dados pessoais e clínicos</i>	21
4.3.2 <i>Avaliação Bioquímica</i>	21
4.3.3 <i>Avaliação da metabolômica</i>	22
4.4 Considerações Éticas	23
5. PRODUTO	24

5.1 Artigo: <i>PROFILE OF INTESTINAL METABOLITES IN INDIVIDUALS WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASE</i>	24
6. DISCUSSÃO	34
7. CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	38
APÊNDICES	40
ANEXO	45

1. INTRODUÇÃO

A doença inflamatória intestinal (DII) refere-se principalmente a Doença de Crohn (DC) e a Colite Ulcerativa (CUI), que corresponde a uma doença crônica que cursa com inflamação no trato gastrointestinal e complicações extra intestinais (PILLAI et al., 2017). A exata etiologia ainda é incerta, porém a interação entre genética, fatores imunológicos e ambientais contribuem para seu desenvolvimento (VENNOU et al., 2019; URBANO et al., 2017).

Clinicamente a DC e a CUI apresentam-se com exacerbações e remissões da inflamação e possuem sintomatologia semelhante, tal como dor abdominal, diarreia e perda de peso; porém podem divergir quanto a extensão, localização, complicações e prevalência (PILLAI et al., 2017; VENNOU et al., 2019).

Os estudos apontam um aumento da incidência e prevalência da DII no mundo (BARROS; SILVA; LINS NETO, 2014), com incidência variando de 10 a 20 casos por 100 mil habitantes nos países desenvolvidos, e a prevalência sendo superior a 20 casos por cem mil habitantes (KAPLAN, 2015). No Brasil, não há registros nacionais sobre incidência e prevalência da DII, mas estudos pontuais estimam uma prevalência de 14,8/100.000 para a DC no estado de São Paulo. Nas regiões Norte e Nordeste ainda é uma doença pouco prevalente, porém nos Hospitais Universitários há um crescente aumento de atendimentos ambulatoriais e internações hospitalares (PARENTE, 2014; PCDT, 2017).

Os custos para o sistema de saúde são considerados elevados e se deve a múltiplos fatores como medicações, hospitalização, cirurgias e absenteísmo no trabalho (KAMAT et al., 2017). Dados canadenses de 2012 mostraram que neste ano foram gastos apenas com fármacos para o tratamento da DII mais de 1,2 bilhão de dólares canadenses, e com hospitalizações 395 milhões. Nesse mesmo ano, foram gastos na Europa entre 4,5 e 5,6 bilhões de euros com o tratamento da doença (ROCCHI et al., 2012).

A DII representa um importante problema de saúde pública, afetando as atividades laborais, produtividade, vida social, e interferindo na qualidade de vida dos pacientes. Seu tratamento objetiva a remissão clínica, endoscópica e histopatológica, através de uma abordagem complexa, contemplando terapêutica não farmacológica (psicológica, nutricional etc.) e farmacológica (imunossupressores, anti-inflamatórios, imunobiológicos etc.), e - em casos não responsivos à terapêutica tradicional - intervenção cirúrgica (URBANO *et al.*, 2017; PILLAI *et al.*, 2017).

O trato gastrointestinal é o local que apresenta o maior número e diversidade de microrganismos no corpo humano, e, em especial, a microbiota intestinal que exerce grande influência sobre homeostase corporal (WILLEY, SHERWOOD., 2009). Dessa forma, a manutenção do equilíbrio desse ambiente, a eubiose, impede a proliferação de microrganismos patogênicos por competição, evitando, conseqüentemente, a infecção por esses agentes (FIOCCHI, PEREIRA., 2012).

Nesse contexto, a presença de disbiose intestinal está intimamente relacionada à patogênese e a complicações clínicas nas DII, porém ainda não é possível distinguir se essa disbiose é causa ou consequência da doença (VERMEIRE et al., 2016). Dessa forma, diversas terapêuticas com a finalidade de interferir nesse desbalanço vêm sendo investigadas (CAMMAROTA et al., 2014; ISHIKAWA et al., 2011).

Para o diagnóstico da DII, além da avaliação clínica, são utilizadas medidas invasivas e de alto custo, como o exame de colonoscopia e a avaliação histopatológica, as quais geram desconforto aos pacientes. Devido a isso, nos últimos anos, estudos têm sido realizados para encontrar um marcador laboratorial de alta sensibilidade e especificidade para diagnóstico e acompanhamento não invasivo dessas doenças (FATEMEH et al., 2020). Exames séricos tradicionais, como velocidade de hemossedimentação, proteína C reativa, leucócitos, plaquetas e albumina, por expressarem resposta inflamatória sistêmica, não são específicos para a DII. Por outro lado, a calprotectina fecal (CF) vem se apresentando como um marcador eficaz, de baixo custo e alta reprodutibilidade, tanto para o diagnóstico como para o acompanhamento/monitoramento das DII (ROKKAS, PORTINCASA, KOUTROUBAKIS., 2018).

A CF é uma proteína de ligação ao cálcio e ao zinco, derivada dos neutrófilos e monócitos. É detectada em fluidos corporais, como sangue, urina, fezes e amostras de tecidos. A CF é usada na propedêutica da DII, sendo um biomarcador não invasivo promissor comparado a outros marcadores laboratoriais (ROKKAS, PONTICASA, KOUTROUBAKIS., 2018). Apresenta sensibilidade e especificidade de 88,6 e 97,1 respectivamente, quando comparado a estadiamento endoscópico e análise histológica na DII (VIEIRA et al., 2009).

Outra via possível com potencial de identificar biomarcadores para acompanhamento da DII, na vigilância de exarcebações clínicas, é a metabolômica (KESHTELI et al., 2017). Essa técnica analítica faz parte das ciências ômicas e busca analisar os metabólitos presentes em meios biológicos e pode ser utilizada para identificação de fatores patológicos.

As técnicas analíticas mais utilizadas são a ressonância magnética nuclear, cromatografia líquida LC-MS e cromatografia gasosa GC-MS (CANUTO et al., 2018; DANILUK et al., 2019). Com relação à sua aplicação, o GC-MS é frequentemente utilizado para a análise de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e outros compostos voláteis (GALLAGHER., 2020).

Estudos recentes confirmam alterações nos metabólitos em pacientes com DII comparativamente a indivíduos saudáveis (KESHTELI et al., 2017). Adicionalmente, a microbiota intestinal é alvo importante de estudos que objetivam sua modulação a fim de reduzir sinais, sintomas e complicações clínicas comuns nos pacientes com DII. Dessa forma, é fundamental identificar biomarcadores fecais - de baixo custo e de elevada reprodutibilidade - que auxiliem a equipe médica na identificação da gravidade da doença e seus riscos, bem como na avaliação da remissão e eficácia de tratamentos tradicionais ou não usados no curso da doença.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doença de Crohn

A DC é uma doença inflamatória crônica e progressiva. Qualquer segmento do trato gastrointestinal pode ser acometido, sendo o íleo terminal e o cólon os mais comuns. A inflamação é segmentar, assimétrica e transmural, e pode desenvolver complicações ao longo do tempo como estenoses, fístulas e abscessos (TORRES et al., 2016).

O início da doença geralmente ocorre entre a segunda e quarta década de vida, e um segundo pico entre a quinta e sexta, e não há predisposição por sexo. A incidência e prevalência vêm aumentando em todo o mundo, de forma maior em países desenvolvidos e em áreas urbanas. A maior incidência anual é no Canadá, no norte da Europa, na Nova Zelândia e na Austrália. A prevalência é mais alta na Europa, Canadá e EUA (MOLODECKY et al., 2012).

A etiologia da DC é incerta, porém acredita-se que resulte numa interação entre genética, fatores ambientais e microbiota intestinal, resultando em uma resposta imune anormal. A apresentação clínica mais comum é dor abdominal, diarreia crônica e perda de peso, contudo os sintomas vão depender da localização, gravidade e comportamento da doença. Outros sintomas são: fadiga, anorexia, sangramento retal, febre alta em vigência de quadro séptico, doença perianal etc. Metade dos pacientes apresentam manifestações extra intestinais articulares, cutâneas ou oculares. Algumas delas estão associadas à atividade da doença, como o eritema nodoso; outras são independentes, como a colangite esclerosante primária (TORRES et al., 2016).

Na DC existem períodos de remissão e recorrência/atividade de doença; a localização tende a ser estável, mas o comportamento muda ao longo do tempo. A taxa de internação anual chega a 20%, e nos primeiros 10 anos de doença metade dos pacientes necessitará de cirurgia (TORRES et al., 2016).

2.2 Colite ulcerativa idiopática

A CUI é a outra principal forma de DII. Possui características compartilhadas com a DC, mas possuem distinções quanto à predisposição genética, fatores de risco e características clínicas, histológicas e endoscópicas. Tal qual a DC, a etiologia é desconhecida, entretanto a inflamação intestinal decorre de indivíduos geneticamente suscetíveis com uma resposta imune da mucosa intestinal desregulada pela microbiota intestinal e fatores ambientais (ABRAHAM, CHO et al., 2009).

A inflamação na CUI é restrita à superfície da mucosa intestinal; o distúrbio se inicia no reto e se estende proximalmente de forma contínua pelo cólon. A distribuição da doença se dá em proctite, colite esquerda e pancolite (SILVERBERG et al., 2005).

A CUI, como a DC, apresenta padrão de incidência bimodal, sendo o pico principal entre os 15 e 30 anos, e o segundo pico entre a quinta e sétima década de vida. Há uma preferência em relação ao sexo masculino em relação ao feminino, e é mais prevalente que a DC. O norte da Europa, EUA e Canadá apresentam as maiores taxas de incidência e prevalência; e percebe-se um aumento na incidência em países que adotaram um estilo de vida mais industrializado (ORDÁS et al., 2012).

Períodos de remissão e atividade de doença caracterizam o curso clínico da CUI. Sintomas leves e moderados se apresentam na maioria dos pacientes no momento do diagnóstico, limitando-se 10% para os casos graves. Cerca de 30-50% dos pacientes apresentam colite distal (reto e cólon sigmóide), 20-30% colite esquerda e 20% pancolite. A colite distal tem risco de 25-50% de progredir para formas mais extensa de doença. Essa progressão geralmente segue um curso grave e necessita de vigilância e tratamento apropriado. A extensão da doença é um preditor de casos cirúrgicos (colectomia), por refratariedade de tratamento clínico ou risco de câncer colorretal (ORDÁS et al., 2012).

