

DRA. ELLEN CRISTINA SOUZA DE OLIVIERA

**Avaliação da permeabilidade intestinal e disbiose de pacientes portadores
de Doença Inflamatória Intestinal (DII) e associação com
Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA)**

Relatório de Pós-doutorado realizado na
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” (UNESP), Faculdade de
Medicina de Botucatu (FMB).

Supervisor(a): Prof. Dr. Lígia Yukie Sasaki

PROGRAMA DE PÓS-DOCTORADO DA UNESP

Botucatu-SP

2025

EDITAL PROPG/PROPE Nº 06/2024

Avaliação da permeabilidade intestinal e disbiose de pacientes portadores de Doença Inflamatória Intestinal (DII) e associação com Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA)

RESUMO

A microbiota intestinal é conhecida por fornecer uma série de benefícios ao seu hospedeiro, devido a interação simbiótica estabelecida entre eles. Um desbalanço entre bactérias benéficas e patogênicas ao intestino, denominada disbiose, pode resultar no desenvolvimento de doenças como a diabetes, obesidade, doenças hepáticas, como a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), e doença inflamatória intestinal (DII), considerada uma das principais doenças relacionadas à disbiose, que inclui a Doença de Crohn e a Retocolite Ulcerativa. Diversos estudos evidenciam que cerca de 33% dos pacientes com DII desenvolvem DHGNA, devido aos mecanismos fisiopatológicos presentes em ambas as doenças. A DHGNA é doença crônica, caracterizada por depósitos excessivos de gordura hepática, e assim como na DII, estudos indicam que alterações na permeabilidade intestinal e na microbiota intestinal podem ter papel importante no desenvolvimento desta doença. Com base no exposto, o presente estudo tem como objetivo analisar o perfil de microbiota, a permeabilidade intestinal e a presença de disbiose dos pacientes com DII, e comparar os achados entre os grupos DII + DHGNA e DII sem DHGNA. Foi observado alta prevalência de DHGNA nos pacientes com DII (46,07%); no grupo DII+DHGNA houve aumento dos níveis de ocludina, das citocinas IP-10 e MCP-1; enquanto no grupo DII sem DHGNA houve maior expressão dos seguintes microRNAs: miR-139-5p, miR-223-3p e miR-219-5p. Com base nos resultados obtidos é possível observar que o perfil do grupo DII sem DHGNA difere do grupo DII+DHGNA, e que estas diferenças podem ser importante forma de identificar e diagnosticar precocemente pacientes com DII que apresentem predisposição a desenvolver DHGNA.

Palavras-chave: Microbiota intestinal, Permeabilidade intestinal, Doença inflamatória intestinal, Doença hepática gordurosa não alcoólica.

1) INTRODUÇÃO

A microbiota intestinal em indivíduos saudáveis é conhecida por fornecer uma série de benefícios ao seu hospedeiro, relacionados à nutrição, metabolismo, sistema imunológico e proteção contra patógenos (NISHIDA et al., 2018). No trato gastrointestinal humano residem mais de 1000 espécies de bactérias e estima-se que o genoma coletivo destes microrganismos

intestinais presente, aproximadamente, 100 vezes mais genes do que o próprio genoma humano (LEY; PETERSON; GORDON, 2006; QIN et al., 2010). Desta forma, podemos retratar nossa microbiota intestinal como um órgão, composta por diferentes linhagens celulares com capacidade de se comunicarem umas com as outras e com o próprio hospedeiro, através do consumo, armazenamento e redistribuição de energia, que medeia transformações químicas fisiologicamente importantes, podendo se manter e se reparar por meio da autorreplicação (BÄCKHED et al., 2005).

As bactérias existentes no intestino humano pertencem a seis filos: Firmicutes, Bacteroidetes, Verrucomicrobia, Fusobacteria, Actinobacteria e Proteobacteria, sendo que destas, aproximadamente 90% da comunidade bacteriana que compõe a microbiota intestinal e coloniza o trato gastrointestinal são membros dos filos Firmicutes e Bacteroidetes (ECKBURG et al., 2005; NISHIDA et al., 2018; SÁNCHEZ-TAPIA; TOVAR; TORRES, 2019). O filo Firmicutes é diverso e compreende bactérias gram-positivas com mais de 200 gêneros diferentes de cepas que são probióticos, *Ruminococcus*, *Clostridium* e *Lactobacillus*, e as espécies produtoras de butirato, *Eubacterium*, *Faecalibacterium prausnitzii* e *Roseburia*. O segundo filo mais abundante, o Bacteroidetes, compreende bactérias gram-negativas com aproximadamente 20 gêneros, como os *Bacteroides*, *Prevotella* e *Xylanibacter*, que degradam uma variedade de glicanos complexos. O filo Verrucomicrobia tem como único representante a espécie *Akkermansia muciniphila*, abundante no trato gastrointestinal, que está sendo considerado um dos “probióticos de última geração”, o que tem despertado o interesse de estudos sobre microbiota e DII (ZHAI et al., 2019a, 2019b; ZHANG et al., 2019). O filo Fusobacteria são bacilos anaeróbios gram-negativos, este filo inclui a espécie *Fusobacterium nucleatum*, que pode ter relação simbiótica com o seu hospedeiro, mas também pode causar infecções oportunistas e recentemente tem chamado a atenção de estudos sobre microbioma do câncer colorretal (BRENNAN; GARRETT, 2019; WU; LI; FU, 2019). O filo Actinobacteria inclui *Collinsella* e *Bifidobacterium*, enquanto as Proteobactérias comuns são *Escherichia* e *Desulfovibrio*. O intestino humano é composto principalmente de bactérias, mas também inclui arqueias metanogênicas, vírus, fungos, leveduras e protozoários (SÁNCHEZ-TAPIA; TOVAR; TORRES, 2019).

O humano servindo de hospedeiro para estas bactérias intestinais fornece ambiente rico em nutrientes, enquanto a microbiota fornece funções indispensáveis que os humanos não podem exercer. Dentre estas funções, temos a sua participação na digestão de polissacarídeos complexos presentes na dieta do hospedeiro, importante para formação de monossacarídeos e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), como propionato, butirato e acetato, os quais representam importante fonte de energia para o corpo humano, além de afetarem a proliferação, diferenciação e

modulação da expressão gênica em células epiteliais do cólon de mamíferos (SÁNCHEZ-TAPIA; TOVAR; TORRES, 2019); na produção de vitaminas essenciais no lúmen intestinal, incluindo vitamina K, vitamina B12, biotina, folato, tiamina, riboflavina e piridoxina (ROWLAND et al., 2018); na regulação de metabolismo de lipídeos e glicose, por meio da composição dos ácidos biliares produzido pelo fígado do seu hospedeiro (RAMÍREZ-PÉREZ et al., 2017); na manutenção da barreira de células epiteliais intestinais e na homeostase intestinal (SODERHOLM; PEDICORD, 2019), conferindo mecanismos regulatórios que proporcionam equilíbrio entre a mucosa intestinal e o seu sistema imune, resultando na tolerância de bactérias inofensivas e em respostas imunes contra bactérias patogênicas (DOLLÉ et al., 2016).

Através destas interações simbióticas a microbiota intestinal coevoluiu com a espécie humana, se tornando necessária para manutenção da saúde de seu hospedeiro. O equilíbrio estabelecido entre tais interações é em grande parte preservado mesmo diante de mudanças repentinas na microbiota intestinal, conforme observado após tratamentos com antibióticos ou infecções intestinais agudas, modificações na dieta ou outros fatores externos, que afetam a composição, uniformidade e abundância relativa de espécies e, assim, remodelam a própria microbiota (DRAGO; VALENTINA; FABIO, 2019; ROTHCHILD et al., 2018). No entanto, a perda deste equilíbrio resulta em alterações desfavoráveis na composição e função da microbiota intestinal, podendo desencadear um desbalanço entre bactérias benéficas e patogênicas ao intestino, denominada disbiose, que altera a interação entre a microbiota, o hospedeiro e o seu sistema imune, além de afetar a integridade da barreira intestinal, causando a ativação do sistema imune por translocação de antígenos e metabólitos microbianos (IORDACHE et al., 2022).

Tais alterações podem favorecer o desenvolvimento de infecções oportunistas, como o crescimento excessivo de Enterobacteriaceae ou Streptococcaceae, seguidas de inflamação de baixo grau da mucosa, aumento da permeabilidade intestinal, mudanças morfológicas e funcionais locais ou sistêmicas da microbiota intestinal, devido a presença de produtos do gene microbiano patogênico (LYNCH; PEDERSEN, 2016; STECHER; MAIER; HARDT, 2013), que pode trazer prejuízos à saúde do homem e suscetibilidade a doenças crônicas. Dentre as doenças que estão associadas à disbiose crônica da microbiota intestinal, encontram-se doenças autoimunes, como eczema, asma, doença celíaca e diabetes tipo 1, doenças relacionadas ao consumo de dieta desbalanceada, aumento do sedentarismo e idade, como a obesidade, diabetes tipo 2 e doenças metabólicas (HARMSSEN; GOFFAU, 2016), doenças cardiovasculares (LYNCH; PEDERSEN, 2016), doenças hepáticas como a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (MILOSEVIC et al., 2019), doenças proliferativas como o câncer colorretal, doenças psicológicas como depressão, ansiedade, autismo e doença de Alzheimer (ALTVEŞ; YILDIZ; VURAL, 2020; DAI et al., 2018; TREISMAN, 2017) e as Doenças Inflamatórias

Intestinais (DII), uma das principais doenças relacionadas à disbiose (HARMSSEN; GOFFAU, 2016).

As DII compreendem distúrbio do trato gastrointestinal (TGI) crônico caracterizado por resposta imune hiperativa à microbiota intestinal, que inclui a Doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa (RCU), que diferem nas suas características fisiopatológicas e clínicas (HILLS et al., 2019; OLIGSCHLAEGGER et al., 2019). Tal distúrbio resulta em estresse oxidativo para o hospedeiro e microbiota, levando à disbiose intestinal, reduzindo a comunidade de bactérias benéficas, como bifidobactérias e lactobacilos, e favorecendo a proliferação de Enterobacteriaceae anaeróbia facultativa e cepas invasivas aderentes de *Escherichia coli* (IAEC) (BALMUS et al., 2016; HALL et al., 2017; MARTINEZ-MEDINA; GARCIA-GIL, 2014; WINTER; BÄUMLER, 2014), sendo estas frequentemente observadas em pacientes com DII e consideradas como desencadeadoras do agravamento dos sintomas da doença (HONDA; LITTMAN, 2012).

A etiologia da DII não está totalmente elucidada, mas sabe-se que a interação de fatores, como fatores genéticos, imunológicos, ambientais e a microbiota intestinal podem desencadear a doença. Alguns dos genes associados a DII são conhecidos por estarem envolvidos na mediação das respostas do hospedeiro à microbiota intestinal, enaltecendo a possibilidade da microbiota estar implicada na patogênese da DII (LIU et al., 2015; NISHIDA et al., 2018; SHEEHAN; MORAN; SHANAHAN, 2015). Diversos estudos demonstram que a composição da microbiota intestinal na DII é alterada quando comparada com indivíduos saudáveis (MAGRO et al., 2019; SUN et al., 2019; WENG et al., 2019; ZHOU et al., 2018). No entanto, uma relação direta entre disbiose e DII ainda não foi estabelecida em humanos (NISHIDA et al., 2018).

Além da disbiose, a DII também é caracterizada pela ruptura da barreira intestinal, que resulta no aumento da permeabilidade intestinal. Esta alteração pode ser utilizada como medida diagnóstica para DII, através da avaliação de lesões na mucosa intestinal (BISCHOFF et al., 2014; CAMILLERI et al., 2019; SEETHALER et al., 2021). As células epiteliais intestinais são mantidas juntas pelas *tight junction* (junções oclusivas), junções aderentes e desmossomos. As proteínas *tight junction* apresentam importante papel na permeabilidade intestinal, atuando seletivamente na passagem de fluxo iônico, pequenas moléculas e solutos (KÖNIG et al., 2016; LACERDA et al., 2021). Recentes estudos têm avaliado um modulador destas proteínas, chamado zonulina, uma proteína estrutural que controla a permeabilidade intestinal diminuindo a estabilidade das *tight junction*, funcionando como biomarcador da permeabilidade intestinal, que pode ser quantificado através de amostras de sangue ou fecal, apresentando alto potencial clínico no diagnóstico de doenças inflamatórias crônicas, como a DII (FASANO, 2020; LACERDA et

al., 2021; SEETHALER et al., 2021; SEREK; OLEKSY-WAWRZYNIAK, 2021; TAJIK et al., 2020).

Diversos estudos evidenciam associação entre DII e risco aumentado para o desenvolvimento de DHGNA, devido aos mecanismos fisiopatológicos presentes em ambas as doenças, como secreção elevada de citocinas pró-inflamatórias, como Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6), inflamação intracelular crônica e inibição da via de sinalização do fator nuclear kappa-B (NF- κ B) (MAGRO et al., 2019; SARTINI et al., 2018; SOURIANARAYANANE et al., 2013; SPAGNUOLO et al., 2019). A DHGNA pode ser detectada em até 33% dos pacientes com DII, frequentemente na ausência de fatores de risco metabólicos (BESSISSOW et al., 2016; SARTINI et al., 2018). Em pacientes com DII, a patogênese da DHGNA pode ser mais complexa e severa, estando relacionada a fatores de risco específicos da doença, como inflamação crônica, exposição a esteroides, imunossupressores, hepatotoxicidade induzida por drogas, desnutrição e alteração da microbiota intestinal, que está emergindo como fator importante na patogênese da DHGNA (BESSISSOW et al., 2016; GISBERT et al., 2007; SARTINI et al., 2018).

A DHGNA é uma doença hepática crônica, caracterizada por depósitos excessivos de gordura hepática, sendo os principais fatores de risco os mesmos componentes da síndrome metabólica (obesidade, diabetes tipo 2, dislipidemia e resistência a insulina), na ausência de causas secundárias, como consumo excessivo de álcool, medicamentos e hipotireoidismo (BELLENTANI, 2017). Dentre as doenças hepáticas, a DHGNA é a forma mais agressiva, podendo levar à cirrose em até 20% dos indivíduos (ALBHAISI; BAJAJ; SANYAL, 2020; YOSHIOKA et al., 2004).

Estudos evidenciam que a disbiose intestinal tem papel importante no desenvolvimento da DHGNA por meio da regulação da inflamação, resistência à insulina, ácidos biliares e metabolismo da colina (ACHARYA; BAJAJ, 2017; DUARTE; STEFANO; OLIVEIRA, 2019; WANG; WAN, 2019), o que indica que as mudanças ocorridas na microbiota podem ter papel maior na causa da doença do que se conhece atualmente. Possível mecanismo pelo qual a microbiota intestinal contribui para o desenvolvimento da DHGNA pode estar relacionado à quantidade de etanol endógeno produzida pela bactéria *Escherichia coli* (BAKER et al., 2010; ZHU et al., 2013). Além disso, estudos demonstraram que pacientes com DHGNA apresentam redução de bactérias da família Firmicutes, como *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae*, que participam da produção de AGCCs, importantes em diversas funções na promoção da saúde em um indivíduo, em contrapartida houve aumento de bactérias gram-negativas, potencialmente oportunistas, produtoras de lipopolissacarídeos (LPS), endotoxina bacteriana mais conhecida (DUARTE et al., 2018; WANG et al., 2016).

O LPS é um componente de parede celular externa termoe estável presente em bactérias gram-negativas, que são patogênicas, protegendo-as de fatores nocivos, como antibióticos e células imunes do seu hospedeiro (POTRYKUS et al., 2021). O LPS se liga a proteína de ligação de lipopolissacarídeo (LPS), produzida pelos hepatócitos que circula na corrente sanguínea, o que aumenta a afinidade de ligação das bactérias gram-negativas a receptores de membrana CD14 presentes na superfície de células imunes e epiteliais do hospedeiro. Tal interação é reconhecida por receptores Toll-like 4 (TLR4) ativando mediadores como fator nuclear κ B (NF- κ B) a produzir citocinas pró-inflamatórias, incluindo fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina 1 β (IL-1 β), levando a inflamação que intensifica a ruptura da barreira intestinal, resultando no aumento da permeabilidade intestinal. Os níveis plasmáticos aumentados de LPS associado a inflamação crônica são chamados de endotoxemia metabólica, que é associada a variedade de doenças, como obesidade, diabetes tipo 2, doença cardiovascular e a própria DII e DHGNA (DE SANTIS et al., 2015; GNAUCK; LENTLE; KRUGER, 2016; MOHAMMAD; THIEMERMANN, 2021; POTRYKUS et al., 2021).

Com base no exposto, o presente estudo pretende, como objetivo principal, descrever o perfil da microbiota intestinal, analisar a permeabilidade intestinal e a disbiose dos pacientes com DII, e comparar os achados entre os grupos DII + DHGNA e DII sem DHGNA. A DHGNA é frequente na população com DII e pode evoluir para formas graves com cirrose hepática, carcinoma hepatocelular e óbito. Frente à potencial gravidade da doença, a identificação de fatores de risco para prevenção do aparecimento da DHGNA nos pacientes com DII é de suma importância. Para tanto, precisamos identificar os fatores associados com o aparecimento de DHGNA nos pacientes com DII e estabelecer estratégias de prevenção, como, por exemplo, a modulação da microbiota intestinal. O presente estudo pretende responder alguns questionamentos da literatura para embasar ações preventivas e terapêuticas nessa população. Um dos questionamentos seria se os pacientes com DII + DHGNA teriam maior disbiose intestinal e maior permeabilidade intestinal em comparação aos pacientes com DII sem DHGNA.

2) OBJETIVOS

2.1) Objetivo geral

- Descrever o perfil da microbiota intestinal, analisar a permeabilidade intestinal e a presença de disbiose dos pacientes com DII, e comparar os achados entre os grupos DII + DHGNA e DII sem DHGNA

2.2) Objetivos específicos

- Avaliar a frequência de DHGNA dentre os pacientes com DII
- Descrever o perfil da microbiota intestinal de pacientes com DII, e comparar os achados entre os grupos DII + DHGNA e DII sem DHGNA
- Relacionar os dados dos perfis de microbiota com a avaliação da permeabilidade intestinal e a presença de disbiose dos pacientes avaliados.

3) MATERIAL E MÉTODOS

3.1) Tipo de estudo

Foi realizado estudo do tipo transversal observacional.

3.2) Local do estudo

Os pacientes foram oriundos do Ambulatório de DII do HC da FMB-SP.

3.3) Recrutamento e triagem dos participantes

Foram convidados pacientes adultos, a partir de 18 anos de idade, de ambos os sexos, com diagnóstico confirmado de DII (DC ou RCU). Os pacientes foram convidados a participar da pesquisa de forma consecutiva. A amostra foi por conveniência. Foram recrutados 89 pacientes que foram submetidos ao exame de ultrassonografia hepática para avaliar a presença de DHGNA e posteriormente foram divididos em 2 grupos (DII + DHGNA e DII sem DHGNA), visando uma distribuição homogênea, entre os 2 grupos, quanto à variação do índice de massa corporal, sexo, idade, atividade da DII e tipo de DII.

3.3.1) Critérios de inclusão: Índice de massa corporal (IMC) superior a 18,5 e inferior a 30 Kg/m², diagnóstico confirmado de DII, e aceitar participar do estudo.

3.3.2) Critérios de exclusão: Índice de massa corporal (IMC) inferior a 18,5 e superior a 30 Kg/m², uso de antibiótico e probióticos nos últimos 30 dias, uso de corticoide em dose > 20mg/dia, histórico de câncer, doenças crônicas não controladas, infecção por HIV, tuberculose, tabagismos ou etilismo ativo e não aceite em realizar os exames preconizados no estudo.

3.4) Aspectos éticos do estudo

O projeto foi aprovado pelo CEP sob o parecer número 4.552.848. Os participantes foram convidados a participar do estudo e foram incluídos após leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), em conformidade com os requisitos regulamentares e de gerenciamento de dados do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Instituição.

3.5) Variáveis

Dados pessoais (nome, idade, peso, altura, telefone e endereço), dados clínicos (outras doenças, e tratamento da doença, tipo de parto ao nascimento (normal ou cesárea) e se receberam leite materno exclusivo até os 6 meses de idade (ANEXO 1). Foram avaliados o uso de medicamentos, tais como derivados 5-aminossalicílicos, imunossupressores como a azatioprina e o metotrexate, inibidores de JAK e a terapia biológica como o infliximabe, adalimumabe, certolizumabe pegol, vedolizumabe e ustekinumabe.

3.6) Avaliação da atividade da DII

Para calcular a atividade da DII foi utilizado para aqueles que apresentam RCU o índice Clínico de Mayo, e para os portadores da DC o índice Harvey–Bradshaw (HBI) e a Pontuação endoscópica simples para DC (SES-CD). O índice de Mayo trata-se de avaliação clínica composta de avaliação da frequência evacuatória presença de sangue nas fezes, avaliação endoscópica, e avaliação global do paciente, amplamente usado em ensaios clínicos (WALSH et al., 2014). As pontuações variam de 0 a 12 pontos (D’HAENS et al., 2007; RUTGEERTS et al., 2005). Sub-pontuações que englobam a avaliação de sangramento retal, frequência de fezes e avaliação global do médico, ou o sub-escore de endoscopia, também são usados em ensaios clínicos para registrar uma pontuação parcial do escore de Mayo. Para o estudo serão considerados a pontuação do escore parcial de Mayo (excluindo-se o sub-escore endoscópico) e a pontuação do escore total de Mayo (considerando o sub-escore endoscópico). Os pacientes foram classificados em doença em remissão, atividade leve, moderada ou grave. O HBI é um índice numérico da atividade da DC que exige exame físico limitado para massa abdominal e memória do paciente do dia anterior (HARVEY; BRADSHAW, 1980; SPAGNUOLO et al., 2019). É composto por cinco parâmetros: bem-estar geral (0 = muito bem, 1 = ligeiramente ruim, 2 = ruim, 3 = muito ruim, 4 = terrível), dor abdominal (nenhuma = 0, leve = 1, moderada = 2, severa = 3), número de evacuações líquidas por dia, presença de massa abdominal (0 = nenhuma, 1 = duvidosa, 2 = definitiva, 3 = definitivo e mole) e presença de complicações: artralgia, ulcerações, inflamação, eritema nodoso, pioderma gangrenoso, fissura anal, novas fístulas, abscessos (escore 1 por item) (HARVEY; BRADSHAW, 1980). Pacientes com pontuação de 3 ou menos têm grande probabilidade de estar em remissão, enquanto pacientes com pontuação de 8 a 9 ou mais são considerados portadores de doença grave. O SES-CD é um índice numérico da atividade da doença endoscópica. Doença endoscópica ativa é definida como SES-CD $\geq$ 3, desta forma uma pontuação SES-CD de 0–3 é definida como doença inativa, enquanto os pacientes com uma pontuação de 17 ou mais são considerados como tendo doença grave (DAPERNO et al., 2004; SPAGNUOLO et al., 2019).

3.7) Avaliação da presença de DHGNA

Para avaliar a presença de DHGNA utilizamos exame de ultrassom de fígado e vias biliares, que foi realizado no aparelho da marca FITLABS modelo FT412 do setor de ultrassonografia do Hospital das Clínicas de Botucatu. O exame foi realizado por profissional experiente na área, examinador único durante todo o estudo. Os pacientes foram orientados a estarem de jejum 6 horas antes do exame. O diagnóstico da DHGNA por USG tem sensibilidade de 82% a 89% e especificidade de 93% (BAYARD; HOLT; BOROUGHS, 2006) e pode ser classificada (SAVERYMUTTU; JOSEPH; MAXWELL, 1986) em Grau I: aumento da ecogenicidade ou brilho do fígado com visualização normal do diafragma e bordos dos vasos intra-hepáticos; Grau II: aumento da ecogenicidade com discreta atenuação do feixe posterior resultando em dificuldade na visualização do diafragma e vasos intra-hepáticos; Grau III: importante aumento da ecogenicidade e marcada atenuação do feixe posterior, impossibilitando a visualização do diafragma e dos vasos intra-hepáticos do lobo direito do fígado. Frente ao diagnóstico de doença hepática crônica, ou mesmo DHGNA, o paciente foi convidado a realizar acompanhamento médico no Ambulatório de Doença Hepática Gordurosa do HC-FMB.

3.8) Coleta das amostras

Foi coletado na primeira visita do estudo amostra de sangue (30 ml) de cada paciente, em tubo sem anticoagulante, para os testes de permeabilidade intestinal e disbiose. As amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente. O soro obtido foi aliquoteado em microtubo de centrifugação e estocado em -80°C para posterior análise. Para a coleta das amostras de fezes forneceremos um kit com tubos de coleta para fezes com estabilizador de DNA (Zymo Research – EUA) e as devidas instruções por escrito sobre o uso do kit para que os pacientes possam fazer a auto coleta da amostra de forma a garantir a integridade dos perfis de microbiota em temperatura ambiente e consequentemente a obtenção de resultados confiáveis da amostra. A coleta foi realizada dentro de 24 horas antecedente da visita de triagem e das visitas de amostragem conforme necessidade da análise clínica e nutricional dos pacientes selecionados. Após a entrega das amostras, as fezes foram imediatamente armazenadas em gelo e transportadas para o laboratório, onde foram estocadas em biofreezer (-80°C) para posterior extração do DNA.

3.9) Extração e sequenciamento do DNA (etapa ainda não concluída)

3.9.1) Extração do material bacteriano

O DNA genômico das amostras fecais dos pacientes será extraído de acordo com o protocolo do kit QIAamp® Fast DNA Stool Mini (QIAGEN – Alemanha), que possibilita a purificação de DNA de amostras fecais frescas ou congeladas. O DNA de todas as amostras será quantificado no NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) e será considerada a absorbância entre 1,8 e 2,0 como garantia da qualidade da extração do material genético. A extração do DNA será realizada no Laboratório de Investigação Clínica em Resistência à Insulina (LICRI) coordenado pelo prof. Dr. Mario Jose Abdalla Saad da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Unicamp.

3.9.2) Preparo da biblioteca e sequenciamento do 16S rRNA

Para o preparo das bibliotecas serão necessários 12,5ng de DNA, 5mM de *primers* (ou iniciadores) específicos para a amplificação da região altamente conservada (V3 e V4) (Tabela 1) do gene 16S bacteriano e 12,5uL do pré-mix 2x KAPA HIFI hotStart (KAPABIOSYSTEMS – EUA).

Tabela 1. Sequência de primers para região V3/V4 do gene 16S.

Região	Sequência 5' - 3'
V3	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG
341	
V4	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC
785	

A sequência em *itálico* corresponde ao adaptador Nextera® transposase sequences A e B e a sequência em **negrito** correspondem aos iniciadores de ampla utilização, 341F e 785F respectivamente (Illumina, San Diego, CA, USA). Posteriormente serão utilizadas para o preparo das bibliotecas o kit Illumina Miseq DNA Sample Preparation V3 com código de barra para cada amostra. A preparação da biblioteca e sequenciamento será realizada no LICRI – FCM – Unicamp. O sequenciamento será realizado no equipamento Illumina Miseq do Laboratório de Genética Molecular – FCM – Unicamp.

3.10) Análise de bioinformática (etapa ainda não concluída)

A composição taxonômica das comunidades bacterianas será obtida pela análise da região V3 E V4 do gene 16S rRNA usando a plataforma Illumina® MiSeq. As construções das bibliotecas de sequenciamento do DNA serão realizadas segundo instruções do fabricante (Illumina, San Diego, CA, USA) de acordo com Caporaso et al., (2012). Serão utilizadas leituras pareadas de 300 bp e reagentes MiSeq V3, cujas extremidades de cada leitura serão sobrepostas para gerar leituras completas de alta qualidade da região V3 e V4, gerando mais que 100.000 leituras por amostra, o que é reconhecido como número suficiente para pesquisas metagenômicas. As

sequências fastq serão analisadas utilizando-se o software Illumina 16S Metagenomics. Para a análise de alpha e beta diversidade será utilizado o software Microbiome Analyst - Marker Data Profiling (MDP), para avaliar a robustez destes padrões (CHONG et al., 2020), executando a classificação taxonômica da região V3/V4 do gene 16S rRNA através do banco de dados Silva. A análise dos gêneros da microbiota intestinal será feita pelo software Galaxy, LDA-LEfSe o qual é um algoritmo para identificação de biomarcadores de alta dimensão, que caracteriza diferenças entre as condições biológicas. O programa LEfSe fornece uma lista de diferentes táxons entre os diferentes grupos de paciente com significância estatística e biológica, classificando-os de acordo com o tamanho do efeito. A análise discriminante linear (LDA) pelo tamanho do efeito (LEfSe) será utilizado para identificar táxons que discriminarão os perfis de microbiota de acordo com cada grupo de pacientes.

3.11) Construção do catálogo de genes (etapa ainda não concluída)

Todas as leituras serão montadas usando SOAPdenovo (LUO et al., 2012). MetaGene será usado para a predição de genes. Um conjunto de genes não redundantes será construído por comparação em pares de todos os genes, usando BLAT (KENT, 2002) e os critérios de identidade > 95% e sobreposição > 90%. As atribuições taxonômicas serão feitas com base na pesquisa BLASTP (ALTSCHUL et al., 1997) do banco de dados NCBI-NR de genomas sequenciados de bactérias intestinais. As anotações funcionais serão feitas pela pesquisa BLASTP contra base de oleodutos eggNOG (JENSEN et al., 2008) e KAAS (MORIYA et al., 2007) nas bases de dados do KEGG (v48.2) (OGATA et al., 1999).

3.12) Avaliação da permeabilidade intestinal

A permeabilidade intestinal foi avaliada através da quantificação de zonulina e ocludina sérica. Os níveis de ocludina e zonulina foram quantificados por ELISA utilizando o Human Occludin ELISA kit – Novus Biologicals (Biotechne®, EUA) e Human Zonulin ELISA kit – Novus Biologicals (Biotechne®, EUA) respectivamente, no aparelho de espectrofotometria do Laboratório de Fitomedicamentos, Farmacologia, Biotecnologia (FitoFarmaTec), coordenado pelo prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi do Instituto de Biociências (IBB) da Unesp de Botucatu.

3.13) Avaliação da disbiose intestinal (etapa ainda não concluída)

Para avaliar de forma indireta a disbiose nos pacientes do estudo será realizada a dosagem do LPS que será feita por técnica de Elisa, através do kit DUOSET LBP de humano – R&D Systems (Biotechne®, EUA) a dosagem será realizada de acordo com as instruções do fabricante, no Laboratório de Fitomedicamentos, Farmacologia, Biotecnologia (FitoFarmaTec).

3.12) Análises extras:

3.12.1) Análise bioquímica de marcadores inflamatórios

Marcadores inflamatórios foram avaliados, a partir das amostras de soro dos pacientes, utilizando painéis dos kits MILLIPLEX Human Cytokine HCYTA-60K (Millipore® SigmaAldrich, EUA), com os seguintes marcadores: TNF-alfa, INF-gama, IL-1 beta, IL-6, IL-8, IL-10, proteína induzível-10 (IP-10), proteína quimiotática de monócitos-1(MCP-1), monocina induzida por interferon- γ (MIG/CXCL9) e regulamentado após ativação, célula T normal expressa e secretada (RANTES). As análises de ELISA foram realizadas no equipamento MAGPIX Luminex (Milliplex MAP, Millipore®, EUA) do Laboratório de Ensaios Biológicos com Produtos Naturais I, coordenado pela Prof. Clélia Akiko Hiruma Lima do Instituto de Biociências (IBB) da Unesp de Botucatu.