2.3 Etiologia e a microbiota na doença inflamatória intestinal

A etiologia da DII é desconhecida, porém há evidências de que sua patogênese está associada à suscetibilidade genética, ao sistema imunológico, a fatores ambientais e à microbiota intestinal (GUAN et al., 2019).

2.3.1 Fatores genéticos

Estudos do genoma já sequenciaram mais de 240 loci de risco genético para DII. Desses, 30 loci genéticos são compartilhados entre DC e CUI. A análise desses genes e loci genéticos indicam vias importantes para homeostase intestinal através da defesa inata da mucosa, barreira intestinal, regulação imunológica, migração celular, autofagia, homeostase, imunidade adaptativa, entre outras vias metabólicas (GUAN et al., 2019).

2.3.2 Sistema imunológico

A DII caracteriza-se com a falha na regulação imune no controle da resposta inflamatória associada ao dano epitelial em segmentos do trato gastrointestinal, expansão da inflamação impulsionada pela disbiose intestinal e grande número de células (células T, células

B, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos) infiltrando a lâmina própria (GUAN et al., 2019).

Existe uma resposta imune atrelada à flora intestinal, e a desregulação que acontece na DII promove uma resposta inflamatória defensiva. Há uma disfunção da barreira da mucosa intestinal, proteínas antibacterianas, pH gástrico (que limita o crescimento bacteriano), células imunológicas, citocinas e moléculas inatas, mediadas pelo sistema imune inato. Essas defesas, não controlando a exposição dos patógenos presentes na disbiose na DII, ativam o sistema imune adaptativo (células T e B) que promove uma tolerância imune e resposta inflamatória em um ciclo vicioso, desregulando o equilíbrio intestinal e causando a DII (GUAN et al., 2019).

2.3.3 Fatores ambientais

A frequência da DII é maior em países desenvolvidos. A industrialização progressiva nos países vem aumentando a incidência dessa doença, corroborando a influência dos fatores ambientais na patogênese da doença. A ingestão de alimentos ricos em gorduras e açúcares exacerbam a DII, da mesma forma que aditivos alimentares artificiais e *fast food*, prevalentes nas dietas ocidentais. São alimentos que promovem inflamação, interferindo na barreira intestinal. Em contraponto, a ingestão de frutas e vegetais tem sido associada à diminuição do risco de DII (GUAN et al., 2019).

O tabagismo é outro fator que interfere na DII; fator complicador na DC e protetor na CUI. O tabaco altera a resposta imunológica celular e humoral, e promove produção de muco no cólon. Acredita-se que a piora na DC se dá devido ao fato de que a nicotina prejudica a autofagia, especialmente envolvida na DC (GUAN et al., 2019).

Outros fatores ambientais como estresse psicológico, uso de medicamentos e procedimentos cirúrgicos, como a apendicectomia, também influenciam na DII, porém os mecanismos ainda não são totalmente compreendidos (GUAN et al., 2019).

2.3.4 Microbiota intestinal

A microbiota intestinal é o principal fator ambiental que implica na DII, e parece resultar em respostas imunes anormais no hospedeiro. O trato gastrointestinal contém 1000 a 5000 espécies diferentes de microorganismos; as principais delas são provenientes de Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria e Actinobacteria. Esses microrganismos contém cerca de 100 vezes mais genes que os presentes no genoma humano. Essa microbiota pode ser influenciada por diversos fatores: dieta, probióticos, prebióticos, antibióticos, enzimas exógenas, entre outros fatores ambientais. Existem microrganismos comensais necessários para o desenvolvimento e diferenciação do sistema imunológico local e sistêmico, e a coexistência

com a microbiota deve ser benéfica para o metabolismo do hospedeiro. É necessário manter essa coexistência com esses microrganismos, podendo uma disbiose levar ao surgimento de doenças (GUAN et al., 2019).

Na DII, é difícil demonstrar uma relação causa-efeito definitiva relacionada à microbiota intestinal. É improvável que uma única infecção cause ou desencadeie o surgimento da DII, porém a microbiota intestinal está diretamente relacionada ao desenvolvimento da DII, pois sabe-se que fatores microbianos desempenham papéis importantes no metabolismo do hospedeiro, impactando no seu sistema imunológico (GUAN et al., 2019).

2.4 Diagnóstico e acompanhamento na doença inflamatória intestinal

O diagnóstico da DII tem base na história clínica e exame físico, associados a estudos endoscópicos, histológicos e radiológicos, e exames laboratoriais. Diarreia crônica, dor abdominal e perda de peso são manifestações típicas, e têm como diagnósticos diferenciais a intolerância alimentar, o uso de medicamentos, infecções gastrointestinais e tabagismo. A DII deve ser investigada em pacientes com deficiências nutricionais, alterações dermatológicas (eritema nodoso, pioderma gangrenoso), artralgia, e déficit de crescimento em crianças (WEHKAMP et al., 2016).

Exames laboratoriais como hemograma, função renal e hepática, biomarcadores inflamatórios (proteína C reativa, velocidade de hemodiluição) e a calprotectina fecal estão inclusos na avaliação inicial e acompanhamento da DII. O exame endoscópico (colonoscopia) é o padrão ouro para o diagnóstico de DII, podendo avaliar alterações na mucosa do reto, cólon e íleo terminal (WEHKAMP et al., 2016).

O seguimento da doença consiste como alvo um bom quadro clínico, a normalização de valores laboratoriais e a cicatrização da mucosa (histologia realizada na colonoscopia). A partir de 10 anos da manifestação da doença, a colonoscopia deve ser utilizada para vigilância de neoplasia colorretal a cada 1-2 anos em todos os pacientes (WEHKAMP et al., 2016).

2.5 Papel da calprotectina fecal na doença inflamatória intestinal

A CF é um heterodímero de ligação ao zinco e ao cálcio pertencente à família S100. É encontrada principalmente nos grânulos de células polinucleares (neutrófilos, monócitos e macrófagos). Tem atividade antimicrobiana através do sequestro de zinco com consequente inibição do crescimento bacteriano (MANCEAU et al., 2017).

A síntese de CF é intensificada durante um processo inflamatório, fornecendo um efeito imunorregulador. É visto que a CF aumenta de valor nos pacientes com DII. Sua concentração nas fezes correlaciona com a infiltração da mucosa intestinal por neutrófilos. Na DII, seus valores se associam ao quadro clínico e histológico de atividade de doença; devido a isso, é utilizada no diagnóstico e no monitoramento de atividade de doença, e pode ser utilizada para detectar atividade inflamatória subclínica em pacientes assintomáticos (MANCEAU et al., 2017). Um estudo demonstra uma sensibilidade de 70% e especificidade de 92% na avaliação de atividade endoscópica com um ponto de corte CF de 200µg/g de fezes (BJARNASON, 2017).

A CF se correlaciona com os principais escores de avaliação endoscópica utilizados na prática clínica (SES-CD, UCIS e Mayo), mais do que parâmetros inflamatórios não específicos como PCR e hemograma (MANCEAU et al., 2017).

2.6 Metabolômica e a medicina de precisão

Uma interpretação da complexidade molecular em doenças humanas é feita em vários níveis (genoma, epigenoma, transcriptoma, proteoma e metaboloma), chamados de multiômicas. A disponibilidade do estudo e dados das multiômicas revoluciona o campo da medicina e biologia, promovendo diversas vias de abordagens integradas (THEODORIDIS et al., 2018).

A metabolômica consiste na análise de metabólitos presentes em células, tecido ou fluidos, tendo foco em estudos de biomarcadores. Os metabólitos são produtos de processos celulares, e presume-se que alterações sejam reflexos de alterações da função de enzimas e proteínas mediadoras. As técnicas analíticas da metabolômica consistem na espectrometria de massa (MS) gasoso (GC) ou líquido (LC), e a ressonância magnética (RNM) (THEODORIDIS et al., 2018).

As análises dos dados de uma impressão digital metabólica consistem em métodos de análise multivariada para identificar características espectrais biologicamente relevantes para outras análises direcionadas. Dois métodos populares são a análise de componentes principais (PCA do inglês *principal component analysis*) e a projeção de mínimos quadrados para estruturas latentes (PLS do inglês *projection to latent structures*). PCA e PLS visam diferenciar classes em conjunto de dados complexos (WORLEY, POWERS, 2013).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Analisar o perfil metabólico intestinal de pacientes com Doenças Inflamatórias Intestinais e associar com perfil inflamatório identificado pelos níveis de Calprotectina Fecal.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o grau de atividade da Doenças Inflamatórias Intestinais com biomarcadores – calprotectina e metabólitos fecais;
- Descrever e analisar o perfil metabólico intestinal dos pacientes com Doenças Inflamatórias Intestinais ;
- Avaliar a relação entre Calprotectina Fecal e os metabólitos intestinais.

4. METODOLOGIA

4.1 Caracterização do estudo

Estudo tipo analítico transversal com amostragem por conveniência.

4.2 Critérios de elegibilidade

Critérios de inclusão:

Pacientes diagnosticados com DII acompanhados no ambulatório de Coloproctologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Alagoas, de ambos os sexos, sem restrição de idade, que concordaram em assinar o TCLE (APÊNDICE A) e TALE (APÊNDICE B).

Critérios de exclusão:

Pacientes com diagnóstico de outras colites não incluídas nas DII;

Pacientes submetidos a procedimento cirúrgico gastrointestinal nos últimos seis meses;

Pacientes que fizeram uso de antibióticos nos últimos três meses;

Pacientes em infecção vigente por vírus ou bactérias de qualquer origem;

Pacientes gestantes, lactantes ou puérperas.

Pacientes oncológicos e tabagistas.

4.3 Métodos

Foram selecionados pacientes com DII que foram submetidos a um questionário para avaliação clínica, e colhida uma amostra fecal para análise da metabolômica e da CF.

4.3.1 Dados pessoais e clínicos

Colhidos através de um formulário clínico (APÊNDICE C).