3.12.2) Extração, transcrição reversa e expressão de microRNA (miRNA) (etapa em andamento)

Através da obtenção de amostras sanguíneas dos pacientes para análises bioquímicas, parte dos soros obtidos foram submetidos a análise de miRNA. Para evitar que uma eventual contaminação por DNA genômico interfira nos resultados, todas as amostras de RNA total obtidas a partir do soro dos pacientes foram tratadas com DNase antes de serem submetidas a transcrição reversa tanto para os ensaios de arranjos de miRNAs quanto para a quantificação de miRNAs alvos por RT-PCR em tempo real. Para investigação do perfil de miRNAs proposto, foi realizado a extração do RNA total das amostras, primeiramente as amostras de soro foram filtradas utilizando filtro de seringa de 0,45 μ m, usamos o volume de 500 μ L do soro filtrado que foi colocado em um microtubo de 2 mL, adicionamos 1 mL de TRIzol (Invitrogen®) e 10 μ L de proteinase, incubamos por 10 min a 55°C, em seguida adicionamos 200 μ L de clorofórmio gelado, incubamos em temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugamos a 1200 RPM a 4°C por 15 minutos, transferimos a fase transparente para um microtubo de 1,5 mL e adicionamos 500 μ L de isopropanol gelado e 2 μ L de glicogênio (5 μ g/ μ L), incubamos entre 1-2h a -20°C, centrifugamos novamente a 1200 RPM a 4°C por 15 minutos, descartamos com cuidado todo o sobrenadante, deixando apenas o pellet onde está o material de interesse, adicionamos 1 mL de etanol 75%, centrifugamos a 7500 RPM a 4°C por 5 minutos, novamente descartamos o sobrenadante por completo, preservando o pellet ao fundo do microtubo, e adicionamos 20 μ L de água ultrapura, em seguida incubamos a 55°C e armazenamos o material extraído no -80°C. As amostras extraídas tiveram suas concentrações de RNA total mensuradas por espectrofotometria e fluorimetria (Nanodrop, ND-2000® e Qubit, Invitrogen®) e foram imediatamente submetidas à

reação de transcrição reversa utilizando o miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies – EUA). As amostras então foram armazenadas (-20° C) para posterior utilização nos experimentos. Posteriormente, as análises de arranjos dos miRNAs foram realizadas usando o chip 96.96 Dynamic Array™ integrated fluidic circuit (IFC) for Gene Expression (Fluidigm®, EUA) e o sistema Biomark HD (Fluidigm®, EUA).

As análises de expressão de miRNAs por microarranjos foram realizadas no equipamento Biomark HD (Fluidigm®, EUA) do Laboratório de Fitomedicamentos, Farmacologia, Biotecnologia (FitoFarmaTec), coordenado pelo prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi do Instituto de Biociências (IBB) da Unesp de Botucatu. Foram selecionados 4 genes endógenos (U6, RNU44 e RNU48) e 92 genes alvos, destes já foram analisados 55, e até o momento 3 genes foram expressos nas amostras analisadas, os quais estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. MiRNAs selecionados e expressos nas amostras analisadas até o momento.

miRNA alvo	Sequência	RNA alvo (via)
miR-139-5p	TCTACAGTGCACGTGTCTCCAGT	IL12RB2, IL23R (interleucina)
miR-219b-5p	AGATGTCCAGCCACAATTCTCG	CD40 (TNF)
miR-223-3p	TGTCAGTTTGTCAAATACCCCA	CD40 (TNF)

3.13) Análise estatística

Análise descritiva com apresentação de tabelas de frequências para variáveis categóricas e medidas de posição e dispersão para variáveis numéricas. As variáveis foram analisadas quanto a sua média e quanto ao seu padrão de distribuição. As comparações entre os grupos para variáveis qualitativas foram realizadas pelo teste qui-quadrado de Pearson ou teste exato de Fisher, ou teste T Student. Para a análise da homogeneidade entre os grupos, em relação às variáveis quantitativas foi utilizada a análise de variância ANOVA (One-Way) (distribuição normal) ou o teste H Kruskal-Wallis (distribuição não paramétrica) ou o teste Mann-Whitney (distribuição não paramétrica). Para estabelecer correlação entre as variáveis, foram utilizados os coeficientes de correlação de Pearson e o de Spearman. Os testes de Pearson e Spearman geram coeficientes que variam de -1 a 1 e os valores próximos às arestas sinalizam correlações negativas ou positivas, respectivamente. A análise de regressão logística foi utilizada para identificar variáveis independentes relacionadas a variáveis de interesse. O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de $p \leq 0,05$. Foram utilizados os programas SPSS 20.0 – Advanced Statistics e GraphPad Prism 10 para elaboração do banco de dados, análise estatística e edição de gráficos.

4) RESULTADOS

Foram entrevistados 313 pacientes do ambulatório de DII. Excluiu-se 125 pacientes na triagem por não se adequarem aos critérios de inclusão, e dos 188 pacientes elegíveis, 51 pacientes recusaram fazer parte da pesquisa, 7 pacientes não realizaram a ultrassonografia hepática, 6 pacientes não realizaram análise bioquímica, 2 pacientes faleceram e 2 pacientes engravidaram durante a fase de coleta das amostras, restando 120 pacientes. Destes, 77 apresentavam DII sem DHGNA e 43 apresentavam DII e DHGNA, para as análises foram selecionados 50 pacientes com DII e os 43 pacientes com DII e DHGNA, totalizando 93 pacientes. No entanto, após a seleção 2 pacientes do grupo DII foram excluídos, 1 desistiu de participar do projeto e 1 descontinuou o tratamento durante o período de coleta das amostras, também tivemos a exclusão de mais 2 pacientes do grupo DII + DHGNA, 1 paciente descontinuou o tratamento e 1 paciente estava em tratamento com antibiótico durante o período de coleta das amostras, desta forma tivemos a participação de 89 pacientes (Figure 1).

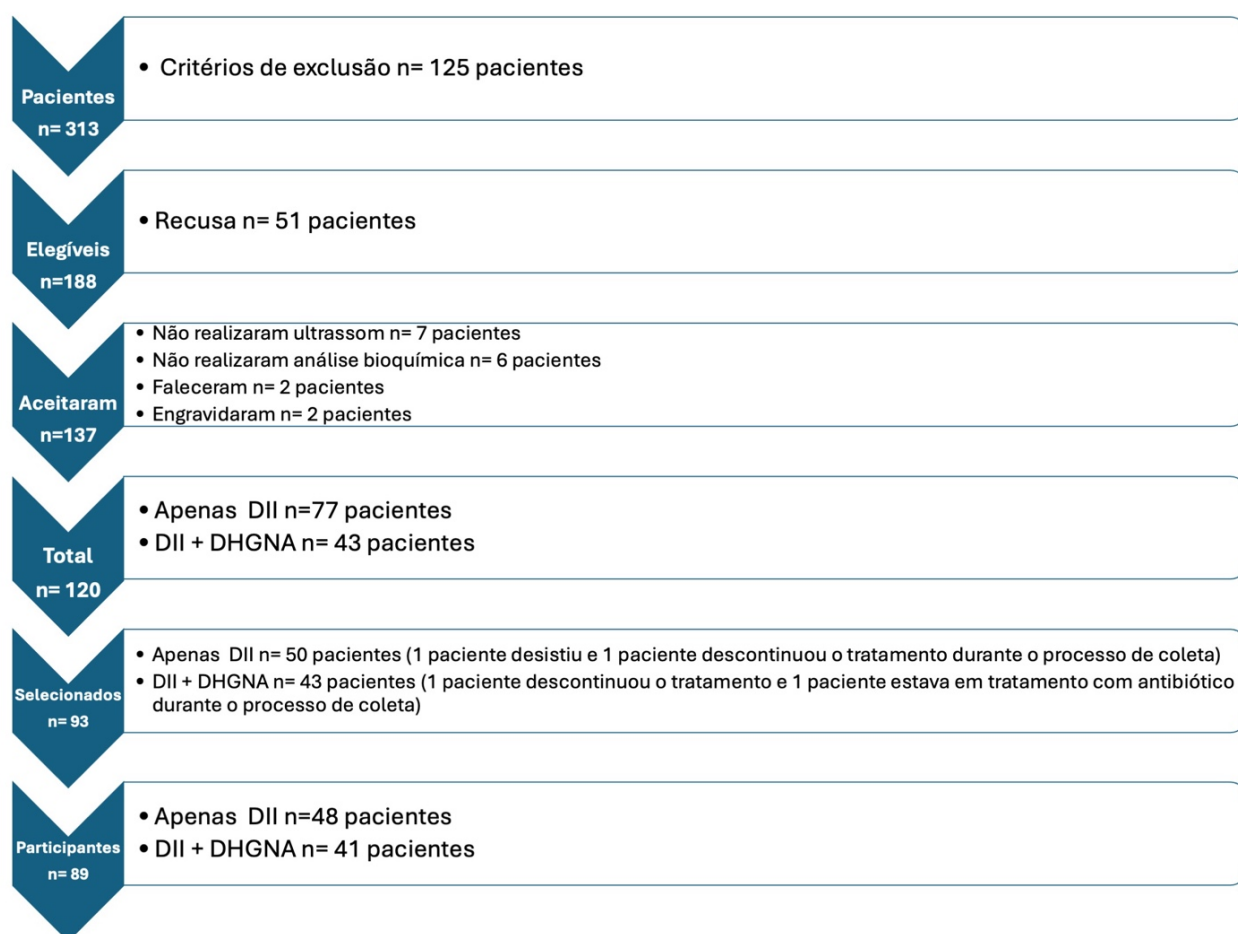


Figura 1. Fluxograma do estudo

Este número amostral foi definido visando o equilíbrio entre os grupos e respeitando o limite de amostras que podem ser aplicadas no chip do Biomark para análise dos microRNAs associados com o processo inflamatório (etapa do projeto que se encontra em andamento).

Análise descritiva sociodemográfica dos pacientes com DII divididos por RCU e DC

Dos 89 pacientes com DII incluídos, 50 (56,18%) possuem RCU e 39 (43,82%) possuem DC. A idade dos 93 pacientes foi de $43,12 \pm 13,32$ anos, sendo mais alta no grupo com RCU (Tabela 2). Em ambos os grupos, houve predominância do sexo feminino, 74,00 e 53,85% respectivamente. A maioria estava em união estável, predominavam pessoas que se autodeclararam brancas, tinham o ensino médio completo, estavam ativos em sua profissão e apresentavam renda familiar de 2-3 salários-mínimos. O grupo com RCU apresentou menor taxa de tabagistas (3,85%) e etilistas sociais (23,08%) quando comparados ao grupo com DC.

Tabela 2. Características sociodemográficas dos pacientes com DII e dividido entre Retocolite ulcerativa (RCU) e doença de Crohn (DC).

VARIÁVEIS	DII (n =89)	RCU (n= 50)	DC (n=39)
Idade (anos)	43.03 $\pm$ 13,32	44,55 $\pm$ 13,98	42,12 $\pm$ 12,34
Sexo			
Feminino	58 (65,16)	37 (74,00)	21 (53,85)
Masculino	31 (34,84)	13 (26,00)	18 (46,15)
Estado Civil			
União Estável	54 (60,67)	29 (58,00)	25 (64,10)
Solteiro	29 (32,58)	18 (36,00)	11 (28,20)
Separado / Divórcio	4 (4,49)	3 (6,00)	1 (2,56)
Viúvo	2 (2,25)	0 (0,00)	2 (5,12)
Estado Civil			
União estável	54 (60,67)	29 (58,00)	25 (64,10)
Outros	35 (39,33)	21 (42,00)	14 (35,90)
Escolaridade			
Fundamental Incompleto	11 (12,35)	6 (12,00)	5 (12,82)
Fundamental Completo	10 (11,23)	8 (16,00)	2 (5,12)
Médio Incompleto	2 (2,24)	2 (4,00)	0 (0,00)
Médio Completo	33 (37,08)	20 (40,00)	13 (33,33)
Superior incompleto	12 (13,48)	7 (14,00)	8 (20,51)
Superior completo	12 (13,48)	4 (8,00)	5 (12,82)
Pós-graduação incompleto	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
Pós-graduação completo	9 (10,11)	3 (6,00)	6 (15,38)
Escolaridade			
Fundamental	21 (23,58)	14 (28,00)	7 (17,94)
Médio	35 (39,32)	22 (44,00)	13 (33,33)
Superior	33 (37,07)	14 (28,00)	19 (48,71)
Etnia			
Branco	63 (70,79)	36 (72,00)	27 (69,23)
Pardo	18 (20,22)	8 (16,00)	10 (25,64)
Preto	8 (8,99)	6 (12,00)	2 (5,12)
Profissão			
Ativo	53 (59,55)	26 (52,00)	27 (69,23)
Inativo	36 (40,45)	24 (48,00)	12 (30,77)
Renda Familiar			
Menos de 1 salário-mínimo	3 (3,37)	2 (4,00)	1 (2,56)
1 a 2 salários-mínimos	30 (33,71)	18 (36,00)	12 (30,77)
2 a 3 salários-mínimos	33 (37,07)	19 (38,00)	14 (35,90)
3 ou + salários-mínimos	23 (25,84)	11 (22,00)	12 (30,77)
Etilismo social	29 (31,18)	12 (23,08)	17 (41,46)
Tabagismo	7 (7,53)	2 (3,85)	5 (12,19)

Comorbidades	37 (39,78)	21 (40,38)	16 (39,02)
Diabetes	10 (10,75)	8 (15,38)	2 (4,88)
Hipertensão	16 (17,20)	9 (17,31)	7 (17,07)
Dislipidemia	15 (16,13)	8 (15,38)	7 (17,07)
Hipotireoidismo	2 (2,15)	2 (3,85)	0 (0,00)
Hipertireoidismo	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
Autoimune	18 (19,35)	9 (17,31)	9 (21,95)
Índice de Massa Corporal - IMC (kg/m²)	25,41± 3,09	25,35± 3,35	25,48± 2,76
Classificação do IMC	25,41± 3,09	25,35± 3,35	25,48± 2,76
Eutrófico	35 (37,63)	19 (36,54)	16 (39,02)
Sobrepeso	58 (62,37)	33 (63,46)	25 (60,98)

Dados apresentados em n (%) e média (DP)

Análise descritiva das características clínicas da DII dividido por doença

O tempo entre os primeiros sintomas e o diagnóstico foi de 11,38±8,39 anos no grupo RCU e 10,46±7,54 anos no grupo DC. Dos pacientes com RCU, nenhum teve necessidade de realizar cirurgia devido à DII. A maioria dos pacientes tinham acometimento pancolônico (52%). Em relação ao escore de Mayo, observou-se média de 3,02±2,61 pontos, Tabela 3.

38 (42,69%) pacientes com DII incluídos no estudo apresentaram atividade clínica. No grupo RCU, este percentual foi de 60%, sendo que a maioria dos pacientes (40%) apresentou atividade leve da doença. 40% dos pacientes com RCU se encontravam em remissão clínica. Em relação à atividade endoscópica, a maioria dos pacientes 40% foram classificadas como Mayo 2 –atividade moderada. Pacientes com RCU apresentaram menor prevalência de complicações (32%) quando comparado ao grupo com DC (76,92%), sendo as manifestações extraintestinais (MEI) as mais prevalentes, com 44,94% dos pacientes relatando esse tipo de complicação.