4.3.2 Avaliação Bioquímica

Foram analisados valores da CF, processados no aparelho BÜHLMANN Quantum Blue®, classificada como alterada quando maior ou igual a 200µg/g de fezes, valor com alto valor preditivo positivo para doença intestinal (BJARNASON et al., 2017). As amostras de fezes são colocadas em tubo de extração e diluídas com solução do kit da BÜHLMANN fCAL® a 1:16 com tampão de extração. A mistura é agitada em vórtex por um minuto e centrifugada a

3000 x g / cinco minutos. A solução final é então analisada no aparelho por um período de 15 minutos com resultado da concentração quantitativa da proteína.

4.3.3 Avaliação da metabolômica

Análise dos Compostos Voláteis Orgânicos (CVOs):

CVOs presentes nas fezes dos doadores serão analisadas pela técnica de GC-MS/SPME, conforme descrito por Ahmed e cols. (2016):

(1) Uma alíquota de 2g de fezes foi colocada em um tubo recipiente com headspace de 18mL (Agilent) com septo de silicone/polytetrafluoroetileno e armazenado a 20°C até análise. As amostras colocadas em banho-maria a 60 °C por 1 h. CVOs foram extraídos por 10 min usando fibra pré-condicionada no cartucho de SPME (revestida de Carboxeno / polydimethylsiloxano) exposta ao headspace, logo acima das fezes.

(2) Análise dos CVOs consistiu em três passos principais, sendo, primeiramente, adsorção dos voláteis em cartuchos adsorventes, seguida de desadsorção térmica e análises por GC-MS.

(3) Após sua obtenção, os CVOs foram termicamente desadsorvidos dos cartuchos de SPME por transferência imediata e diretamente para dentro da porta de injeção (220 °C) do GC-MS. O injetor é operado no modo splitless. A temperatura do forno foi programada assim: 40°C por 2 min, aumento de 6 °C/min até 220 °C, mantido por 4 min levando a um total de corrida de 36 min. Hélio é o gás de arraste, usado em velocidade linear constante de 35 cm/s. O GC-MS gera um cromatograma com picos representando os compostos individualmente.

(4) A identificação dos compostos é feita com uso da biblioteca existente no software do GC-MS e comparada aos dados existentes no portal da metabolômica hmdb.ca. Os valores das áreas obtidas serão utilizados para as análises estatísticas.

Análises Estatísticas dos dados de GC-MS:

A plataforma online *MetaboAnalyst 5.0* (gratuitamente disponibilizada no <https://www.metaboanalyst.ca>) foi utilizada para realização de toda a análise estatística que requer suporte computacional, pois além de ser um software livre, tem precisão numérica, contribui para reprodutibilidade na ciência e seu uso é amplamente difundido e recomendado para esse fim. Os dados dos cromatogramas obtidos por GC foram convertidos em uma matriz de dados usando o *software Chromeleon 7.2* (programa do equipamento). Regiões contendo sinais de interferentes foram excluídas da análise. As concentrações dos metabólitos identificados foram normalizadas pela mediana, seguido da transformação de dados em escala logarítmica

(base 10) e o dimensionamento de dados pela escala de Pareto. Foram realizadas análises supervisionadas de Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) para identificar os metabólitos discriminantes entre os grupos de amostras de fezes. O PLS-DA é um método supervisionado que prevê a associação de classes através de informações obtidas por técnicas de regressão multivariada. Calculamos as variações dos metabólitos das amostras através da variável na projeção (VIP); essa é uma medida de importância variável no PLS-DA. A VIP é uma soma ponderada de quadrados de cargas PLS levando a variação de cada dimensão. Os escores VIP são calculados para cada componente separadamente. Neste estudo, foram consideradas como significativas as medidas VIP acima de 2,0.

Análises Estatísticas dos dados da calprotectina fecal:

Para análise estatística da associação entre calprotectina fecal e os tipos de DII foi realizado teste de qui-quadrado utilizando o pacote estatístico *SPSS* v21, sendo a significância determinada quando $p < 0,05$.

4.4 Considerações Éticas

Esta pesquisa está aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Alagoas, de acordo com a Resolução no 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, com número 2725386.

5. PRODUTO

Artigo submetido ao periódico *International Journal of Colorectal Disease*

Título: *PROFILE OF INTESTINAL METABOLITES IN INDIVIDUALS WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASE, according to the guidelines of the International Journal of Colorectal Disease (ANEXO A).*

Lucas C Lins ¹, Fabiana A Moura ¹, Manoel Álvaro ML Neto ¹

¹ Federal University of Alagoas, Brazil

Author information: Lucas Correia Lins, E-mail: lucascorreialins@gmail.com

Adress: Av. Julio Marques Luz, 877, Jatiuca, Maceió, Alagoas, Brazil

ABSTRACT

Purpose: Inflammatory Bowel Disease (IBD) presents as a condition of autoimmune origin and without known etiology. The two major types of IBD are Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). Clinical symptoms, imaging tests, and colonoscopy are the most common techniques for IBD diagnosis. Usually, we use fecal calprotectin to follow up on the disease activity as a biological marker. Another possible pathway with the potential to identify biomarkers for follow-up is metabolomics. This analytical technique is part of the omics sciences and seeks to analyze the metabolites present in biological media and can be used to identify pathological factors. We propose investigating the fecal metabolomics profile of patients with IBD and correlating it with disease activity by fecal calprotectin levels.

Methods: Observational, cross-sectional, convenience study with a sample of patients with IBD. Clinical data were collected, and fecal calprotectin measurements were performed to assess disease activity. We extract fecal metabolomics through mass spectrometry using the GC-MS technique. The patients with active disease were those with calprotectin greater than 200 μ g/g. We used MetaboAnalyst 5.0 software with multivariate analysis to analyze fecal metabolomics.

Results: 52 patients were analyzed (n=29 with IUC and n=23 with CD). Inflammatory activity was identified in 36 (69.2%) patients. Fifty-six metabolites were identified through fecal metabolomics. In our population study, the most sensitive metabolites to differentiate CD from CU were: hexadecanoic acid, squalene, and octadecanoic acid. The metabolites that best correlated with disease activity among patients with CU were octadecanoic acid, 11-hexadecen-1, hexadecanoic acid and pentadecanone. Among patients with CD, the metabolites were octadecanoic acid, cyclodecasiloxona, oleic-1 acid and cyclopentadecanoic. Octadecanoic acid, 11-hexadecen-1, pentadecanone, and oleic-2 acid were the most sensitive to assess a higher degree of disease activity between CU and CD.

Conclusion: Metabolomics can be used as a non-invasive test in the workup of inflammatory bowel disease, helping diagnose and identify disease activity.

Keywords: Crohn's disease; ulcerative colitis; omics; fecal metabolites; fecal calprotectin.

INTRODUCTION:

Inflammatory bowel disease (IBD) refers mainly to Crohn's Disease (CD) and ulcerative colitis (UC), which is a chronic disease that causes inflammation in the gastrointestinal tract and extra-intestinal complications [1]. People with suspected IBD are screened for flares and inflammation by measuring fecal calprotectin, a marker for neutrophilic intestinal inflammation. However, calprotectin is a non-specific inflammatory marker (sensitivity 83%, specificity 60%), and the definitive diagnosis is made on biopsies collected through colonoscopy, which carries a risk of pain, bleeding, and perforation. The etiology is unknown, but the interaction between genetics, immunological and environmental factors contribute to its development [2, 3].

Clinically, CD and UC present with exacerbations and remissions of inflammation and have similar symptoms, such as abdominal pain, diarrhea, and weight loss; however, they may differ in extent, location, complications, and prevalence [1, 2].

Studies point to an increase in the incidence and prevalence globally [4], with an incidence ranging from 10 to 20 cases per 100,000 inhabitants in developed countries, the prevalence is more significant than 20 cases per hundred. Thousand inhabitants [5]. In Brazil, there are no national records on the incidence and prevalence of IBD, but specific studies estimate a prevalence of 14.8/100,000 for CD in the state of São Paulo. In the North and Northeast regions, it is still a less prevalent disease, but there is a growing increase in outpatient visits and hospital admissions [6].

The costs for the health system are considered high and are due to multiple factors such as medications, hospitalization, surgeries, and absenteeism from work [7]. Canadian data from 2012 showed that more than 1.2 billion Canadian dollars were spent this year on drugs to treat IBD and 395 million on hospitalizations. In that same year, between 4.5 and 5.6 billion euros were spent in Europe to treat the disease [8].

IBD represents a significant public health problem, affecting work activities, productivity, and social life and interfering with patients' quality of life. Its treatment aims at clinical, endoscopic, and histopathological remission through a complex approach, including non-pharmacological (psychological, nutritional, etc.) and pharmacological (immunosuppressant, anti-inflammatory, immunobiological, etc.) traditional-surgical intervention [1, 3].

The gastrointestinal tract has the most significant number and diversity of microorganisms in the human body, particularly the intestinal microbiota, which exerts a considerable influence on body homeostasis [9]. Thus, maintaining the balance of this environment, eubiosis prevents the proliferation of pathogenic microorganisms by competition, thus preventing infection by these agentes [10].

In this context, intestinal dysbiosis is closely related to the pathogenesis and clinical complications of IBD. However, it is still not possible to distinguish whether this dysbiosis is a cause or a consequence of the disease [11]. Thus, several therapies to interfere with this imbalance have been investigated [12, 13].

For the diagnosis of IBD, in addition to clinical evaluation, invasive and costly measures are used, such as colonoscopy and histopathological evaluation, which cause discomfort to patients. Due to this, in recent years, studies have been carried out to find a laboratory marker of high sensitivity and specificity for non-invasive diagnosis and monitoring of these diseases [14]. Traditional serum tests, such as erythrocyte sedimentation rate, C-reactive protein, leukocytes, platelets, and albumin, as they express a systemic inflammatory response, are not specific for IBD. On the other hand, fecal calprotectin (FC) has been presented as an effective, low-cost, and high-reproducibility marker, both for the diagnosis and for the follow-up/monitoring of IBD [15].

FC is calcium and zinc-binding protein derived from neutrophils and monocytes. It is detected in body fluids such as blood, urine, stool, and tissue samples. FC is used in the workup of IBD, being a promising non-invasive biomarker compared to other laboratory markers [15] It presents sensitivity and specificity of 88.6 and 97.1, respectively, when compared to endoscopic staging and histological analysis in IBD [16].