No grupo dos pacientes com DC, são observadas algumas diferenças significativas: mais da metade dos pacientes já passaram por alguma intervenção cirúrgica (58,97%), sendo a enterectomia a mais realizada (41,02%). Destaca-se neste grupo a prevalência de acometimento perianal, considerado fenótipo mais grave da doença, presente em 43,59%. Com relação ao perfil diagnóstico dos pacientes, temos prevalência de pacientes diagnosticados entre 17-40 anos (66,67%), com acometimento ileocolônico da doença (51,28%) e comportamento penetrante (38,46%). HBI médio de 3,85±3,58 e CDAI de 83,10±77,23, sendo que 79,49% encontram-se em remissão clínica de acordo com este último escore. Com relação à colonoscopia, 61,54% apresentavam-se em remissão endoscópica no momento da avaliação.

A análise descritiva da atividade da doença, no grupo com RCU 60% dos pacientes apresentaram atividade clínica, enquanto no grupo com DC apenas 20,51%. O grupo com RCU também apresentou a maior porcentagem de pacientes em atividade endoscópica (66%) quando comparado ao grupo com DC (38,46%) e a nível histológico com 30% e 20,51% respectivamente, conforme mostrado na Tabela 3.

Tabela 3. Características clínicas da DII divididas por retocolite ulcerativa (RCU) e doença de Crohn (DC).

VARIÁVEIS	DII (n =89)	RCU (n =50)	DC (n = 39)
Tempo de diagnóstico	10,98 ± 8,00	11,38± 8,39	10,46± 7,54
HBI (pontos)	3,85± 3,58	-	3,85± 3,58
CDAI (pontos)	83,10±77,23	-	83,10±77,23
Mayo (pontos)	3,02 ± 2,61	3,02 ± 2,61	-
Cirurgia prévia	23 (25,84)	-	23 (58,97)
Tipo			
Perianal	9 (10,11)	-	9 (23,08)
Enterectomia	16 (17,98)	-	16 (41,02)
Complicação	46 (51,68)	16 (32,00)	30 (76,92)
Artralgia	32 (35,95)	10 (20,00)	21 (53,84)
Uveíte	7 (7,86)	1 (2,00)	6 (15,38)
Eritema	6 (6,74)	3 (6,00)	3 (7,69)
Pioderma	1 (1,12)	1 (2,00)	0 (0,00)
Úlcera oral	7 (7,86)	3 (6,00)	4 (10,26)
Abscesso	9 (10,11)	0 (0,00)	9 (23,08)
MEI	40 (44,94)	13 (26,00)	26 (66,67)
Classificação CDAI			
Remissão	31 (34,83)	-	31 (79,48)
Leve	4 (4,49)		4 (10,26)
Moderada	4 (4,49)		4 (10,26)
Grave	0 (0,00)		0 (0,00)
Montreal A			
1	3 (3,37)	-	3 (7,69)
2	26 (29,21)		26 (66,67)
3	10 (11,23)		10 (25,64)
Montreal L			
1	9 (10,11)	-	9 (23,07)
2	10 (11,23)		10 (25,64)
3	20 (22,47)		20 (51,28)
Montreal B			
1	13 (14,60)	-	13 (33,33)
2	11 (12,35)		11 (28,20)
3	15 (16,85)		15 (38,46)
Acometimento perianal	17 (19,10)	-	17 (43,59)
Extensão RCU			
Pancolite	26 (29,21)	26 (52,00)	-
Hemicolite esquerda	18 (20,23)	18 (36,00)	
Distal	6 (6,74)	6 (12,00)	
Classificação Mayo			
Remissão	20 (22,47)	20 (40,00)	-
Leve	20 (22,47)	20 (40,00)	
Moderada	8 (8,99)	8 (16,00)	
Grave	2 (2,25)	2 (4,00)	
Atividade Clínica	38 (42,69)	30 (60,00)	8 (20,51)
Atividade endoscópica	48 (53,93)	33 (66,00)	15 (38,46)
Classificação Endoscópica			
Remissão	43 (48,31)	18 (36,00)	25 (64,10)
Leve	13 (14,60)	8 (16,00)	5 (12,82)
Moderada	26 (29,21)	20 (40,00)	6 (15,38)
Grave	7 (7,86)	4 (8,00)	3 (7,69)
Atividade Histológica	23 (25,84)	15 (30,00)	8 (20,51)

Dados apresentados em n (%) e média (DP)

Análise descritiva do uso atual e prévio de medicamentos para DII nos grupos RCU e DC

Foram coletadas informações acerca dos medicamentos de uso prévio e atual dos pacientes (Tabela 4). No grupo dos pacientes com RCU, 46% fazem uso de salicílicos orais, seguidos de 40% que utilizam salicílicos supositórios e 42% fazem o uso da azatioprina. Nos pacientes portadores de DC 56,41% utilizam azatioprina, enquanto 30,76% fazem o uso do adalimumabe. Quando analisado o uso atual de terapia biológica em uma única categoria, isto é, independente de qual medicamento é utilizado, no grupo de pacientes com RCU 46% fazem uso de algum imunobiológico, já no grupo DC esta porcentagem atinge 76,92% dos pacientes, sendo que no grupo RCU o biológico mais utilizado é o Infliximabe (26%) e no grupo DC o Adalimumabe (35,90%) – ambos pertencentes à classe dos anti-TNF. Dentre as medicações para controle da DII, as menos utilizadas atualmente pelos pacientes foram: Ustequinumabe (3,37%), Certolizumabe (3,37%), Metotrexate (4,49%) e Vedolizumabe (6,74%). Apenas 1 (1,12%) paciente estava em uso de antibiótico para o trato gastrointestinal no momento da entrevista e tinha DC como patologia de base, para evitar que o uso do antibiótico interferisse em alguma análise, principalmente as análises de microbiota, agendamos os exames e coletas de amostras para esse paciente 30 dias após o fim do uso do antibiótico.

Mais da metade dos pacientes de ambos os grupos (78% do grupo com RCU e 74,36%, do grupo com DC) já fizeram uso de corticosteroide previamente. No grupo RCU, além dos corticosteroides, os medicamentos mais comumente utilizados previamente pelos pacientes foram salicílicos orais (46%), azatioprina (42%), e salicílico supositório (40%). Com relação aos medicamentos biológicos, 24% já haviam feito uso de algum, sendo o Infliximabe o biológico prévio mais utilizado (12%), seguido do adalimumabe (8%). No grupo DC, destaca-se o uso prévio de corticosteroide (74,36%), salicílicos oral (58,97%) e azatioprina (56,41%). Em relação aos biológicos que foram previamente utilizados por 48,72% dos pacientes, destaca-se o Adalimumabe (30,76%) e o Infliximabe (25,64%). Dentre os 89 pacientes, 40,45% já realizaram algum tratamento prévio com antibióticos para o trato gastrointestinal, sendo a porcentagem no grupo com RCU de 32% e no grupo com DC de 51,28%.

Tabela 4. Uso prévio e atual de medicamentos pelos portadores de DII.

VARIÁVEIS n (%)	DII (n = 89)	RCU (n = 50)	DC (n = 39)
USO PRÉVIO			
Corticosteroide	68 (76,40)	39 (78,00)	29 (74,36)
Budesonida	5 (5,62)	1 (2,00)	4 (10,26)
Salicílico oral	46 (51,68)	23 (46,00)	23 (58,97)

Salicílico supositório	23 (25,84)	20 (40,00)	3 (7,69)
Sulfassalazina	24 (26,97)	14 (28,00)	10 (25,64)
Azatioprina	43 (48,31)	21 (42,00)	22 (56,41)
Metotrexate	5 (5,62)	3 (6,00)	2 (5,12)
Infliximabe	16 (17,98)	6 (12,00)	10 (25,64)
Adalimumabe	16 (17,98)	4 (8,00)	12 (30,76)
Certolizumabe	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
Vedolizumabe	2 (2,25)	0 (0,00)	2 (5,12)
Ustequinumabe	2 (2,25)	0 (0,00)	2 (5,12)
Terapia Biológica (uso prévio)	31 (34,83)	12 (24,00)	19 (48,72)
Antibiótico (uso prévio)	36 (40,45)	16 (32,00)	20 (51,28)
USO ATUAL			
Corticosteroide	17 (19,10)	13 (26,00)	4 (10,26)
Budesonida	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
Salicílico oral	21 (23,59)	19 (38,00)	2 (5,12)
Salicílico supositório	14 (15,73)	14 (28,00)	0 (0,00)
Sulfassalazina	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
Azatioprina	28 (31,46)	14 (28,00)	14 (35,90)
Metotrexate	4 (4,49)	3 (6,00)	1 (2,56)
Infliximabe	24 (26,97)	13 (26,00)	11 (28,20)
Adalimumabe	16 (17,98)	2 (4,00)	14 (35,90)
Certolizumabe	3 (3,37)	1 (2,00)	2 (5,12)
Vedolizumabe	6 (6,74)	5 (10,00)	1 (2,56)
Ustequinumabe	3 (3,37)	0 (0,00)	3 (7,69)
Terapia Biológica (uso atual)	53 (59,55)	23 (46,00)	30 (76,92)
Antibiótico (uso atual)	1 (1,12)	0 (0,00)	1 (2,56)
Troca de biológico	27 (30,33)	11 (2,20)	16 (41,02)

Análise comparativa dos pacientes, divididos nos grupos com DII sem DHGNA e DII + DHGNA

Dos 89 pacientes incluídos no estudo, 41 (46,07%) possuem DHGNA. Comparando os dados sociodemográficos dos pacientes entre os grupos com DII sem DHGNA e com DII + DHGNA não houve diferença estatística significativa entre eles. Os dados de sexo e estado civil se mantiveram em proporção semelhante em ambos os grupos, sendo o sexo feminino e a união estável as maiores prevalências (Tabela 5). Em relação ao grau de escolaridade, a maior parte dos entrevistados possui ensino médio completo (37,50% no grupo DII sem DHGNA e 41,46% no grupo DII+DHGNA). Os pacientes que se autodeclararam brancos representaram a maior porcentagem em ambos os grupos (77,08% no grupo DII sem DHGNA e 60,97% no grupo DII+DHGNA). Em relação a situação profissional, 58,33% dos pacientes com DII sem DHGNA encontram-se ativos, sendo a maior porcentagem de pacientes em atividade profissional do grupo DII+DHGNA com 60,97%. Nota-se um discreto aumento do consumo de álcool entre os pacientes do grupo DII+DHGNA (39,02%) quando comparados aos pacientes com DII sem DHGNA (27,08%), e o mesmo se observa no uso do tabaco, onde 12,19% dos pacientes do grupo DII+DHGNA são tabagistas contra 4,17% dos pacientes do grupo DII sem DHGNA, no

entanto estes dados não apresentaram diferença significativa. A análise dos grupos é mostrada na Tabela 5.

Tabela 5. Características sociodemográficas de pacientes com DII divididos entre ausência e presença de Esteatose Hepática (DHGNA).

VARIÁVEIS	DII (n =89)	DII sem DHGNA (n= 48)	DII + DHGNA (n= 41)	P
Idade (anos)	43,03 ±13,32	40,62 ± 13,94	45,71 ± 12,20	0,0626
Sexo				
Feminino	58 (65,16)	29 (60,41)	29 (70,73)	0,3984
Masculino	31 (34,84)	19 (39,58)	12 (29,26)	
Estado Civil				
União Estável	54 (60,67)	30 (62,50)	24 (58,53)	0,8365
Solteiro	29 (32,58)	14 (29,16)	15 (36,58)	
Separado / Divórcio	4 (4,49)	3 (6,25)	1 (2,43)	
Viúvo	2 (2,25)	1 (2,08)	1 (2,43)	
Estado Civil				
União estável	54 (60,67)	30 (62,50)	24 (58,53)	0,8328
Outros	35 (39,33)	18 (37,50)	17 (41,47)	
Escolaridade				
Fundamental Incompleto	11 (12,35)	7 (14,58)	4 (9,76)	0,9612
Fundamental Completo	10 (11,23)	7 (14,58)	3 (7,31)	
Médio Incompleto	2 (2,24)	1 (2,08)	1 (2,43)	
Médio Completo	33 (37,08)	16 (33,33)	17 (41,46)	
Superior incompleto	12 (13,48)	8 (16,00)	4 (9,76)	
Superior completo	12 (13,48)	4 (8,33)	8 (19,51)	
Pós-graduação incompleto	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	
Pós-graduação completo	9 (10,11)	5 (10,41)	4 (9,76)	
Escolaridade				
Fundamental	21 (23,66)	13 (27,08)	8 (19,51)	0,2289
Médio	35 (40,86)	18 (37,50)	17 (41,46)	
Superior	33 (35,48)	17 (35,41)	16 (39,02)	
Etnia				
Branco	66 (70,97)	37 (77,08)	25 (60,97)	0,4869
Pardo	19 (20,43)	9 (18,75)	10 (24,39)	
Preto	8 (8,60)	2 (4,16)	6 (14,63)	
Profissão				
Ativo	53 (59,55)	28 (58,33)	25 (60,97)	0,9021
Inativo	36 (40,45)	20 (41,67)	16 (39,02)	
Renda Familiar				
Menos de 1 salário-mínimo	3 (3,37)	3 (6,00)	0 (0,00)	0,6492
1 a 2 salários-mínimos	30 (33,71)	16 (32,00)	14 (34,14)	
2 a 3 salários-mínimos	33 (37,07)	16 (32,00)	20 (48,78)	
3 ou + salários-mínimos	23 (25,84)	15 (30,00)	9 (21,95)	
Etilismo social	29 (31,18)	13 (27,08)	16 (39,02)	-
Tabagismo	7 (7,53)	2 (4,17)	5 (12,19)	-

Dados apresentados em n (%) e média (DP)

Análise comparativa das características metabólicas dos pacientes com DII, divididos entre ausência ou presença de DHGNA

Com relação às características clínicas, a presença de comorbidades associadas à patologia de base foi elevada em ambos os grupos. No grupo DII sem DHGNA, 37,50% dos pacientes relataram possuir alguma comorbidade, enquanto no grupo DII+DHGNA, esse percentual foi de

46,34%, sendo a hipertensão, outras doenças autoimunes e dislipidemia foram as mais relatadas neste grupo. É importante destacar que a categoria “dislipidemia” incluiu pacientes que relataram ou tinham histórico de alterações nos níveis de colesterol HDL, LDL e triglicerídeos.

Dentre os critérios metabólicos o IMC >25 ou circunferência abdominal (CC) > 94H 80M apresentaram porcentagem maior nos pacientes do DII+DHGNA (85,36%), bem como apresentaram a maior porcentagem de Glicose >100 ou Hemoglobina glicada (HbA1C) >5,7 ou presença de DM2; pressão arterial > 130x85 ou presença de hipertensão arterial sistêmica; Triglicerídeos >150 ou tratamento, quando comparados ao grupo com DII sem DHGNA. Estes dados reforçam a diferença significativa apresentada no índice de massa corpórea destes pacientes quando comparado aos pacientes com DII sem DHGNA, de 24,25±3,04 vs 26,68±2,63 respectivamente, apontando para a importância do excesso de peso na fisiopatologia da DHGNA. Em relação aos exames bioquímicos envolvidos nos critérios da Síndrome Metabólica, nota-se diferença significativa nos exames: glicemia de jejum, hemoglobina glicada, triglicerídeos e insulina basal, conforme apontado na tabela 6.

Tabela 6. Características metabólicas dos pacientes com DII divididos entre ausência ou presença de DHGNA.