Another possible route to identify biomarkers for monitoring IBD in the surveillance of clinical exacerbations is metabolomics [17]. This analytical technique is part of the omics sciences and seeks to analyze the metabolites present in biological media and can be used to detect subclinical inflammatory activity in asymptomatic patients [15]. One study demonstrates a sensitivity of 70% and specificity of 92% in assessing endoscopic activity with a FC cut-off of 200µg/g of stool [18].

FC correlates with the top endoscopic assessment scores used in clinical practice (SES-CD, UCIS, and Mayo) more than non-specific inflammatory parameters such as CRP and blood count [15].

An interpretation of molecular complexity in human diseases is made at several levels (genome, epigenome, transcriptome, proteome, and metabolome), called multi-omics. The availability of multi-omics study and data revolutionizes the field of medicine and biology, promoting several avenues of integrated approaches [15].

Metabolomics analyzes metabolites present in cells, tissue, or fluids, focusing on biomarker studies. Metabolites are products of cellular processes, and changes are assumed to reflect changes in the function of enzymes and mediating proteins. The analytical techniques of metabolomics consist of gas (GC) or liquid (LC), mass spectrometry (MS), and magnetic resonance imaging (MRI) [15].

METHODOLOGY:

This research was approved by the Research Ethics Committee (CEP) of the Federal University of Alagoas, following Resolution 466/12 of the National Health Council, CAAE 55813816.2.0000.5013.

Fifty two patients were analyzed (n=29 with UC and n=23 with CD) . These patients were selected and submitted to a questionnaire for clinical evaluation, and get a fecal sample for analysis of metabolomics and FC.

FC values were analyzed, processed in the BÜHLMANN Quantum Blue® device, and classifying as altered when greater than or equal to 200µg/g of feces, a value with a high positive predictive value for intestinal disease (BJARNASON et al., 2017). Stool samples are placed in an extraction tube and diluted with 1:16 BÜHLMANN fCAL® kit solution with extraction buffer. The mixture is vortexed for one minute and centrifuged at 3000 x g /five minutes. The final solution is then analyzed in the instrument for 15 minutes due to the quantitative concentration of the protein.

Analysis of Volatile Organic Compounds (VOCs):

CVOs present in the feces of donors will be analyzed by the GC-MS/SPME technique, as described by Ahmed et al. (2016):

(1) A 2g aliquot of stool was placed in an 18mL headspace recipient tube (Agilent) with silicone/polytetrafluoroethylene septum and stored at 20°C until analysis. The samples were placed in a water bath at 60 °C for one h. CVOs were extracted for 10 min using preconditioned fiber in the SPME cartridge (Carboxene/polydimethylsiloxane coated) exposed to the headspace, just above the feces.

(2) Analysis of CVOs consisted of three main steps being, first, adsorption of volatiles in adsorbent cartridges, followed by thermal desorption and analysis by GC-MS.

(3) After being obtained, the CVOs were thermally desorbed from the SPME cartridges by immediate transfer directly into the injection port (220 °C) of the GC-MS. The injector is operated in splitless mode. The oven temperature was programmed as follows: 40°C for 2 min, increase of 6°C/min to 220°C, held for 4 min leading to a full run of 36 min. Helium is the carrier gas used at a constant linear velocity of 35 cm/s. The GC-MS generates a chromatogram with peaks representing individual compounds.

(4) The identification of compounds is done using the existing library in the GC-MS software and compared to the current data on the metabolomic portal hmdb.ca. The values of the areas obtained will be used for the statistical analyses.

Statistical Analysis of GC-MS data:

The online platform MetaboAnalyst 5.0 (available free of charge at <https://www.metaboanalyst.ca>) was used to carry out all the statistical analysis that requires computational support and is free software. It has numerical precision, contributing to reproducibility in science. And its use is widespread and recommended for this purpose. The chromatogram data obtained by GC were converted into a data matrix using Chromeleon 7.2 softwares (equipment program). Regions containing inferential signals were excluded from the analysis.

The concentrations of the identified metabolites were normalized by the median, followed by the transformation of data in a logarithmic scale (base 10) and the scaling of data by the Pareto scale. Supervised Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) analyzes were performed to identify discriminating metabolites between groups of stool samples. PLS-DA is a supervised method that predicts the association of classes through information obtained by multivariate regression techniques.

We calculated the variations of the metabolites of the samples through the variable importance on projection (VIP); this is score is a weighted sum of squares of the PLS loadings that considers the amount of explained Y-variance of each component . In this study, VIP measurements above 2.0 were considered significant.

RESULTS

Fifty two patients with IBD, 29 UC, and 23 DC. Of these patients, 38 are women and 14 men, with a mean age of 41 years, the youngest being 12 years old and the oldest being 69 years old. 36 patients (69.2%) had fecal calprotectin elevate. There was no statistical difference between the prevalence of inflammation detected by FC levels and the type of IBD ($p > 0.05$).

Seventy-four metabolites were found through the mass spectrometry library (Chromeleon 7.2). Metabolites were compared with data in the Human Metabolome Database (available at <https://hmdb.ca>), 18 of which were unidentified (Unknown). The 56 identified metabolites were: p-cresol, 2-undecanone, undecanal, indoleacetic acid, ethyl decanoate, ethyl-heptane, squalene, 1-decene, naphthalene, pentadecane, trimethyl-dodecathylene, tetradecanal, dodecanoic acid, dodecanoic-ethyl acid -ester, methyl amine, hexadecane, cyclooctasiloxane, dodecanol, trimethyl amine, pentadeicin, pentadecanone, nonadecene, tridecan-1-ol, tricosene, tetradecanoic acid, undecanone, pentadecanoic acid, hexadecanol, heptadecanone, skelene, pentadecanal, cyclodecasiloxane, docosene, acid hexadecanoic acid, palmitic acid, 9-octadecenal, cis-11-hexadecenal, octadecenal, 9-Octadecen-1-ol, linoleoyl chloride, octadecanol, oleic acid, cis-9-hexadecenal, octadecanoic acid, 11-hexadecen-1-ol , cyclononasiloxane, 1-hexadecanol, cyclopentadecane, heptacosane, cyclodecasiloxane, octadecane, docosane, 11-butyl-, quantacure ITX, heptacosane, octacosane.

Figure 1 shows the result of the partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) of samples between DC and UC. The points on the graph represents the metabolic profile of each patient. Thus, patterns of separation can be seen in the data sets. There are patients with distinct profiles between UC and CD, and some in intersection areas where there are metabolites with variations in common between the two groups. The method has good accuracy (0.60) in groups of up to five primary metabolites.

The VIP score classification of the components of the CD and UC groups is shown in Figure 1. It includes the most significant variations of metabolites that discriminate the UC and CD groups by the PLS-DA. Considering necessary VIP measurements above 2.0 as pre-established in the methodology of the work, the metabolites found were (highest score in the group UC): hexadecanoic acid, skelene, and octadecanoic acid. These three mentioned metabolites were used to discriminate the groups through the ROC curve. The area under the curve (ACU) of the model was 0.765 (95% CI 0.35, 1.0).

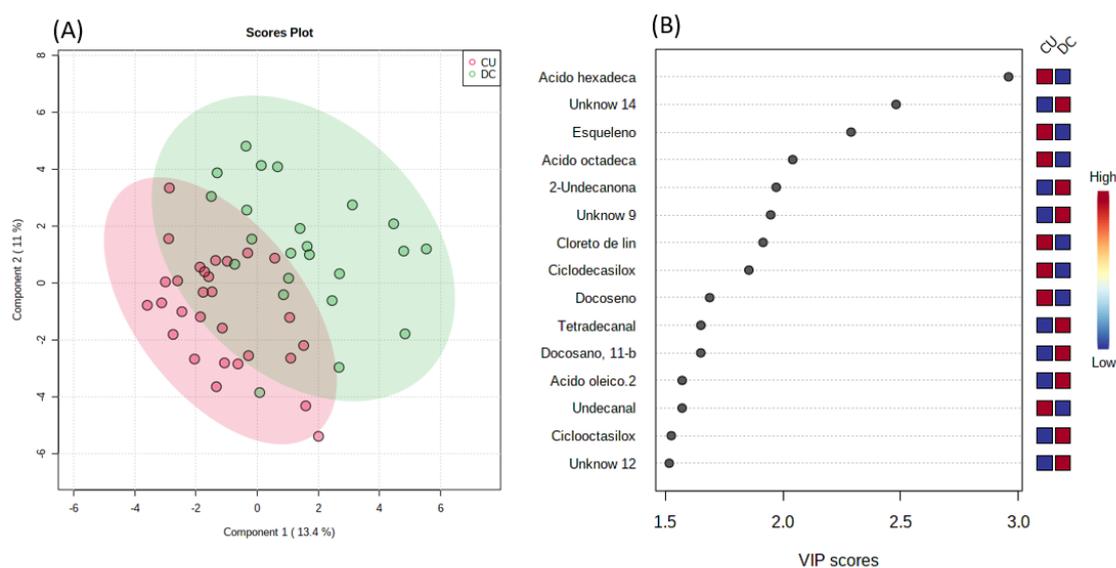


Figure 1: Patterns of separation between Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) by partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) (A). Variable importance in projection (VIP) score (B).

The relationship between the fecal calprotectin and the UC group was performed by PLS-DA, and the patterns of separation between the groups with (FC greater than 200 μ g/g) and without (FC less than 200 μ g/g) disease activity, are shown in Figure 2. The separation standards for the datasets showed good accuracy (0.65). The main metabolites found in this analysis were: octadecanoic acid (highest score in the group > 200), 11-hexadecen-1 (highest score in the group < 200), hexadecanoic acid (highest score in the group > 200), and pentadecanone (highest score in the group < 200). The ROC curve using such metabolites has resulted in an ACU of 0.77 within the confidence interval (95% CI 0.37, 0.98). We consider that disease activity can be identified by metabolomics, with the presence of octadecanoic acid and hexadecanoic acid.

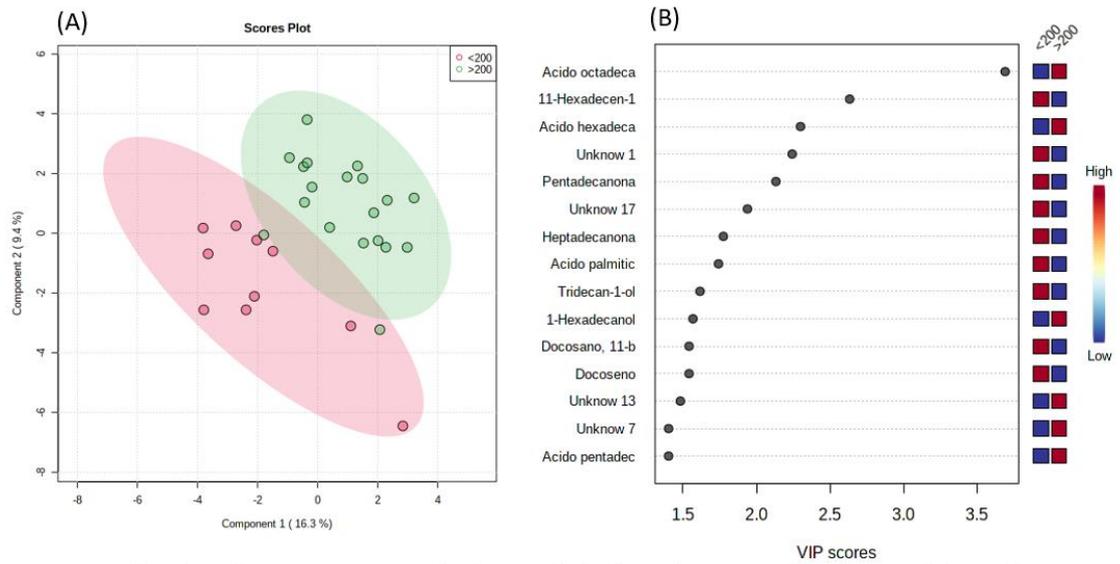


Figure 2: Ulcerative colitis - Patterns of separation between fecal calprotectina > 200 µg/g and < 200 µg/g by partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) (A). Variable importance in projection (VIP) score (B).

In patients with CD, the analysis by PLS-DA by evaluating remission and disease activity by the FC value shows a pattern of separation with a distinction between groups. The separation standards for the datasets showed good accuracy (0.60). Figure 3 shows metabolites that differentiate disease activity in CD. Using the VIP: octadecanoic acid (highest score in the group > 200), cyclodecasiloxone (highest score in the group < 200), oleic acid-1 (highest score in the group < 200), and cyclopentadecanoic acid (highest score in the group > 200). The ROC curve, using such metabolites, shows ACU 0.85 within the confidence interval (95% CI 0-1). Octadecanoic acid, as in the CD group, is the most relevant metabolite in patients with disease activity (FC greater than 200µg/g).

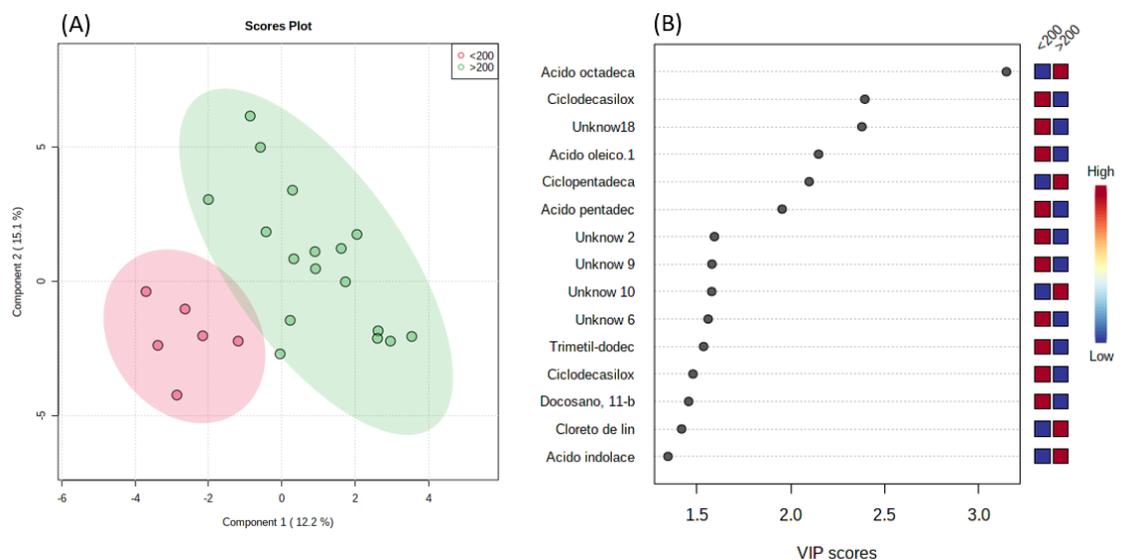


Figure 3: Crohn's disease - Patterns of separation between fecal calprotectina > 200 µg/g and < 200 µg/g by partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) (A). Variable importance in projection (VIP) score (B).

DISCUSSION

We analyzed patients' metabolic profile of IBD and its subtypes (CD and UC). We know that the metabolites produced by the intestinal microbiota provide information about metabolism and its products, having important clinical outcomes [19]. Authors identified mechanistic and causal relationships between bacteria and metabolites that were abundant in IBD [20]. Analyses of metabolites are usually performed by fecal samples, urine, and plasma, not requiring invasive procedures [19]. In our study, the analysis was performed on fecal samples by mass spectrometry using the GC-MS technique, and a signature of the IBD metabolome was identified, with differences in the patterns of the metabolites for CD and UC. Other research has already demonstrated statistical differences between the metabolites in IBD; one of them showed 14 metabolites among fecal samples from 68 patients with UC and 13 with CD [19]. In another study, using a multivariate approach between fecal samples in IBD, discrimination between patients with CD and UC was demonstrated [21].

In our study we identify different metabolites in CD and UC that differentiated one each other in: hexadecanoic acid, skelene and octadecanoic acid. Studies show increased levels of primary bile acids, α -amino acids and sphingolipids in patients with IBD. There is also a decrease in several metabolic groups, such as cholesterol, phenylbenzodioxanes, indoles, tetrapyrroles and long-chain fatty acids [20]. Differences were identified in the metabolites of fecal samples, serum and mucosa from patients with IBD compared to healthy subjects, with elevated taurine and cadaverine levels in UC, and carnosine, ribose and choline correlated with inflammation (identified by FC).

For ileal CD, tryptophan, bile acids and unsaturated fatty acids showed considerable increase. There is also a decrease in several metabolic groups, such as cholesterol, phenylbenzodioxanes, indoles, tetrapyrroles, and long-chain fatty acids [20]. Different metabolites were identified in the fecal samples, serum, and mucosa from patients with IBD compared to healthy subjects, with elevated taurine and cadaverine levels in UC, carnosine, ribose, and choline correlated with inflammation (identified by FC). For ileal CD, tryptophan, bile acids, and unsaturated fatty acids showed a considerable increase [22]. There was no similarity between the metabolites described in these studies and those found in our work. There was no similarity between the metabolites described in these studies and those found in our work because we lost some material, which may have contributed to the divergence of results. [22].

IBD-related inflammation promotes variations in the metabolome. This hypothesis was confirmed by correlating the metabolite profile variation with FC, a biomarker of disease activity and inflammation [20]. Patients in remission have microbiomes and metabolomes similar to their healthy first-degree relatives [22]. In line with the findings in the literature in the present study, we were able to assign a metabolomic signature to patients in disease activity and remission, both in CD and UC. Active CD, octadecanoic acid, cyclopentasiloxane, oleic-1 and cyclo pentadecanoic acid were the metabolites with the most significant variation in patients in remission; in the UC, octadecanoic acid, 11-hexadecen-1, hexadecanoic acid, and pentadecanone were the most commonly found metabolites. However, it is essential to remember that the associations of disease staging with metabolome do not necessarily imply a causal relationship. Other factors can induce metabolites, such as eating habits [19]. Due to these variations, some patients change from what would be expected for their metabolite profile.

There is a relationship between host disease, microorganisms, and metabolites; however, questions about the change in physiology and the impact of metabolites on the intestinal flora need to be studied. The works usually

perform a metabolome combination and analyze a small subset of already known molecules. Most metabolites are uncharacterized, but there is potential to identify new disease-associated molecules. The computational approach plays a vital role in prioritizing associations of microbial metabolism and its relationship with diseases. Thus, therapeutic approaches can inhibit the microbial metabolism associated with the disease or increase beneficial metabolites and their corresponding microorganisms, such as probiotic treatment and intestinal microbiota transplantation (IMT) [22].

Future perspectives:

IMT is used in cases of *Clostridium difficile* infection, in which an altered bile acid profile is observed, similar to patients with active IBD. These metabolites, after transplantation, could be restored, a well-established treatment in the literature. Although this similarity in metabolic variation, transplantation in IBD is not consensual. TMF can be used to induce remission of UC. A 2018 study demonstrated that patients' microbial and metabolomic profiles changed, moving towards the donor. There was a reduction in acetate levels and an increase in butyrate levels after transplantation [20]. Although the metabolites found in our study differ from the most relevant ones in the literature, we were able to attribute the metabolic signature of the groups, being able to attribute to metabolomics, a follow-up examination in IMT therapy.

CONCLUSION:

The main biomarkers found in IBD were: hexadecanoic acid, squalene and octadecanoic acid. In CUI, the biomarkers that assess disease activity and remission are octadecanoic acid, cyclodecasiloxone, oleic acid-1, and cyclopentadecanoic acid. While in CD, the biomarkers found were: octadecanoic acid, cyclodecasiloxone, oleic acid-1, and cyclopentadecanoic acid. In this way, metabolomics can be an alternative to evaluate the inflammatory activity similar to what we currently use FC, but more studies are needed to prove the method's effectiveness.