VARIÁVEIS	DII (n =89)	DII sem DHGNA (n= 48)	DII + DHGNA (n= 41)	P
Comorbidades	37 (41,57)	18 (37,50)	19 (46,34)	0,1438
Diabetes	10 (11,23)	2 (4,17)	8 (19,51)	
Hipertensão	16 (17,97)	5 (10,42)	11 (26,83)	
Dislipidemia	15 (16,85)	5 (10,42)	10 (24,39)	
Hipotireoidismo	2 (2,25)	2 (4,17)	0 (0,00)	
Hipertireoidismo	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	
Outra doença autoimune	18 (20,22)	7 (14,58)	11 (26,83)	
Esteatose hepática	41 (46,06)	0 (0,00)	41 (100)	<.0001
Critérios metabólicos,				0,9158
IMC>25 ou CCA > 94H 80M	63 (70,79)	26 (54,17)	35 (85,36)	
Glic>100 ou HBA1C>5,7 ou DM2	24 (26,97)	6 (12,50)	18 (43,90)	
Pressão arterial > 130x85	16 (17,98)	5 (10,42)	11 (26,83)	
Triglicerídeos > 150	24 (26,97)	7 (14,58)	16 (39,02)	
HDL< 40H 50M	31 (34,83)	14 (29,16)	15 (36,58)	
Índice de Massa Corporal - IMC (kg/m²)	25,41± 3,09	24,25 ± 3,04	26,68 ± 2,63	<.0001
Classificação IMC				0.0049
Desnutrido	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	
Eutrófico	35 (39,32)	24 (50,00)	11 (26,83)	
Sobrepeso	54 (60,67)	24 (50,00)	30 (73,17)	
Obesidade	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	
Resistência insulínica	24 (26,97)	5 (10,42)	19 (46,34)	
Glicemia jejum (mg/dL)	89,14±15,83	85,38 ± 9,82	93,31 ± 19,85	0,006
Hemoglobina glicada (%)	5,42±0,79	5,26 ± 0,40	5,58 ± 1,03	0,025
Triglicerídeos (mg/dL)	144.10±87,54	119,89 ± 71,02	168,86 ± 96,33	0,001
Colesterol total (mg/dL)	195,81±44,66	187,17 ± 40,47	204,64 ± 47,42	0,0648

LDL (mg/dL)	112,56±40,65	110,04 ± 35,75	115,13 ± 45,40	0,5580
HDL (mg/dL)	55,08±15,98	53,47 ± 13,12	56,73 ± 18,46	0,2891
Insulina basal (micro IU/mL)	9,02±5,27	7,67 ± 4,34	10,33 ± 5,80	0,008

Dados apresentados em n (%) e média (DP). CCA (circunferência da cintura abdominal); Glic (glicemia); LDL (Lipoproteína de baixa densidade); HDL (lipoproteína de alta densidade)

Análise descritiva das características fisiopatológicas da DII nos grupos DII sem DHGNA e DII+DHGNA

O tempo de diagnóstico no grupo DII sem DHGNA foi de 10,34±8,14 anos e no grupo DII+DHGNA foi de 11,68±7,87. Em ambos os grupos, houve predomínio de pacientes com RCU (54,17% vs 58,54%, p=0,8364). Não houve diferença com relação à extensão da doença ou atividade clínica entre os grupos. Grande parte dos pacientes relatava alguma complicação da doença com 50% e 53,66% respectivamente, sendo as MEI as mais prevalentes (27,08% e 43,90%) em ambos os grupos. A minoria dos pacientes encontrava-se em atividade clínica (43,75% vs. 46,34%, p=0,9868), conforme mostrado na tabela 7.

Sobre os escores usados na RCU: a pontuação do score de Mayo foi de 2,59±2,26 no grupo DII sem DHGNA e de 3,46±2,92 no grupo DII+DHGNA. Ao relacionar a extensão de acometimento da RCU nota-se em ambos os grupos existe o predomínio de pancolite, em 29,17% dos pacientes do grupo DII sem DHGNA, e 31,70% dos pacientes do grupo DII+DHGNA. Já os escores para DC, HBI apontou um valor de 4,10±4,18 no grupo DII sem DHGNA e 3,58± 2,87 no grupo DII+DHGNA; e no escore CDAI foi apontado valores de 81,05±81,23 e 85,47±74,47, respectivamente. Em relação a extensão de acometimento da DC, a maior parte de ambos os grupos apresentaram acometimento ileocolônico (Montreal L3) sendo 14,58% no grupo DII sem DHGNA e 24,39% no grupo DII+DHGNA.

Tabela 7. Características da DII divididas entre pacientes sem e com DHGNA.

VARIÁVEIS	DII (n =89)	DII sem DHGNA (n= 48)	DII + DHGNA (n= 41)	P
Tipos de DII				0,8364
Crohn	39 (43,82)	22 (45,83)	17 (41,46)	
RCU	50 (56,18)	26 (54,17)	24 (58,54)	
Tempo de diagnóstico	10,98 ± 8,00	10,34± 8,14	11,68± 7,87	0,6329
HBI (pontos)	3,85± 3,58	4,10±4,18	3,58± 2,87	0,1069
CDAI (pontos)	83,10±77,23	81,05 ± 81,23	85,47±74,47	0,8271
Mayo (pontos)	3,02 ± 2,61	2,59 ± 2,26	3,46 ± 2,92	0,9277
Cirurgia prévia	23 (25,84)	13 (27,08)	11 (26,83)	-
Tipo				0,6990
Perianal	9 (10,11)	7 (14,58)	2 (4,88)	
Enterectomia	16 (17,98)	7 (14,58)	9 (21,95)	
Complicação				0,6142
Artralgia	46 (51,68)	24 (50,00)	22 (53,66)	
Uveíte	32 (35,95)	13 (27,08)	18 (43,90)	
	7 (7,86)	2 (4,17)	5 (12,19)	

Eritema	6 (6,74)	5 (10,42)	1 (2,44)	
Pioderma	1 (1,12)	1 (2,08)	0 (0,00)	
Úlcera oral	7 (7,86)	4 (8,33)	3 (7,32)	
Abscesso	9 (10,11)	6 (12,50)	9 (21,95)	
MEI	40 (44,94)	19 (39,58)	20 (48,78)	
Classificação CDAI				0,3784
Remissão	31 (34,83)	17 (35,41)	15 (36,58)	
Leve	4 (4,49)	3 (6,25)	1 (2,44)	
Moderada	4 (4,49)	2 (4,17)	2 (4,88)	
Grave	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	
Montreal A				0,4599
1	3 (3,37)	3 (6,25)	0 (0,00)	
2	26 (29,21)	12 (25,00)	14 (29,27)	
3	10 (11,23)	6 (12,50)	5 (12,19)	
Montreal L				0,2286
1	9 (10,11)	5 (10,42)	4 (9,76)	
2	10 (11,23)	5 (10,42)	5 (12,19)	
3	22 (22,47)	7 (14,58)	10 (24,39)	
Montreal B				0,6038
1	13 (14,60)	8 (16,67)	5 (12,19)	
2	11 (12,35)	4 (8,33)	9 (21,95)	
3	15 (16,85)	11 (22,92)	9 (21,95)	
Acometimento perianal	17 (19,10)	10 (20,83)	7 (17,07)	-
Extensão RCU				0,8994
Pancolite	26 (29,21)	14 (29,17)	13 (31,70)	
Hemicolite esquerda	18 (20,23)	10 (20,83)	9 (21,95)	
Distal	6 (6,74)	3 (6,25)	3 (7,31)	
Classificação Mayo				0,1871
Remissão	20 (22,47)	12 (25,00)	9 (21,95)	
Leve	20 (22,47)	14 (29,17)	7 (17,07)	
Moderada	8 (8,99)	2 (4,17)	6 (14,63)	
Grave	2 (2,25)	0 (0,00)	2 (4,88)	
Atividade Clínica	38 (42,69)	21 (43,75)	19 (46,34)	0,9868
Atividade endoscópica	48 (53,93)	24 (50,00)	23 (56,09)	0,6857
Classificação Endoscópica				0,5166
Remissão	43 (48,31)	25 (52,08)	20 (48,78)	
Leve	13 (14,60)	3 (6,25)	9 (21,95)	
Moderada	26 (29,21)	17 (35,41)	11 (26,82)	
Grave	7 (7,86)	4 (8,33)	3 (7,31)	
Atividade Histológica	23 (25,84)	15 (31,25)	8 (19,51)	-

Dados apresentados em n (%) e média (DP)

Análise das características ultrassonográficas dos pacientes com DII divididos por ausência e presença de DHGNA

Em relação à ultrassonografia hepática dos pacientes, não houve diferença estatística entre os diâmetros dos lobos direito e esquerdo. Considerando o grau de esteatose hepática, dentre os 41 pacientes do grupo DII+DHGNA, a maioria apresentou grau leve (60,97%) e apenas 4 (9,75%) pacientes apresentaram grau intenso. Em relação às bordas hepáticas, todos os pacientes do grupo DII sem DHGNA apresentaram bordas finas, enquanto no grupo DII+DHGNA a maioria apresentou bordas finas (92,68%) e somente 3 (7,31%) pacientes apresentaram bordas semi-

rombas. O mesmo parâmetro foi observado nos contornos, todos os pacientes do grupo DII sem DHGNA apresentaram contornos regulares, e no grupo DII+DHGNA e essa porcentagem foi de 97,56% e apenas 1 (2,43%) paciente apresentou contornos irregulares. Não se observou alteração esplênica, nem presença de trombos nos pacientes incluídos. É importante destacar que, devido às limitações da técnica, às aderências cirúrgicas que alguns pacientes possuem e ao preparo inadequado, há parâmetros que não foram observados/avaliados em todos os pacientes. Os dados comparativos estão descritos na tabela 8.

Tabela 8. Características ultrassonográficas dos pacientes com DII e divididos pela ausência ou presença de DHGNA.

VARIÁVEIS	Valores de referência	DII sem DHGNA (n= 48)	DII + DHGNA (n= 41)	P
Lobo Esquerdo (mm)	70-100	77,71±18,32	71,95±19,28	0,1457
Lobo Direito (mm)	120-150	122,11±22,03	119,29±25,41	0,5749
Lobo Caudado (mm)	< 60	44,84±13,23	43,70±19,20	0,7248
Veia Porta (mm)	< ou = 12	9,13±1,50	9,14±1,60	0,9859
Veia Esplênica (mm)	< ou = 9	5,03±1,41	4,97±1,39	0,8449
Veia Mesentérica Superior (mm)	< ou = 9	6,05±1,66	6,23±1,56	0,5832
Velocidade média veia porta	> ou = 15	24,64±12,03	27,80±8,65	0,4217
Índice esplênico (mm2)	< 60	28,77±11,40	29,94±9,30	0,7434
Grau esteatose				
Leve		0	25 (60,97)	<.0001
Moderada		0	12 (29,26)	
Intensa		0	4 (9,75)	
Ecogenicidade				
Normal		48 (100)	1 (2,43)	0,2189
Levemente aumentada		0	24 (58,53)	
Moderada aumentada		0	12 (29,26)	
Muito aumentada		0	4 (9,75)	
Contornos				
Regulares		48 (100)	40 (97,56)	0,8160
Irregulares		0	1 (2,43)	
Bordas				
Finas		48 (100)	38 (92,68)	0,7466
Semi-rombas		0	3 (7,31)	
Rombas		0	0	
Textura				
Homogênea		47 (97,92)	39 (95,12)	0,8104
Heterogênea		1 (2,08)	2 (4,87)	
Colédoco (mm)	2-5	3,35±0,67	3,53±0,76	0,2895
VVBB intra-hepato normais		48 (100)	41 (100)	-
Fluxo hepatopetal		48 (100)	41 (100)	-
Esplenomegalia		0	0	-
Colelitíase		3 (6,25)	2 (4,88)	-
Trombose de aorta, esplênica ou mesentérica		0	0	-

Dados apresentados em n (%) e média (DP). VVBB (vias-biliares)

Análise dos exames bioquímicos dos pacientes com DII, divididos pela ausência ou presença de DHGNA

Na avaliação dos parâmetros laboratoriais, os exames bioquímicos que apresentaram diferença significativa foram: PCR, ALT, GGT, BT e RNI, e encontram-se apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Exames bioquímicos dos pacientes com DII divididos pela ausência ou presença de DHGNA.

VARIÁVEIS	Valores de referência	DII sem DHGNA (n= 48)	DII + DHGNA (n= 41)	P
Hematócrito (%)	36 - 46	42,37±4,53	41,81±5,51	0,5866
Hemoglobina (g/dL)	12 - 15	14,24±1,66	14,01±1,91	0,5445
Plaquetas (/mm ³)	140.000 - 440.000	288.380±86.307	291.533±95.779	0,8576
Leucócitos (/mm ³)	4.000 - 10.000	7697,20±2831,41	7695,56±2477,71	0,9976
Ureia (mg/dL)	15 - 37	29,50±9,91	28,64±8,48	0,6540
Creatinina (mg/dL)	0,52 - 1,04	0,77±0,16	0,75±0,17	0,6693
Sódio (mmol/L)	134 - 145	139,44±2,10	136,96±14,44	0,3875
Potássio (mmol/L)	3,5 - 5,1	4,43±0,36	4,31±0,39	0,1228
PCR (mg/dL)	< 1	2,21±6,78	1,10±1,41	0,0053
VHS (mm/h)	0 - 20	17,55±23,12	22,64±22,92	0,1993
AST / TGO (U/L)	H < 59 // M < 36	25,66±7,66	25,51±10,00	0,9254
ALT / TGP (U/L)	H < 50 // M < 35	21,28±10,35	29,31±22,99	0,0027
FA (U/L)	36 - 126	70,84±30,98	68,63±20,57	0,6456
GGT (U/L)	H 15-73 // M 12-43	29,22±17,69	41,22±45,85	0,0072
BT (mg/dL)	0,2 - 1,3	0,86±0,37	0,74±0,27	0,0439
BI (mg/dL)	< 1,1	0,54±0,34	0,44±0,26	0,1722
BD (mg/dL)	< 0,3	0	0,01±0,04	-
Albumina (g/dL)	3,5 - 5,0	4,28±0,48	4,22±0,38	0,5229
RNI		1,02±0,09	0,98±0,09	0,0268
Ferritina (ng/dL)	H 22-322 // M 10-291	101,91±93,75	93,17±137,35	0,6857
Ferro (ng/dL)	H 75-175 // M 65-165	101,52±42,51	81,17±40,56	0,0528
TSH (micro IU/mL)	0,4-4,0	1,75±0,97	1,72±0,96	0,9080

Dados apresentados em n (%) e média (DP). PCR (Proteína C Reativa); VHS (velocidade de hemossedimentação); AST (Aspartato aminotransferase); ALT (Alanina aminotransferase); FA (Fosfatase alcalina); GGT (gama glutamil transferase); BT (Bilirrubina Total); BI. (Bilirrubina Indireta); BD (Bilirrubina direta), RNI (Razão Normalizada Internacional); TSH (Hormônio tireoestimulante).

Avaliação da permeabilidade intestinal

Com relação a permeabilidade observamos uma maior produção dos níveis de ocludina no grupo com DII+DHGNA quando comparado ao grupo com DII sem DHGNA (Figura 2). Em contrapartida, não observamos diferença estatística entre os grupos DII sem DHGNA e DII+DHGNA quanto aos níveis de zonulina (Figura 2).

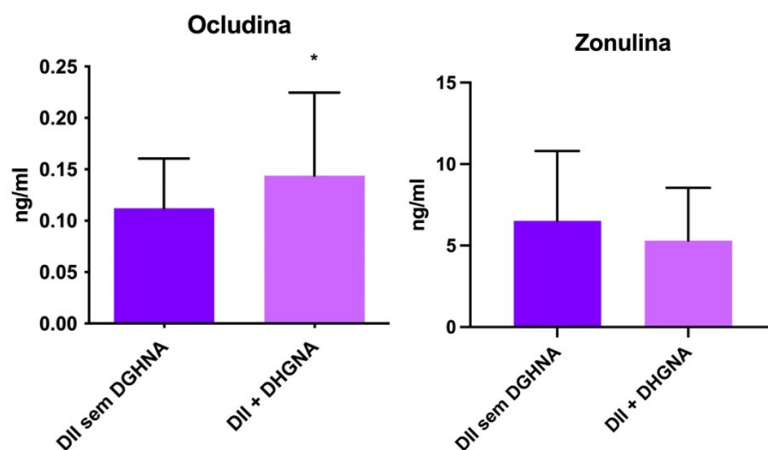


Figura 2. Avaliação dos níveis de ocludina e zonulina presentes nas amostras de soro, detectado por ELISA. Dados expressos em média $\pm$ D.P.M. com $*p<0,05$, analisados por Teste T- Student.