REFERÊNCIAS

1. PILLAI, Nadia et al. A systematic review of cost-effectiveness studies comparing conventional biological and surgical interventions for inflammatory bowel disease **PloS one** v. 12, n. 10, p e0185500, 2017.
2. VENNOU, Konstantina E. et al. Multiple outcome meta-analysis of gene-expression data in inflammatory bowel disease. **Genomics**, v. 112, n. 2, p. 1761-1767, 2020.
3. URBANO, Ana Paula Signori, et al. Associations among body composition, inflammatory profile and disease extent in ulcerative colitis patients. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 64, p. 133-139, 2018.
4. BARROS, Petrilie André Cavalcante de; SILVA, Alberson Maylson Ramos da; LINS NETO, MÁdf. The epidemiological profile of inflammatory bowel disease patients on biologic therapy at a public hospital in Alagoas. **Journal of Coloproctology (Rio de Janeiro)**, v. 34, p. 131-135, 2014.
5. KAPLAN, Gilaad G. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. **Nature Reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 12, n. 12, p. 720-727, 2015.
6. PARENTE, J. M. L. Demographic characteristics and clinical phenotypes of inflammatory bowel diseases in Northeastern Brazil. **UNICAMP**, 2014.
7. KAMAT, Nagesh, et al. Cost of illness in inflammatory bowel disease. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 62, n. 9, p. 2318-2326, 2017.
8. ROCCHI, Angela, et al. Inflammatory bowel disease: a Canadian burden of illness review. **Canadian Journal of Gastroenterology**, v. 26, n. 11, p. 811-817, 2012.
9. WILLEY, J. M., SHERWOOD, L. M.; WOOLVERTON, C. J. Nonspecific (innate) Host Resistance. **Prescott's Principles of Microbiology**. McGraw-Hill Higher International Education, p. 656-677. 2009.
10. FIOCCHI, C; PEREIRA, H. S. S. Intestinal microbiota – Its importance and function. **Brazilian Journal of Medicine**, v. 100, p. 30-38, 2012.

11. VERMEIRE, S. M.; KRISTIN, J. et al. Donor species richness determines the success of fecal microbiota transplantation in inflammatory bowel disease
12. CAMMAROTA, Giovanni, et al. Gut microbiota modulation: probiotics, antibiotics or fecal microbiota transplantation?. **Internal and emergency medicine**, v. 9, n. 4, p. 365-373, 2014.
13. ISHIKAWA, Hideki, et al. Beneficial effects of probiotic bifidobacterium and galacto-oligosaccharide in patients with ulcerative colitis: a randomized controlled study. **Digestion**, v. 84, n. 2, p. 128-133, 2011.
14. KHAKI-KHATIBI, Fatemeh, et al. Calprotectin in inflammatory bowel disease. **Clinica chimica acta**, v. 510, p. 556-565, 2020.
15. ROKKAS, Theodore; PORTINCASA, Piero; KOUTROUBAKIS, Ioannis E. Fecal calprotectin in assessing inflammatory bowel disease endoscopic activity: a diagnostic accuracy meta-analysis. **Journal of Gastrointestinal & Liver Diseases**, v. 27, n. 3, 2018.
16. VIEIRA, Andrea, et al. Inflammatory bowel disease activity assessed by fecal calprotectin and lactoferrin: correlation with laboratory parameters, clinical, endoscopic and histological indexes. **BMC research notes**, v. 2, n. 1, p. 1-7, 2009.
17. KESHTELI, Ammar Hassanzadeh, et al. Dietary and metabolomic determinants of relapse in ulcerative colitis patients: a pilot prospective cohort study. **World Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 21, p. 3890, 2017.
18. BJARNASON, Ingvar. The use of fecal calprotectin in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology & Hepatology**, v. 13, n. 1, p. 53, 2017.
19. DE PRETER, Vicky et al. Faecal metabolite profiling identify medium-chain fatty acids as discriminating compounds in IBD. **Gut**, v. 64, n. 3, p. 447-458, 2015.
20. LAVELLE, Aonghus; SOKOL, Harry. Gut microbiota-derived metabolites as key actors in inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 17, n. 4, p. 223-237, 2020.
21. MARCHESI, Julian R. et al. Rapid and noninvasive metabonomic characterization of inflammatory bowel disease. **Journal of proteome research**, v. 6, n. 2, p. 546-551, 2007.
22. SCHIRMER, Melanie, et al. Microbial genes, and pathways in inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 8, p. 497-511, 2019.

6. DISCUSSÃO

No nosso estudo, analisamos o perfil metabólico na DII e seus subtipos (DC e CUI). Sabe-se que os metabólitos produzidos pela microbiota intestinal fornecem informações sobre o metabolismo e seus produtos, tendo importância para desfechos clínicos (DE PRETER et al., 2015). Autores identificaram relações mecanicistas e causais entre bactérias e metabólitos que eram abundantes na DII. (AONGHUS et al., 2020). As análises dos metabólitos geralmente são realizadas por amostras fecais, urina e plasma, não sendo necessário procedimentos invasivos (DE PRETER et al., 2015). Em nosso trabalho, a análise foi realizada em amostras fecais por espectrometria de massas pela técnica GC-MS, sendo identificada uma assinatura do metaboloma da DII, com diferenças nos padrões dos metabólitos para a DC e para a CUI. Outras pesquisas já demonstraram diferenças estatísticas entre os metabólitos na DII; uma delas apresentou 14 metabólitos entre amostras fecais de 68 pacientes com CUI e 13 com DC (DE PRETER et al., 2015). Em outro estudo, utilizando de abordagem multivariada entre amostras fecais na DII, demonstrou-se discriminação entre pacientes com DC e CUI (MARCHESI et al., 2007).

Os principais metabólitos encontrados em nosso trabalho na diferenciação da DC da CUI foram: ácido hexadecanóico, esqueleno e ácido octadecanoico. Estudos mostram aumento dos níveis de ácidos biliares primários, α -aminoácidos e esfingolipídios em pacientes com DII. Há também a diminuição de vários grupos metabólicos, como o colesterol, fenilbenzodioxanos, indóis, tetrapirróis e ácidos graxos de cadeia longa (AONGHUS et al., 2020). Foram identificadas diferenças nos metabólitos de amostras fecais, soro e mucosa de paciente com DII em comparação a indivíduos saudáveis, com níveis de taurina e cadaverina elevados na CU, e carnosina, ribose e colina correlacionados com inflamação (identificada pela CF). Para DC ileal, o triptofano, ácidos biliares e ácidos graxos insaturados apresentaram aumento considerável (MELANIE et al., 2019). Não houve semelhança entre os metabólitos descritos nesses estudos e os encontrados em nosso trabalho. Acredita-se que a perda do nosso material analisado, impossibilitando a análise de cadeias lipídicas, pode ter contribuído para a divergência de resultados.

A inflamação relacionada a DII promove variações no metaboloma. Essa hipótese foi confirmada correlacionando a variação do perfil metabólito com a CF, que é um biomarcador de atividade de doença e inflamação (AONGHUS 2020). Os pacientes em remissão de doença apresentam microbiomas e metaboloma semelhante a seus parentes sadios de primeiro grau

(MELANIE 2019). Em consonância com os achados da literatura na presente pesquisa, conseguimos atribuir uma assinatura metabolômica para os pacientes em atividade de doença e em remissão, tanto na DC quanto na CUI. Na DC em atividade, o ácido octadecanoico, a ciclodecasiloxona, o ácido oleico-1 e o ciclopentadecanoico foram os metabólitos com maior variação em relação aos pacientes em remissão; já na CUI foram o ácido octadecanoico, 11-hexadecen-1, ácido hexadecanoico e a pentadecanona os metabólitos mais encontrados.

Contudo, é importante lembrar que as associações do estadiamento da doença com metaboloma não implicam necessariamente numa relação causal. Os metabólitos encontrados podem ser induzidos por outros fatores, como, por exemplo, hábitos alimentares (DE PRETER et al., 2015). Supõe-se que, devido a essas variações, alguns pacientes fujam do que seria esperado para o seu perfil metabólico.

Existe relação entre doença do hospedeiro, microorganismos e metabólitos; porém questões sobre a alteração da fisiologia e o impacto dos metabólitos na flora intestinal precisam ser estudadas. Os trabalhos geralmente realizam uma combinação do metaboloma e analisam um pequeno subconjunto de moléculas já conhecidas. A maioria dos metabólitos não são caracterizados, porém há potencial para identificar novas moléculas associadas a doenças. A abordagem computacional tem um papel importante na priorização de associações do metabolismo microbiano e sua relação com as doenças. Com isso, abordagens terapêuticas podem ser utilizadas na inibição do metabolismo microbiano associado à doença, ou que aumentam metabólitos benéficos e seus microorganismos correspondentes, como o tratamento com probióticos e o transplante de microbiota intestinal (TMI) (MELANIE et al., 2019).

Perspectivas futuras

O TMI é uma proposta terapêutica para a DII. Ele é utilizado nos casos de infecção por *Clostridium difficile*, em que se percebe um perfil de ácidos biliares alterados, semelhantes a pacientes com DII em atividade. Esses metabólitos são restaurados após transplante de forma eficaz, sendo um tratamento já bem estabelecido na literatura. Embora exista essa semelhança da variação metabólica, o transplante na DII não é consensual. TMF pode ser utilizado na indução da remissão da CUI. Um estudo de 2018 demonstrou que o perfil microbiano e metabolômico dos pacientes modificaram, movendo-se em direção ao doador. Houve uma redução nos níveis de acetato e aumento dos níveis de bupirato nos pós transplante (AONGHUS et al., 2020). Embora os metabólitos encontrados no nosso estudo diverjam dos mais relevantes

na literatura, conseguimos atribuir uma assinatura metabólica dos grupos, podendo atribuir à metabolômica um exame de acompanhamento na terapêutica do TMI.

7. CONCLUSÃO

Os principais biomarcadores encontrados na DII foram: o ácido hexadecanóico, o esqualeno e o ácido octadecanóico. Na CUI os biomarcadores que se destacam para avaliar atividade e remissão da doença são: o ácido octadecanóico, ciclodecasiloxona, ácido oleico-1 e o ciclopentadecanóico. Enquanto na DC os biomarcadores encontrados foram: ácido octadecanóico, ciclodecasiloxona, ácido oleico-1 e o ciclopentadecanóico. Houve uma correlação entre a CF acima de 800µg/g e a presença dos biomarcadores: ácido octadecanóico, 11-hexadecen-1, pentadecanona e ácido oléico-2.

Desta forma a metabolômica pode ser uma alternativa para avaliar a atividade inflamatória semelhante ao que utilizamos atualmente (a CF), porém são necessários mais estudos para comprovar a eficácia do método.

REFERÊNCIAS

1. BARROS, Petrille André Cavalcante de; SILVA, Alberson Maylson Ramos da; LINS NETO, MÁdf. The epidemiological profile of inflammatory bowel disease patients on biologic therapy at a public hospital in Alagoas. **Journal of Coloproctology (Rio de Janeiro)**, v. 34, p. 131-135, 2014.
2. BJARNASON, Ingvar. The use of fecal calprotectin in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology & hepatology**, v. 13, n. 1, p. 53, 2017.
3. BJERRUM, Jacob Tveiten et al. Metabonomics of human fecal extracts characterize ulcerative colitis, Crohn's disease and healthy individuals. **Metabolomics**, v. 11, n. 1, p. 122-133, 2015.
4. CAMMAROTA, Giovanni et al. Gut microbiota modulation: probiotics, antibiotics or fecal microbiota transplantation?. **Internal and emergency medicine**, v. 9, n. 4, p. 365-373, 2014.
5. Clinical protocol and Therapeutic guidelines (PCDT) of Crohn's disease 2017. Ministry of Health – Department of health care Joint Ordinance Nº 14.
6. D'ODORICO, Irene et al. Role of fecal microbiota transplantation in inflammatory bowel disease. **Journal of digestive diseases**, v. 19, n. 6, p. 322-334, 2018.
7. DE PRETER, Vicky et al. Faecal metabolite profiling identifies medium-chain fatty acids as discriminating compounds in IBD. **Gut**, v. 64, n. 3, p. 447-458, 2015.
8. FIOCCHI, C; PEREIRA, H. S. S. Intestinal microbiota – Its importance and function. **Brazilian Journal of Medicine**, v. 100, p. 30-38, 2012.
9. FIORI, Jessica et al. Assessment of gut microbiota fecal metabolites by chromatographic targeted approaches. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 177, p. 112867, 2020.
10. GALLAGHER, Kate et al. Metabolomic analysis in inflammatory bowel disease: a systematic review. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 15, n. 5, p. 813-826, 2021.
11. GEVERS, Dirk et al. The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease. **Cell host & microbe**, v. 15, n. 3, p. 382-392, 2014.
12. HANG, Junjie et al. The joint effects of lifestyle factors and comorbidities on the risk of colorectal cancer: a large Chinese retrospective case-control study. **PloS one**, v. 10, n. 12, p. e0143696, 2015.
13. ISHIKAWA, Hideki et al. Beneficial effects of probiotic bifidobacterium and galacto-oligosaccharide in patients with ulcerative colitis: a randomized controlled study. **Digestion**, v. 84, n. 2, p. 128-133, 2011.
14. KAMAT, Nagesh et al. Cost of illness in inflammatory bowel disease. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 62, n. 9, p. 2318-2326, 2017.
15. KAPLAN, Gilaad G. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 12, n. 12, p. 720-727, 2015.
16. KESHTELI, Ammar Hassanzadeh et al. Dietary and metabolomic determinants of relapse in ulcerative colitis patients: a pilot prospective cohort study. **World Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 21, p. 3890, 2017.
17. KHAKI-KHATIBI, Fatemeh et al. Calprotectin in inflammatory bowel disease. **Clinica chimica acta**, v. 510, p. 556-565, 2020.
18. LAVELLE, Aonghus; SOKOL, Harry. Gut microbiota-derived metabolites as key actors in inflammatory bowel disease. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 17, n. 4, p. 223-237, 2020.
19. LOZUPONE, Catherine A. et al. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. **Nature**, v. 489, n. 7415, p. 220-230, 2012.
20. MACKNER, Laura M. et al. Fecal microbiota and metabolites are distinct in a pilot study of pediatric Crohn's disease patients with higher levels of perceived stress. **Psychoneuroendocrinology**, v. 111, p. 104469, 2020.
21. MADIGAN, Michael T. et al. **Brock biology of microorganisms**. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall, 2006.
22. MARCHESI, Julian R. et al. Rapid and noninvasive metabonomic characterization of inflammatory bowel disease. **Journal of proteome research**, v. 6, n. 2, p. 546-551, 2007.
23. PARENTE, J. M. L. Demographic characteristics and clinical phenotypes of inflammatory bowel diseases in Northeastern Brazil. **UNICAMP**, 2014.
24. PILLAI, Nadia et al. A systematic review of cost-effectiveness studies comparing conventional, biological and surgical interventions for inflammatory bowel disease. **PloS one**, v. 12, n. 10, p. e0185500, 2017.
25. PREIDIS, Geoffrey A.; VERSALOVIC, James. Targeting the human microbiome with antibiotics, probiotics, and prebiotics: gastroenterology enters the metagenomics era. **Gastroenterology**, v. 136, n. 6, p. 2015-2031, 2009.
26. ROCCHI, Angela et al. Inflammatory bowel disease: a Canadian burden of illness review. **Canadian Journal of Gastroenterology**, v. 26, n. 11, p. 811-817, 2012.

27. ROKKAS, Theodore; PORTINCASA, Piero; KOUTROUBAKIS, Ioannis E. Fecal calprotectin in assessing inflammatory bowel disease endoscopic activity: a diagnostic accuracy meta-analysis. **Journal of Gastrointestinal & Liver Diseases**, v. 27, n. 3, 2018.
28. SAIRENJI, Tomoko; COLLINS, Kimberly L.; EVANS, David V. An update on inflammatory bowel disease. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 44, n. 4, p. 673-692, 2017.
29. SANTORU, Maria Laura et al. Cross sectional evaluation of the gut-microbiome metabolome axis in an Italian cohort of IBD patients. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2017.
30. SCHIRMER, Melanie et al. Microbial genes and pathways in inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 8, p. 497-511, 2019.
31. SKELLY, Ashwin N. et al. Mining the microbiota for microbial and metabolite-based immunotherapies. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 5, p. 305-323, 2019.
32. SOUZA, Mardem Machado de; BELASCO, Angélica Gonçalves Silva; AGUILAR-NASCIMENTO, José Eduardo de. The epidemiological profile of patients with inflammatory Bowel disease in the State of Mato Grosso. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 28, p. 324-328, 2008.
33. URBANO, Ana Paula Signori et al. Associations among body composition, inflammatory profile and disease extent in ulcerative colitis patients. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 64, p. 133-139, 2018.
34. VENNOU, Konstantina E. et al. Multiple outcome meta-analysis of gene-expression data in inflammatory bowel disease. **Genomics**, v. 112, n. 2, p. 1761-1767, 2020.
35. VERMEIRE, S. M.; KRISTIN, J. et al. Donor species richness determines the success of fecal microbiota transplantation in inflammatory bowel disease.
36. VIEIRA, Andrea et al. Inflammatory bowel disease activity assessed by fecal calprotectin and lactoferrin: correlation with laboratory parameters, clinical, endoscopic and histological indexes. **BMC research notes**, v. 2, n. 1, p. 1-7, 2009.
37. VINDIGNI, Stephen M.; SURAWICZ, Christina M. Fecal microbiota transplantation. **Gastroenterology Clinics**, v. 46, n. 1, p. 171-185, 2017.
38. WILLEY, J. M., SHERWOOD, L. M.; WOOLVERTON, C. J. Nonspecific (innate) Host Resistance. **Prescott's Principles of Microbiology**. McGraw-Hill Higher International Education, p. 656-677. 2009.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE

Eu _____, fui convidado(a) a participar como voluntário (a) do estudo “Eficácia Clínica do Transplante da Microbiota Intestinal em Pacientes com DIIs” recebi do Prof. Dr. Manoel Álvaro de Freitas Lins Neto, chefe do Serviço de Coloproctologia do HUPAA-UFAL- Universidade Federal de Alagoas, responsável por sua execução, as seguintes informações que me fizeram entender sem dificuldades e sem dúvidas os seguintes aspectos:

- Que o estudo se destina a: avaliar a eficácia do transplante da microbiota intestinal em paciente com doenças inflamatórias intestinais;
- Que a importância deste estudo é a de: auxiliar os médicos, nutricionistas e demais profissionais da área da saúde para que tenham um melhor conhecimento sobre a nossa realidade e assim possam oferecer um atendimento mais adequado e individualizado aos pacientes portadores de doença inflamatória intestinal;
- Que os resultados que se desejam alcançar são os seguintes: melhorar e alterar o prognóstico e tratamento das doenças inflamatórias intestinais, evitar o uso de medicações de alto custo e melhorando ou evitando o tratamento convencional;
- Que a coleta de dados deste estudo começará em setembro de 2019 e setembro de 2020;
- Que o estudo será feito da seguinte maneira: para o estudo serão necessários coletar os dados: gênero, idade, altura, peso, dobra cutânea tricípital, circunferência do braço; que não trarão nenhum risco à sua saúde. Também serão coletados exames laboratoriais como: proteína-C-reativa, albumina, hemograma, calprotectina fecal que será pelo exame de fezes. Esses dados coletados não terão nenhum risco ao senhor(a), e não trazem nenhum tipo de dano e essas medidas não causam dor.
- Os exames laboratoriais, serão colhidos durante seu acompanhamento ambulatorial e não serão acrescentados nenhuma coleta extra para o projeto. Os pacientes que não aceitarem participar do projeto ou aqueles que não se adequam aos critérios propostos permanecerão tendo o mesmo acompanhamento.
- O termo de responsabilidade da realização do exame de colonoscopia se encontra em anexo a este documento, com todas as implicações associadas ao procedimento;
- Que eu participarei das seguintes etapas: entrevista inicial, avaliação nutricional, com coleta de dados: altura, peso, dobra cutânea tricípital, circunferência do braço; exames laboratoriais de sangue e a coleta de fezes;
- Que os incômodos que poderei sentir com a minha participação são os seguintes: a punção venosa durante a coleta de sangue e leve pressão na aferição da dobra cutânea tricípital, algum possível constrangimento para entrega das fezes coletadas;
- Que os possíveis riscos à minha saúde física e mental seriam aqueles relacionados às etapas de coleta das fezes, coleta de sangue e colonoscopia;
- Que terei toda assistência da equipe que realizarão as coletas: médicos, enfermeiros, nutricionistas, técnicos de enfermagem, entre outros;
- Que a minha participação será acompanhada com a assistência da equipe multiprofissional do ambulatório de Coloproctologia do HUPAA;
- Que, sempre que desejar, serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo;
- Que eu serei informado sobre o resultado final da pesquisa, assim como resultado dos meus exames realizados;