Avaliação de marcadores inflamatórios por ELISA

Quanto aos marcadores inflamatórios foi possível observar um padrão semelhante entre as doenças quanto aos níveis circulantes de citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α ; INF- γ , MIG e RANTES) e anti-inflamatórias (IL-10), apesar do grupo DII + DHGNA serem portadores de duas doenças com um perfil inflamatório complexo, este grupo não diferiu do grupo portador de DII sem DHGNA com relação a estas citocinas (Figura 4). No entanto, houve uma diferença significativa quanto aos níveis circulantes das citocinas inflamatórias IP-10 e MCP-1 quando comparado os grupos DII + DHGNA e DII sem DHGNA (Figura 3).

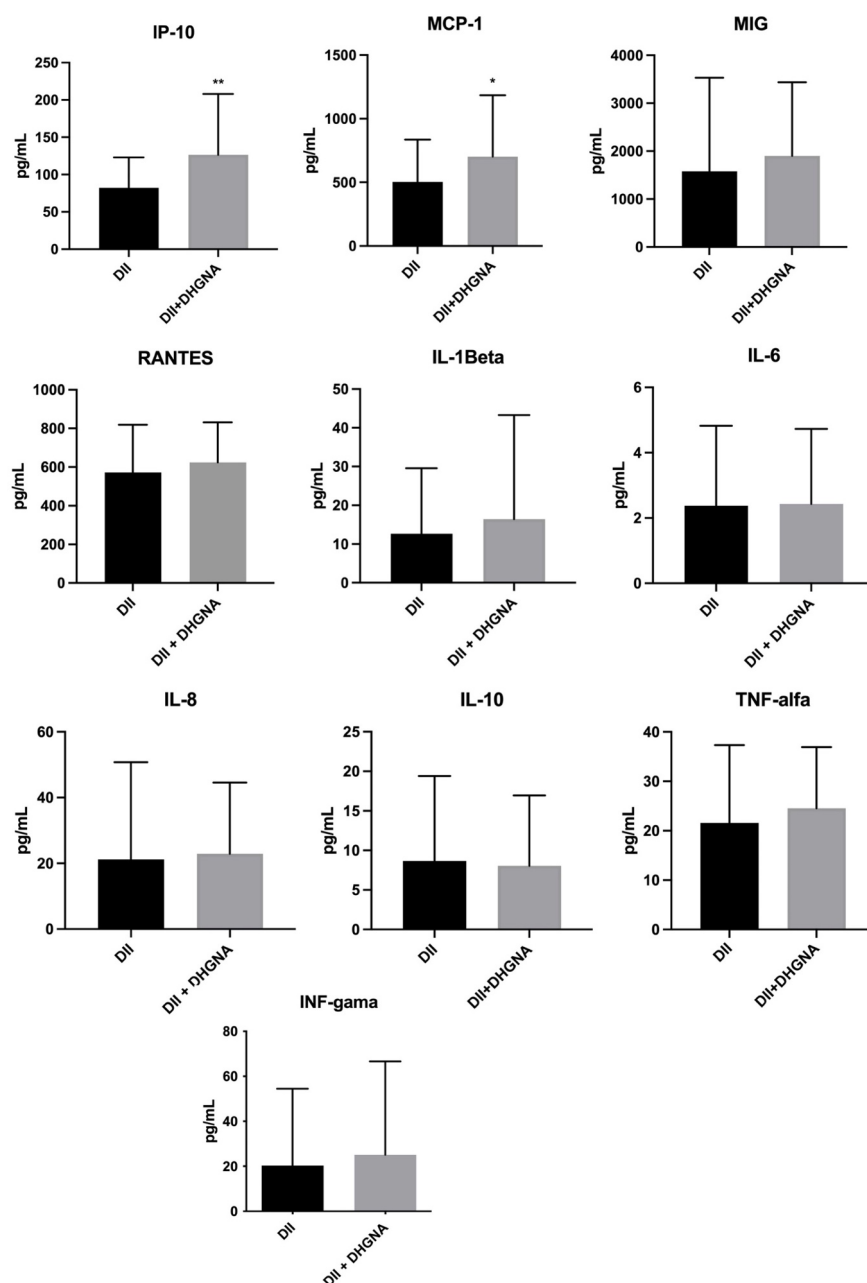


Figura 3. Avaliação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF-alfa, INF-gama, IL-1 beta, IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1, MIG e RANTES) e anti-inflamatória (IL-10) detectadas por ELISA através de amostras de soro. Dados expressos em média $\pm$ D.P.M. com * $p<0,05$ e ** $p<0,01$, analisados por Teste T- Student.

Análise da expressão de microRNA (miRNA)

Foram analisados até o momento 55 genes alvos e destes 3 genes se apresentaram mais expressos no grupo DII sem DHGNA (Figura 4).

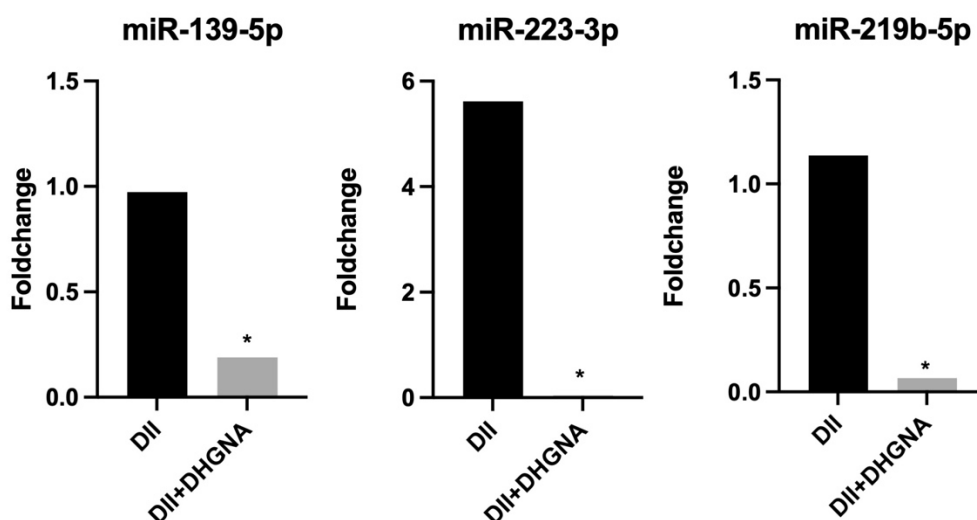


Figura 4. Avaliação da expressão de miRNAs (miR-139-5p, miR-223-3p, miR-219b-5p) através de amostras de soro. Dados expressos em mediana com * $p < 0,05$, analisados por Teste de Mann-Whitney.

5) DISCUSSÃO

A coexistência de DII e DHGNA, segundo a literatura, deve-se à interação de diversos fatores, como microbiota alterada, síndrome metabólica, predisposição genética, resposta imunológica alterada, atividade da DII e uso de medicamentos (Chao et al, 2016). Todavia, é importante destacar que, atualmente, considera-se que a alteração da microbiota justifique a coexistência de ambas as doenças (SIDHU, 2017; DE GROOT 2017).

Dos 313 pacientes do ambulatório de DII abordados foram selecionados 89 pacientes para o presente estudo, sendo 39 portadores de DC (43,82%) e 50 portadores de RCU (56,18%). Foi constatada a presença de DHGNA em 41, ou seja, 46,07%. Em contrapartida, no maior estudo brasileiro sobre DHGNA, o qual avaliou 11647 indivíduos na cidade de São Paulo, encontrou-se taxa de 28,5% de DHGNA (Conceição et al, 2011). Outros estudos brasileiros encontraram prevalência de DHGNA que variou de 10,7% a 37% (PARISE ET AL, 2003; SOLER ET AL, 2008; KARNIKOWSKI ET AL, 2007; TESTONI ET AL, 2015; CRUZ ET AL, 2016). Percebe-se, então, elevada frequência de DHGNA nos pacientes portadores de DII quando comparados à população geral, uma vez a inflamação sistêmica e a disbiose intestinal, presentes nesses pacientes é fator de risco importante para DHGNA (SIDHU, 2017; CHAO, 2016).

Dos pacientes incluídos neste estudo 31,18% relatam consumo social de bebida alcoólica, isto é, inferior a 30g/d para homens e 20g/dia para mulheres. Observou-se que a maior parte dos pacientes que consomem álcool está no grupo DII+DHGNA (39,02,5% vs 27,08%). Um estudo publicado em 2018, o qual avaliou dados de 22638 pacientes com DII usuários do SUS no estado

de São Paulo, mostrou perfil semelhante de pacientes, sendo a idade média de 45,5 anos, com predominância do sexo feminino (GASPARINI ET AL, 2018).

Com relação aos medicamentos utilizados pelos pacientes, os principais foram a azatioprina, os salicílicos e os biológicos, com destaque para o infliximabe. Não observamos, porém, correlação entre os medicamentos de uso atual e presença de DHGNA. Por outro lado, Chao et al (2016) relatam, em revisão sistemática, associação entre o uso de glicocorticoides e DHGNA em estudos in vitro, porém, a correlação em humanos não é direta, sendo que nenhum estudo prospectivo foi capaz de estabelecer o uso de glicocorticoides como fator de risco independente para DHGNA. Todavia, devido aos resultados conflitantes, os autores recomendam cautela no uso de tais medicamentos em pacientes com fatores de risco metabólicos. Além disso, os autores destacam que, apesar da azatioprina estar correlacionada a danos hepáticos, tais como redução da função hepática, peliose hepática e hepatite colestática, não há evidências claras entre o uso deste medicamento e a presença de DHGNA e não há publicações suficientes que mostrem o impacto do uso deste medicamento em pacientes com DHGNA (CHAO ET AL, 2016).

Em relação aos aspectos nutricionais avaliados, observou-se correlação entre o IMC e a presença de DHGNA ($26,68 \pm 2,63$ vs $24,25 \pm 3,04$). Em estudo com 1280 pacientes diagnosticados com DHGNA, foi observado que 89,1% dos pacientes estavam acima do IMC recomendado, sendo 44,4% classificados como sobrepeso e 44,7% como obesos (COTRIM 2016). Ademais, a literatura mostra que obesidade e síndrome metabólica são importantes fatores de risco para DHGNA e esteatohepatite não alcoólica (Friedman 2018). Nesta etapa do trabalho, devido a dificuldades de agenda, uma vez que a maior parte dos pacientes não é residente de Botucatu e não possui fácil acesso ao serviço, não foram incluídos outros dados antropométricos como a composição corporal.

É importante destacar que as principais variáveis associadas à presença de DHGNA nos pacientes avaliados são, também, associadas à síndrome metabólica ou marcadores inflamatórios. Um estudo de 2016 revelou que a atividade da DII estava diretamente relacionada à gravidade da DHGNA (BESSISSOW 2016). Contudo, observaram menor atividade da DII nos pacientes diagnosticados com DHGNA (SAGAMI 2017). Em nosso estudo, 46,34% dos pacientes com DII+DHGNA apresentaram atividade clínica da DII e 60,97% possuem esteatose leve, 29,26% moderada e 9,75% intensa; porém, não observamos correlação entre a atividade da DII e presença de DHGNA. Acerca das bordas hepáticas, 92,68% dos pacientes com DII+DHGNA apresentam bordas finas, enquanto 7,31% apresentam bordas semi-rombas.

Quanto a permeabilidade intestinal avaliamos dois marcadores a ocludina e a zonulina. A ocludina é uma proteína de 522 aminoácidos que atravessa a membrana quatro vezes para formar dois loops extracelulares e um loop intracelular, essa proteína tem papel regulador estrutural das

tight junctions, promovendo a manutenção da barreira dos epitélios intestinais (KUO et al., 2022). Enquanto a zonulina, uma proteína de 47 kDa, emergiu como um biomarcador da permeabilidade intestinal por meio da modulação das *tight junctions* (DE MUNCK et al., 2020; HENDY et al., 2017). Um estudo realizado com pacientes portadores de DII observou um baixo nível de ocludina circulante quando comparado ao grupo saudável, o que poderia indicar uma degradação extracelular desta proteína no intestino desses pacientes devido a atividade da doença (GÓRECKA et al., 2024). No entanto, observamos uma maior produção de ocludina no grupo com DII+DHGNA quando comparado ao grupo com DII sem DHGNA.

Níveis aumentados de zonulina sérico/plasmático têm sido associados a uma ampla gama de doenças crônicas, como doença celíaca, diabetes (WOOD HEICKMAN; DEBOER; FASANO, 2020) e transtornos mentais (ZENGIL; LALOĞLU, 2023). No entanto, os resultados são contraditórios e ainda não totalmente compreendidos sobre o papel da zonulina em estados importantes da DII (FASANO, 2020; WANG et al., 2022). Um estudo observou uma associação dos níveis séricos de zonulina com a DII prevalente, mas não com a DII incidente, sugerindo que a permeabilidade intestinal prejudicada pode ser uma consequência, e não uma causa, da resposta inflamatória crônica que caracteriza tanto a DC quanto a RCU (WANG et al., 2022) e, também na DHGNA. De fato, em nosso estudo não foi possível observar diferenças estatísticas entre os grupos quanto aos níveis séricos de zonulina.

Por se tratar de duas doenças inflamatórias é possível que o organismo que apresente DII + DHGNA estimule uma maior produção de ocludina visando promover a manutenção da barreira intestinal, para proteger o epitélio intestinal de alterações que podem ser desencadeadas por citocinas inflamatórias comumente elevadas na DII e na DHGNA. No entanto, não houve diferença na produção de proteína reguladora de permeabilidade (zonulina), impedindo que ocorra uma ligação proporcional entre zonulina e ocludina, resultante em uma possível tentativa de restauração da integridade intestinal prejudicada no grupo DII + DHGNA.

Estudos evidenciam associação entre DII e risco aumentado para o desenvolvimento de DHGNA, devido aos mecanismos fisiopatológicos presentes em ambas as doenças, como secreção elevada de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6 (MAGRO et al., 2019; SARTINI et al., 2018; SOURIANARAYANANE et al., 2013; SPAGNUOLO et al., 2019). De fato, foi possível observar um padrão semelhante entre as doenças quanto aos níveis circulantes de citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α ; INF- γ , MIG e RANTES) e anti-inflamatórias (IL-10), pois apesar do grupo DII + DHGNA serem portadores de duas doenças com um perfil inflamatório complexo, este grupo não diferiu do grupo portador de DII sem DHGNA com relação a estas citocinas. No entanto, houve uma diferença significativa quanto

aos níveis circulantes das citocinas inflamatórias IP-10 e MCP-1 quando comparado os grupos DII + DHGNA e DII sem DHGNA.

Estudo evidenciam que pacientes com DHGNA têm expressões aumentadas da IP-10 e da MCP-1, estas quimiocinas podem contribuir na progressão da doença ao induzir inflamação hepática, apoptose, necrose de hepatócitos e fibroses (KANG et al., 2023; WADA et al., 2017). IP-10 e MCP-1, quimiocinas que atuam em monócitos, linfócitos T ativados, eosinófilos e basófilos, são descritos como poderosos participantes na gravidade da doença de pacientes com DII (MARTINEZ-FIERRO et al., 2019; OTT et al., 2023). Diante disso, podemos inferir que a diferença entre os grupos seja devido aos pacientes portadores de DII e DGHNA produzirem mais destas quimiocinas devido ao processo inflamatório existente nas células do trato gastrointestinal e nos hepatócitos concomitantemente.

Um biomarcador recentemente relacionado com a permeabilidade intestinal e com processo inflamatórios são os microRNAs (miRNAs), pequenas moléculas de RNA não codificante, cuja estrutura é composta por cerca de 22 nucleotídeos, e são responsáveis pela regulação gênica devido à capacidade de se ligarem à região 3' *untranslated region* (3'-UTR) do RNA mensageiro (RNAm) e inibirem a tradução parcial ou completa de seus genes alvos (MOEIN et al., 2019). Essas moléculas controlam diversos processos celulares como proliferação, diferenciação, migração, maturação e apoptose, além de estarem relacionadas à regulação imunológica em condições fisiológicas e patológicas e, portanto, estarem diretamente ligadas à patogênese de doenças autoimunes, inflamatórias, cardiovasculares e de neoplasias (XU; ZHANG, 2016). De fato, estudos evidenciam que os miRNAs podem contribuir para a etiologia evolutiva da DII e da DGHNA (HENDY et al., 2019; JAMES et al., 2020; JI et al., 2018; JOHNSTON et al., 2018; LIU et al., 2018a, 2018b).

A interação dos miRNAs envolvidos na patogenia dessas doenças com os seus respectivos genes alvos afeta a expressão de fatores de transcrição e interleucinas, e processos celulares como autofagia, displasia e a integridade da barreira epitelial (HÜBENTHAL et al., 2015). Identificar essas moléculas pode auxiliar na compreensão da fisiopatologia dessas doenças a partir da via de inflamação em que as mesmas estão influenciando. Dessa forma identificamos neste estudo, até o momento, a alta expressão dos miRNAs miR-139-5p, miR223-3p, miR-219b-5p nos pacientes portadores de DII sem DHGNA quando comparados ao grupo de pacientes portadores DII+DGHNA.

O miR-139-5p foi apontado como um miRNA supressor de tumor, que controla o crescimento celular, regula a inflamação crônica suprimindo a atividade do NF-kB para inibir a proliferação e invasão celular (ZHU et al., 2019). Este miRNA tem sido implicado em processos de inflamação colônica. De fato, um estudo demonstrou um aumento na expressão do miR-139-

5p em pacientes portadores de RCU (SÁEZ-GONZÁLEZ et al., 2024), corroborando com os nossos resultados. Em contrapartida um estudo observou que o mesmo miRNA apresenta expressão reduzida em pacientes com DGHNA (LATORRE et al., 2017). Desta forma, é possível que o grupo DII+DGHNA apresentou menor expressão deste miRNA devido as características da DGHNA nestes pacientes.

Assim como o miR-139-5p, o miR-223-3p também é reconhecido como um gene supressor tumoral que pode inibir a proliferação e a migração de uma variedade de tumores pela via do NF-kB, além de atuar na inibição da resposta inflamatória (LI et al., 2020; LONG et al., 2020; RENG et al., 2020). Estudos realizados com pacientes com DII observaram um aumento na expressão do miR-223-3p em pacientes portadores de DC e em pacientes com RCU ativa respectivamente (PECK et al., 2015; POLYTARCHOU et al., 2015). Enquanto, que um estudo realizado com pacientes com DGHNA foi demonstrando um aumento da expressão deste miRNA apenas nos pacientes idosos, mas o mesmo aumento da expressão do miR-223-3p não foi observado no grupo de paciente com DGHNA jovens, sugerindo que o miR-223-3p possa estar intimamente relacionado à ocorrência e ao desenvolvimento de alterações gordurosas ou resistência à insulina hepática em idosos (ZHANG et al., 2020). Esses dados reforçam os resultados obtidos em nosso estudo, uma vez que houve aumento da expressão do miR-223-3p no grupo com DII sem DGHNA quando comparado ao grupo DII+DGHNA, com a média de idade destes pacientes de $45,71 \pm 12,20$.

Quanto ao miR-219b-5p não há estudos que relacionem a expressão deste miRNA com a DII e/ou DGHNA, desta forma os nossos resultados quando a este miRNA será inovador nesta área, podendo ser um novo biomarcador identificado para estas doenças.

Por fim, ressaltamos a importância deste estudo no contexto brasileiro e internacional, pois, apesar da crescente prevalência de DGHNA na população geral, há poucos estudos sobre a prevalência da DGHNA nos pacientes com DII. Além disso, ambas as doenças não possuem sua patogênese totalmente elucidada, apesar dos estudos apontarem a disbiose como um dos principais mecanismos envolvidos. Pretendemos dar seguimento nessa linha de pesquisa realizando a avaliação da microbiota intestinal dos pacientes portadores de DII + DGHNA em comparação com os pacientes com DII sem DGHNA (a ser realizado até final do presente semestre), bem como finalizar as análises de perfil de microRNA (dos 93 genes selecionados, que se encontram em análise), conforme proposta do estudo. Desejamos contribuir para cobrir a lacuna a respeito dessa temática e que, no futuro, os resultados possam contribuir para se elucidar o papel da DII como fator de risco para DGHNA, buscando controlar os fatores clínicos associados à doença possibilitando, assim, a prevenção da evolução para cirrose hepática e garantindo uma melhor qualidade de vida aos pacientes.

Conclusões

- Observou-se alta prevalência de DHGNA nos pacientes com DII (46,07%)
- Os fatores associados com a presença de DHGNA nos pacientes com DII foram sexo masculino, hipertensão arterial, dislipidemia, e outros fatores associados com síndrome metabólica (glicemia, triglicérides e insulina), e parâmetros nutricionais como IMC elevado
- O grupo com DII+DHGNA apresentou maiores níveis de ocludina, e das citocinas IP-10 e MCP-1
- O grupo DII sem DHGNA apresentou maior expressão dos miR-139-5p, miR-223-3p e miR-219-5p
- Identificamos um possível novo marcador para DII e/ou DHGNA: o miR-219-5p
- Com base nos resultados obtidos até o momento já é possível observar que o perfil do grupo DII sem DHGNA difere do grupo DII+DHGNA, e que estas diferenças podem ser uma importante forma de identificar e diagnosticar precocemente pacientes com DII que apresentem pré-disposição a desenvolver DHGNA

Referências Bibliográficas

- ACHARYA, C.; BAJAJ, J. S. Gut Microbiota and Complications of Liver Disease. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 46, n. 1, p. 155–169, 2017.
- ALBHAISI, S. A. M.; BAJAJ, J. S.; SANYAL, A. J. Role of gut microbiota in liver disease. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 318, n. 1, p. G84–G98, 2020.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1997.
- ALTVEŞ, S.; YILDIZ, H. K.; VURAL, H. C. Interaction of the microbiota with the human body in health and diseases. **Bioscience of Microbiota, Food and Health**, v. 39, n. 2, p. 23–32, 2020.
- BÄCKHED, F. et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine. **Science**, v. 307, n. 5717, p. 1915–1920, 2005.
- BAKER, S. S. et al. Role of alcohol metabolism in non-alcoholic steatohepatitis. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, 2010.
- BALMUS, I. et al. The implications of oxidative stress and antioxidant therapies in Inflammatory Bowel Disease: Clinical aspects and animal models. **Saudi Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 1, p. 3–17, 2016.
- BAYARD, M.; HOLT, J.; BOROUGHS, E. Nonalcoholic fatty liver disease. **American Family Physician**, 2006.
- BELLENTANI, S. The epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. **Liver International**, v. 37, p. 81–84, 2017.

- BESSISSOW, T. et al. Incidence and Predictors of Nonalcoholic Fatty Liver Disease by Serum Biomarkers in Patients with Inflammatory Bowel Disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 22, n. 8, p. 1937–1944, 2016.
- BISCHOFF, S. C. et al. Intestinal permeability - a new target for disease prevention and therapy. **BMC Gastroenterology**, v. 14, n. 1, p. 1–25, 2014.
- BRENNAN, C. A.; GARRETT, W. S. *Fusobacterium nucleatum* — symbiont, opportunist and oncobacterium. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 156–166, 2019.
- CAMILLERI, M. et al. The Leaky Gut: Mechanisms, Measurement and Clinical Implications in Humans. **Gut**, v. 68, n. 8, p. 1516–1526, 2019.
- CAPORASO, J. G. et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **ISME Journal**, v. 6, n. 8, p. 1621–1624, 2012.
- CHAO CY, BATTAT R, AL KHOURY A, RESTELLINI S, SEBASTIANI G, BESSISSOW T. Co-existence of non-alcoholic fatty liver disease and inflammatory bowel disease: A review article. **World J Gastroenterol**, 14;22(34):7727-34, 2016.
- CHONG, J. et al. Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data. **Nature Protocols**, v. 15, n. 3, p. 799–821, 2020.
- CONCEIÇÃO RDO, KASHIWAGI NM, DE CARVALHO JAM, CARVALHO L, PARISE ER. Elevada prevalência de esteatose hepática em indivíduos submetidos a check-up, na cidade de São Paulo e sua associação com risco de desenvolvimento de diabetes e eventos cardiovasculares. In: **XXI Congresso Brasileiro de Hepatologia - 2011**, Salvador, BA. Anais (on-line). Disponível em: https://www.sbhepatologia.org.br/pdf/anais_21congresso.pdf
- COTRIM HP, PARISE ER, OLIVEIRA CP, LEITE N, MARTINELLI A, GALIZZI, J, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in Brazil. Clinical and histological profile. **Ann Hepatol**, v. 10, n.1, p. 33-37, 2016.
- CRUZ, JOSILDA FERREIRA, ET AL. "Relação entre a esteatose hepática não alcoólica e as alterações dos componentes da síndrome metabólica e resistência à insulina. **Rev Soc Bras Clin Med** 14.2: 79-83, 2016.
- D'HAENS, G. et al. A Review of Activity Indices and Efficacy End Points for Clinical Trials of Medical Therapy in Adults With Ulcerative Colitis. **Gastroenterology**, v. 132, n. 2, p. 763–786, 2007.
- DAI, Z. et al. Multi-cohort analysis of colorectal cancer metagenome identified altered bacteria across populations and universal bacterial markers. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 70, 2018.
- DAPERNO, M. et al. Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: The SES-CD. **Gastrointestinal Endoscopy**, v. 60, n. 4, p. 505–512, 2004.
- DE GROOT PF, FRISSEN MN, DE CLERCQ NC, NIEUWDORP M. Fecal microbiota transplantation in metabolic syndrome: History, present and future. **Gut Microbes**, 8(3):253-267, 2017.
- DE MUNCK, T. J. I. et al. Intestinal permeability in human nonalcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. **Liver International**, v. 40, n. 12, p. 2906–2916, 2020.

- DE SANTIS, S. et al. Nutritional keys for intestinal barrier modulation. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. DEC, 2015.
- DOLLÉ, L. et al. Policing of gut microbiota by the adaptive immune system. **BMC Medicine**, v. 14, n. 1, p. 4–7, 2016.
- DRAGO, L.; VALENTINA, C.; FABIO, P. Gut microbiota, dysbiosis and colon lavage. **Digestive and Liver Disease**, v. 51, n. 9, p. 1209–1213, 2019.
- DUARTE, S. M. B. et al. Gut microbiome composition in lean patients with NASH is associated with liver damage independent of caloric intake: A prospective pilot study. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 28, n. 4, p. 369–384, 2018.
- DUARTE, S. M. B.; STEFANO, J. T.; OLIVEIRA, C. P. Microbiota and nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis (NAFLD/NASH). **Annals of Hepatology**, v. 18, n. 3, p. 416–421, 2019.
- ECKBURG, P. B. et al. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. **Science**, v. 308, n. 5728, p. 1635–1638, 2005.
- FASANO, A. All disease begins in the (leaky) gut: Role of zonulin-mediated gut permeability in the pathogenesis of some chronic inflammatory diseases. **F1000Research**, v. 9, p. 1–12, 2020.
- FRIEDMAN SL, NEUSCHWANDER-TETRI BA, RINELLA M, SANYAL AJ. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. **Nat Med.**, 24(7):908-92, 2018.
- GASPARINI RG, SASSAKI LY, SAAD-HOSSNE R. Inflammatory bowel disease epidemiology in São Paulo State, Brazil. **Clinical and Experimental Gastroenterology**, 11 423–429, 2018.
- GISBERT, J. P. et al. Liver injury in inflammatory bowel disease: Long-term follow-up study of 786 patients. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 13, n. 9, p. 1106–1114, 2007.
- GNAUCK, A.; LENTLE, R. G.; KRUGER, M. C. The Characteristics and Function of Bacterial Lipopolysaccharides and Their Endotoxic Potential in Humans. **International Reviews of Immunology**, v.35, n.3, p. 189-218, 2016.
- GÓRECKA, A. et al. Biochemical Modulators of Tight Junctions (TJs): Occludin, Claudin-2 and Zonulin as Biomarkers of Intestinal Barrier Leakage in the Diagnosis and Assessment of Inflammatory Bowel Disease Progression. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 29, n. 19, 2024.
- HALL, A. B. et al. A novel Ruminococcus gnavus clade enriched in inflammatory bowel disease patients. **Genome Medicine**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2017.
- HARMSSEN, H. J. M.; GOFFAU, M. C. DE. The Human Gut Microbiota. In: SCHWIERTZ, A. (Ed.). . **Microbiota of the Human Body- Implications in Healthy and Disease**. Switzerland: [s.n.]. v. 902p. 95–108.
- HARVEY, R. F.; BRADSHAW, J. M. A Simple index of Crohn'S Disease Activity. **The Lancet**, v. 315, n. 8167, p. 514, 1980.
- HENDY, O. M. et al. Evaluation of circulating zonulin as a potential marker in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. **Apmis**, v. 125, n. 7, p. 607–613, 2017.
- HENDY, O. M. et al. The Circulating Micro-RNAs (–122, –34a and –99a) as Predictive Biomarkers

- for Non-Alcoholic Fatty Liver Diseases This. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 12, p. 2715–2723, 2019.
- HILLS, R. D. et al. Gut microbiome: Profound implications for diet and disease. **Nutrients**, v. 11, n. 7, p. 1–40, 2019.
- HONDA, K.; LITTMAN, D. R. The Microbiome in Infectious Disease and Inflammation. **Annual Review of Immunology**, v. 30, p. 759–795, 2012.
- HÜBENTHAL, M. et al. Sparse Modeling Reveals miRNA Signatures for Diagnostics of Inflammatory Bowel Disease. **PloS one**, v. 10, n. 10, 14 out. 2015.
- JAMES, J. P. et al. MicroRNA biomarkers in IBD-differential diagnosis and prediction of colitis-associated cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 21, p. 1–19, 2020.
- JENSEN, L. J. et al. eggNOG: Automated construction and annotation of orthologous groups of genes. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. SUPPL. 1, p. 250–254, 2008.
- Jl, Y. et al. Faecal microRNA as a biomarker of the activity and prognosis of inflammatory bowel diseases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 503, n. 4, p. 2443–2450, 2018.
- JOHNSTON, D. G. W. et al. Loss of microRNA-21 influences the gut microbiota, causing reduced susceptibility in a murine model of colitis. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 12, n. 7, p. 835–848, 2018.
- KANG, J. et al. Notch-mediated hepatocyte MCP-1 secretion causes liver fibrosis. **JCI Insight**, v. 8, n. 3, p. 1–14, 2023.
- KARNIKOWSKI M, CORDOVA C, OLIVEIRA RJ, KARNIKOWSKI MG, NÓBREGA ODE T. Non-alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome in Brazilian middle-aged and older adults. **Sao Paulo Med J.**, v. 125, n. 6, p. 333-337, 2007.
- KENT, W. J. BLAT — The BLAST -Like Alignment Tool. **Genome Research**, v. 12, p. 656–664, 2002
- KÖNIG, J. et al. Human intestinal barrier function in health and disease. **Clinical and Translational Gastroenterology**, v. 7, n. 10, 2016.
- KUO, W. T. et al. Tight junction proteins occludin and ZO-1 as regulators of epithelial proliferation and survival. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1514, n. 1, p. 21–33, 2022.
- LACERDA, J. F. et al. Functional food components, intestinal permeability and inflammatory markers in patients with inflammatory bowel disease. **Nutrients**, v. 13, n. 2, p. 1–15, 2021.
- LATORRE, J. et al. Decreased lipid metabolism but increased FA biosynthesis are coupled with changes in liver microRNAs in obese subjects with NAFLD. **International Journal of Obesity**, v. 41, n. 4, p. 620–630, 2017.
- LEY, R. E.; PETERSON, D. A.; GORDON, J. I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 837–848, 2006.
- LI, Q. et al. Long non-coding RNA SLCO4A1-AS1 drives the progression of non-small-cell lung cancer by modulating miR-223-3p/IKK α /NF- κ B signaling. **Cancer biology & therapy**, v. 21, n. 9,