- Que, a qualquer momento, eu poderei recusar a continuar participando do estudo e, também, que eu poderei retirar meu consentimento, sem que isso me traga qualquer penalidade ou prejuízo;
- Que as informações conseguidas através da minha participação não permitirão a identificação da minha pessoa, exceto aos responsáveis pelo estudo, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto;
- Que o estudo não acarretará nenhuma despesa para o participante da pesquisa; E será garantida a indenização (nexo causal) judicial ou extrajudicial pela equipe de pesquisa se porventura ocorrer algum tipo de dano durante a participação do indivíduo no período da pesquisa.
- Que eu receberei uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- Finalmente, tendo eu compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo e estando consciente dos direitos, das responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a participação implica, concordo em autorizar a participação e para isso eu DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

Endereço d(o,a) paciente e/ou responsável

Domicílio: (rua, praça, conjunto):

Bloco: /Nº: /Complemento:

Bairro: /CEP/Cidade: /Telefone:

Ponto de referência:

Contato de urgência: Júnia Elisa Carvalho de Meira / Lucas Correia

Domicílio: Rua Antônio Fellinto, 93

Bloco: Complemento:

Bairro: Riacho Doce /CEP: 57039-520 /Cidade: Maceió /Telefone: (82) 981817755

Ponto de referência:

Endereço da responsável da pesquisa:

Nome: Júnia Elisa Carvalho de Meira / Lucas Correia

E-mail: junia.meira@gmail.com / ucas0@hotmail.com (preferência por contato via e-mail)

Telefone: (82) 981817755 (Junia) / (82) 8809-5957 (Lucas)

Ponto de referência:

ATENÇÃO: Para informar ocorrências irregulares ou danosas durante a sua participação no estudo, dirija-se ao:

Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas

Prédio da Reitoria, 1º Andar, Campus A. C. Simões, Cidade Universitária

Telefone: 3214-1041, Maceió-AL

Maceió, ___/___/___	
Assinatura ou impressão datiloscópica d(o,a) voluntári(o,a) ou responsável legal e rubricar as demais folhas	Nome e Assinatura do(s) responsável (eis) pelo estudo (Rubricar as demais páginas)

APÊNDICE B – Termo de Assentimento Livre e Esclarecido – TALE

Você _____, responsável pelo menor _____, está sendo convidado(a) a participar do estudo “Eficácia Clínica do Transplante da Microbiota Intestinal em Pacientes com DIIs” recebi do Prof. Dr. Manoel Álvaro de Freitas Lins Neto, chefe do Serviço de Coloproctologia do HUPAA-UFAL- Universidade Federal de Alagoas, responsável por sua execução, as seguintes informações que me fizeram entender sem dificuldades e sem dúvidas os seguintes aspectos:

- Que o estudo se destina a: avaliar a eficácia do transplante da microbiota intestinal em paciente com doenças inflamatórias intestinais;
- Que a importância deste estudo é a de: auxiliar os médicos, nutricionistas e demais profissionais da área da saúde para que tenham um melhor conhecimento sobre a nossa realidade e assim possam oferecer um atendimento mais adequado e individualizado aos pacientes portadores de doença inflamatória intestinal;
- Que os resultados que se desejam alcançar são os seguintes: melhorar e alterar o prognóstico e tratamento das doenças inflamatórias intestinais, evitar o uso de medicações de alto custo e melhorando ou evitando o tratamento convencional;
- Que a coleta de dados deste estudo começará em setembro de 2019 e setembro de 2020;
- Que o estudo será feito da seguinte maneira: para o estudo serão necessários coletar os dados: gênero, idade, altura, peso, dobra cutânea tricípital, circunferência do braço; que não trarão nenhum risco à sua saúde. Também serão coletados exames laboratoriais como: proteína-C-reativa, albumina, hemograma, calprotectina fecal que será pelo exame de fezes. Esses dados coletados não terão nenhum risco ao senhor(a), e não trazem nenhum tipo de dano e essas medidas não causam dor.
- Os exames laboratoriais, serão colhidos durante seu acompanhamento ambulatorial e não serão acrescentados nenhuma coleta extra para o projeto. Os pacientes que não aceitarem participar do projeto ou aqueles que não se adequam aos critérios propostos permanecerão tendo o mesmo acompanhamento.
- O termo de responsabilidade da realização do exame de colonoscopia se encontra em anexo a este documento, com todas as implicações associadas ao procedimento;
- Que eu participarei das seguintes etapas: entrevista inicial, avaliação nutricional, com coleta de dados: altura, peso, dobra cutânea tricípital, circunferência do braço; exames laboratoriais de sangue e a coleta de fezes;
- Que os incômodos que poderei sentir com a minha participação são os seguintes: a punção venosa durante a coleta de sangue e leve pressão na aferição da dobra cutânea tricípital, algum possível constrangimento para entrega das fezes coletadas;
- Que os possíveis riscos à minha saúde física e mental seriam aqueles relacionados às etapas de coleta das fezes, coleta de sangue e colonoscopia;
- Que terei toda assistência da equipe que realizarão as coletas: médicos, enfermeiros, nutricionistas, técnicos de enfermagem, entre outros;
- Que a minha participação será acompanhada com a assistência da equipe multiprofissional do ambulatório de Coloproctologia do HUPPA;
- Que, sempre que desejar, serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo;
- Que eu serei informado sobre o resultado final da pesquisa, assim como resultado dos meus exames realizados;
- Que, a qualquer momento, eu poderei recusar a continuar participando do estudo e, também, que eu poderei retirar meu consentimento, sem que isso me traga qualquer penalidade ou prejuízo;

- Que as informações conseguidas através da minha participação não permitirão a identificação da minha pessoa, exceto aos responsáveis pelo estudo, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto;
- Que o estudo não acarretará nenhuma despesa para o participante da pesquisa; E será garantida a indenização (nexo causal) judicial ou extrajudicial pela equipe de pesquisa se porventura ocorrer algum tipo de dano durante a participação do indivíduo no período da pesquisa.
- Que eu receberei uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- Finalmente, tendo eu compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo e estando consciente dos direitos, das responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a participação implica, concordo em autorizar a participação e para isso eu DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

Endereço d(o,a) responsável

Domicílio: (rua, praça, conjunto):
 Bloco: /Nº: /Complemento:
 Bairro: /CEP/Cidade: /Telefone:
 Ponto de referência:

Contato de urgência: Júnia Elisa Carvalho de Meira / Lucas Correia

Domicílio: Rua Antônio Fellinto, 93
 Bloco: Complemento:
 Bairro: Riacho Doce /CEP: 57039-520 /Cidade: Maceió /Telefone: (82) 981817755
 Ponto de referência:

Endereço da responsável da pesquisa:

Nome: Júnia Elisa Carvalho de Meira / Lucas Correia
 E-mail: junia.meira@gmail.com / ucas0@hotmail.com (preferência por contato via e-mail)
 Telefone: (82) 981817755 (Junia) / (82) 8809-5957 (Lucas)
 Ponto de referência:

ATENÇÃO: Para informar ocorrências irregulares ou danosas durante a sua participação no estudo, dirija-se ao:

**Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas
 Prédio da Reitoria, 1º Andar, Campus A. C. Simões, Cidade Universitária
 Telefone: 3214-1041, Maceió-AL**

Maceió, ___/___/___

Assinatura ou impressão datiloscópica d(o,a) responsável legal e rubricar as demais folhas

Nome e Assinatura do(s) responsável (eis) pelo estudo (Rubricar as demais páginas)

ANEXO

ANEXO A – Normas do periódico *International Journal of Colorectal Disease*.

<https://www.springer.com/journal/384/submission-guidelines>

Title

The title should be concise and informative.

Author information

The name(s) of the author(s)

The affiliation(s) of the author(s), i.e. institution, (department), city, (state), country

A clear indication and an active e-mail address of the corresponding author

If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

If address information is provided with the affiliation(s) it will also be published.

For authors that are (temporarily) unaffiliated we will only capture their city and country of residence, not their e-mail address unless specifically requested.

Abstract

Please provide a structured abstract of 150 to 250 words which should be divided into the following sections:

Purpose (stating the main purposes and research question)

Methods

Results

Conclusion

For life science journals only (when applicable)

Trial registration number and date of registration for prospectively registered trials

Trial registration number and date of registration followed by “retrospectively registered”, for retrospectively registered trials

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Statements and Declarations

The following statements should be included under the heading "Statements and Declarations" for inclusion in the published paper. Please note that submissions that do not include relevant declarations will be returned as incomplete.

Competing Interests: Authors are required to disclose financial or non-financial interests that are directly or indirectly related to the work submitted for publication. Please refer to "Competing Interests and Funding" below for more information on how to complete this section.

Please see the relevant sections in the submission guidelines for further information as well as various examples of wording. Please revise/customize the sample statements according to your own needs.

Please note:

If the article was written by two lead authors, the title page must include a footnote stating that "author xx and author yy contributed equally...".

The total number of authors should not exceed 12.

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX. We recommend using Springer Nature's LaTeX template.

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

References

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

- 1. Negotiation research spans many disciplines [3].*
- 2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].*
- 3. This effect has been widely studied [1-3, 7].*

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text.

The entries in the list should be numbered consecutively.

If available, please always include DOIs as full DOI links in your reference list (e.g. “<https://doi.org/abc>”).

- Journal article*

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. Eur J Appl Physiol 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. N Engl J Med 341:325–329

- *Article by DOI*

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. J Mol Med. <https://doi.org/10.1007/s001090000086>

- *Book*

South J, Blass B (2001) The future of modern genomics. Blackwell, London

- *Book chapter*

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- *Online document*

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- *Dissertation*

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see [ISSN.org LTWA](http://www.issn.org/LTWA)

If you are unsure, please use the full journal title.

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibliography style file `sn-basic.bst` which is included in the [Springer Nature Article Template](#).