- p. 806–814, 2020.
- LIU, C. H. et al. miRNAs in patients with non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Hepatology**, v. 69, n. 6, p. 1335–1348, 2018a.
- LIU, J. et al. A circulating microRNA signature as noninvasive diagnostic and prognostic biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis. **BMC Genomics**, v. 19, n. 1, p. 1–10, 2018b.
- LIU, J. Z. et al. Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. **Nature Genetics**, v. 47, n. 9, p. 979–986, 2015.
- LYNCH, S. V.; PEDERSEN, O. The human intestinal microbiome in health and disease. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 24, p. 2369–2379, 2016.
- LONG, F. QUAN et al. MiR-223-3p inhibits rTp17-induced inflammasome activation and pyroptosis by targeting NLRP3. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 24, n. 24, p. 14405–14414, 1 dez. 2020.
- LUO, R. et al. SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient sort read de novo assembler. **GigaScience**, v. 1, n. 18, p. 1–6, 2012.
- MAGRO, D. O. et al. Remission in Crohn’s disease is accompanied by alterations in the gut microbiota and mucins production. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.
- MARTINEZ-FIERRO, M. L. et al. Serum cytokine, chemokine, and growth factor profiles and their modulation in inflammatory bowel disease. v. 38, n. July, 2019.
- MARTINEZ-MEDINA, M.; GARCIA-GIL, L. J. Escherichia coli in chronic inflammatory bowel diseases: An update on adherent invasive Escherichia coli pathogenicity . **World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology**, v. 5, n. 3, p. 213, 2014.
- MILOSEVIC, I. et al. Gut-liver axis, gut microbiota, and its modulation in the management of liver diseases: A review of the literature. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 2, p. 1–16, 2019.
- MOEIN, S. et al. **MiRNAs and inflammatory bowel disease: An interesting new story** **Journal of Cellular Physiology**, 2019.
- MOHAMMAD, S.; THIEMERMANN, C. Role of Metabolic Endotoxemia in Systemic Inflammation and Potential Interventions. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. January, p. 1–16, 2021.
- MORIYA, Y. et al. KAAS: An automatic genome annotation and pathway reconstruction server. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. SUPPL.2, p. 182–185, 2007.
- NISHIDA, A. et al. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Clinical Journal of Gastroenterology**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2018.
- OGATA, H. et al. KEGG : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 1, p. 29–34, 1999.
- OLIGSCHLAEGGER, Y. et al. Inflammatory Bowel Disease: A Stressed “Gut/Feeling”. **Cells**, v. 8, n. 7, p. 659, 2019.
- OTT, A. et al. Serum cytokines MCP-1 and GCS-F as potential biomarkers in pediatric inflammatory bowel disease. **PLoS ONE**, v. 18, n. 11 November, p. 1–21, 2023.

- PARISE, EDISON R; SALGADO, ANA LÚCIA DE A; SECAF, RITA; CERRI, LUCIANA; CERRI, GIOVANNI. Prevalência de esteatose hepática em ultra-sonografia de abdome / Prevalence of liver steatosis in abdominal ultrasound. **GED gastroenterol. endosc. dig**;22(6):235-237, 2003.
- PECK, B. C. E. et al. MicroRNAs classify different disease behavior phenotypes of Crohn's disease and may have prognostic utility. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 21, n. 9, 2015.
- POLYTARCHOU, C. et al. Assessment of circulating MicroRNAs for the diagnosis and disease activity evaluation in patients with ulcerative colitis by using the nanostring technology. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 21, n. 11, p. 2533–2539, 2015.
- POTRYKUS, M. et al. Intestinal microbiota as a contributor to chronic inflammation and its potential modifications. **Nutrients**, v. 13, n. 11, p. 1–20, 2021.
- QIN, J. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, v. 464, n. 7285, p. 59–65, 2010.
- RAMÍREZ-PÉREZ, O. et al. The Role of the Gut Microbiota in Bile Acid Metabolism. **Annals of hepatology**, v. 16, p. S21–S26, 2017.
- REN, N. et al. LncRNA ADAMTS9-AS2 inhibits gastric cancer (GC) development and sensitizes chemoresistant GC cells to cisplatin by regulating miR-223-3p/NLRP3 axis. **Aging**, v. 12, n. 11, p. 11025–11041, 15 jun. 2020.
- ROWLAND, I. et al. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. **European Journal of Nutrition**, v. 57, n. 1, p. 1–24, 2018.
- RUTGEERTS, P. et al. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 23, p. 2462–76, 2005.
- SÁEZ-GONZÁLEZ, E. et al. MicroRNA and granulocyte-monocyte adsorption apheresis combotherapy after inadequate response to anti-TNF agents in ulcerative colitis. **Journal of Clinical Apheresis**, v. 39, n. 1, 2024.
- SAGAMI S, UENO Y, TANAKA S, FUJITA A, HAYASHI R, OKA S, et al. Significance of non-alcoholic fatty liver disease in Crohn's disease: A retrospective cohort study. **Hepatology Research**, 47(9);872-881, 2017.
- SÁNCHEZ-TAPIA, M.; TOVAR, A. R.; TORRES, N. Diet as Regulator of Gut Microbiota and its Role in Health and Disease. **Archives of Medical Research**, v. 50, n. 5, p. 259–268, 2019.
- SARTINI, A. et al. Non-alcoholic fatty liver disease phenotypes in patients with inflammatory bowel disease. **Cell Death and Disease**, v. 9, n. 2, 2018.
- SAVERYMUTTU, S. H.; JOSEPH, A. E. A.; MAXWELL, J. D. Ultrasound scanning in the detection of hepatic fibrosis and steatosis. **British Medical Journal (Clinical research ed.)**, 1986.
- SEETHALER, B. et al. Biomarkers for assessment of intestinal permeability in clinical practice. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 321, n. 1, p. G11–G17, 2021.
- SEREK, P.; OLEKSY-WAWRZYNIAK, M. The effect of bacterial infections, probiotics and zonulin on intestinal barrier integrity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, 2021.

- SHEEHAN, D.; MORAN, C.; SHANAHAN, F. The microbiota in inflammatory bowel disease. **Journal of Gastroenterology**, v. 50, n. 5, p. 495–507, 2015.
- SIDHU M, VAN DER POORTEN D. The gut microbiome. **Aust Fam Physicia**, v.46, n 4, p. 206-211, 2017.
- SODERHOLM, A. T.; PEDICORD, V. A. Intestinal epithelial cells: at the interface of the microbiota and mucosal immunity. **Immunology**, v. 158, n. 4, p. 267–280, 2019.
- SOLER GLN, SILVA AWSM, SILVA VCG, TEIXEIRA RJ. Doença hepática gordurosa não-alcoólica: associação com síndrome metabólica e fatores de risco cardiovascular. **Rev SOCERJ**, 21:94-100, 2018.
- SOURIANARAYANANE, A. et al. Risk factors of non-alcoholic fatty liver disease in patients with inflammatory bowel disease. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 7, n. 8, p. e279–e285, 2013.
- SPAGNUOLO, R. et al. Weight gain and liver steatosis in patients with inflammatory bowel diseases. **Nutrients**, v. 11, n. 2, 2019.
- STECHEER, B.; MAIER, L.; HARDT, W. D. “Blooming” in the gut: How dysbiosis might contribute to pathogen evolution. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 277–284, 2013.
- SUN, Y. et al. The gut microbiota heterogeneity and assembly changes associated with the IBD. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2019.
- TAJIK, N. et al. Targeting zonulin and intestinal epithelial barrier function to prevent onset of arthritis. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2020.
- TESTONI, V. D. R., NUNES, C. R., REZENDE, B. C. E. D., MAROT, R. P., RIBEIRO, T. C. C., & AMARAL, W. N. D. Prevalência de esteatose hepática diagnosticada ao ultrassom, 2015.
- TREISMAN, G. J. The Role of the Brain–Gut–Microbiome in Mental Health and Mental Disorders. In: FLOCH, M.; RINGEL, Y.; WALKER, W. A. (Eds.). **The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology**. 1st. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. p. 389–397.
- XU, X. M.; ZHANG, H. J. **MiRNAs as new molecular insights into inflammatory bowel disease: Crucial regulators in autoimmunity and inflammation** **World Journal of Gastroenterology**, 2016.
- WADA, N. et al. Serum-inducible protein (IP)-10 is a disease progression-related marker for non-alcoholic fatty liver disease. **Hepatology International**, v. 11, n. 1, p. 115–124, 2017.
- WALSH, A. J. et al. Comparing disease activity indices in ulcerative colitis. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 8, n. 4, p. 318–325, 2014.
- WANG, B. et al. Altered fecal microbiota correlates with liver biochemistry in nonobese patients with non-alcoholic fatty liver disease. **Scientific Reports**, v. 6, n. February, p. 1–11, 2016.
- WANG, L.; WAN, Y. J. Y. The role of gut microbiota in liver disease development and treatment. **Liver Research**, v. 3, n. 1, p. 3–18, 2019.
- WANG, X. et al. The association of zonulin-related proteins with prevalent and incident inflammatory bowel disease. **BMC Gastroenterology**, v. 22, n. 1, p. 1–8, 2022.
- WENG, Y. J. et al. Correlation of diet, microbiota and metabolite networks in inflammatory bowel

- disease. **Journal of Digestive Diseases**, v. 20, n. 9, p. 447–459, 2019.
- WINTER, S. E.; BÄUMLER, A. J. Dysbiosis in the inflamed intestine: Chance favors the prepared microbe. **Gut Microbes**, v. 5, n. 1, p. 71–73, 2014.
- WOOD HEICKMAN, L. K.; DEBOER, M. D.; FASANO, A. Zonulin as a potential putative biomarker of risk for shared type 1 diabetes and celiac disease autoimmunity. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 36, n. 5, p. 1–27, 2020.
- WU, J.; LI, Q.; FU, X. Fusobacterium nucleatum Contributes to the Carcinogenesis of Colorectal Cancer by Inducing Inflammation and Suppressing Host Immunity. **Translational Oncology**, v. 12, n. 6, p. 846–851, 2019.
- YOSHIOKA, Y. et al. Nonalcoholic steatohepatitis: Cirrhosis, hepatocellular carcinoma, and burnt-out NASH. **Journal of Gastroenterology**, v. 39, n. 12, p. 1215–1218, 2004.
- ZENGIL, S.; LALOĞLU, E. Evaluation of Serum Zonulin and Occludin Levels in Bipolar Disorder. **Psychiatry Investigation**, v. 20, n. 4, p. 382–389, 2023.
- ZHAI, Q. et al. A next generation probiotic, Akkermansia muciniphila. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 19, p. 3227–3236, 2019a.
- ZHAI, R. et al. Strain-specific anti-inflammatory properties of two Akkermansia muciniphila strains on chronic colitis in mice. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. JUL, p. 1–12, 2019b.
- ZHANG, T. et al. Akkermansia muciniphila is a promising probiotic. **Microbial Biotechnology**, v. 12, n. 6, p. 1109–1125, 2019.
- ZHANG, Y. et al. Identification and study of differentially expressed miRNAs in aged NAFLD rats based on high-throughput sequencing. **Annals of Hepatology**, v. 19, n. 3, p. 302–312, 2020.
- ZHOU, Y. et al. Gut Microbiota Offers Universal Biomarkers across Ethnicity in Inflammatory Bowel Disease Diagnosis and Infliximab Response Prediction. **mSystems**, v. 3, n. 1, p. 1–14, 2018.
- ZHU, L. et al. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: A connection between endogenous alcohol and NASH. **Hepatology**, v. 57, n. 2, p. 601–609, 2013.
- ZHU, M. et al. MicroRNA-139-5p regulates chronic inflammation by suppressing nuclear factor-κB activity to inhibit cell proliferation and invasion in colorectal cancer. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 18, n. 5, 20 set. 2019.

Dificuldades durante a realização do projeto

- Muitos pacientes são de outras cidades e possuem dificuldades para se deslocar para a realização dos exames. Desta maneira, a fim de se manter a adesão ao estudo, no dia da realização da avaliação clínica é também feito o agendamento da ultrassonografia hepática, escolhida pelo paciente de acordo com sua disponibilidade.

- Muitos faltaram na realização do US hepático (30 pacientes). Os pacientes alegam dificuldades para se deslocarem para Botucatu para a realização do exame de US hepático.
- Tempo de coleta do material (fezes) foi um fator limitante para a finalização das análises do perfil de microbiota de acordo com o tempo que foi necessário entre selecionar os pacientes e realizar os exames de ultrassonografia hepática, e o tempo de vigência da bolsa. Todas as amostras foram coletadas, mas as análises só irão ser iniciadas no segundo semestre.
- Na etapa da avaliação de disbiose já adquirimos o kit no entanto não houve tempo hábil para finalizarmos essa etapa de acordo com a vigência da bolsa, a análise está programada para ser realizada no próximo mês.
- Durante o período de vigência da bolsa (12 meses) devido a dificuldade de recrutar todos os pacientes, e em substituir os pacientes que faltaram no dia da ultrassonografia hepática para mantermos o número de pacientes incluídos no estudo, o período de 12 meses foi insuficiente para conseguirmos concluir todas as análises propostas, mas até o final do próximo semestre pretendemos concluir todas as análises que ainda encontram-se pendentes.

6) ORIENTAÇÕES:

Coorientações concluídas:

Mestrado

- Natália Salvador Castelhana. Bolsa Capes (2022-2024). Projeto: Avaliação nutricional dos pacientes com doença inflamatória intestinal e doença hepática gordurosa não alcoólica. Data da defesa: 19/12/2024

Doutorado

- Jessica Nunes Pereira. Bolsa Capes (2021-2025). Projeto: MicroRNAs como preditores de resposta clínica e endoscópica em pacientes com Doença Inflamatória Intestinal tratados com terapia anti-TNF. Data da defesa: 29/07/2025
- Thais Gagno Grillo, não bolsista. Projeto: Avaliação de MicroRNAs como ferramenta diagnóstica na Doença Inflamatória Intestinal. Data da defesa: 18/12/2024
- Francielen Furieri Rigo, não bolsista. Projeto: Expressão de microRNAs em Biópsia de Pacientes com Doença Celíaca. Data da defesa: 18/12/2024
- Rodrigo Fedatto Beraldo, não Bolsista. Projeto: Avaliação da Doença gordurosa não alcoólica (DHGNA) e esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) nos pacientes com Doença Inflamatória Intestinal. Data da defesa: 06/12/2024

Coorientação em andamento:

Doutorado

- Lucy Junka Yamamoto. Não bolsista. Projeto: Manometria anorretal na doença de Crohn perianal.

7) DISCIPLINAS MINISTRADAS COM A RESPECTIVA CARGA HORÁRIA, PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSOS/PROJETOS E PUBLICAÇÕES:

7.1) Disciplina ministrada

Programa de Pós-Graduação em: Fisiopatologia em Clínica Médica

Nome da disciplina: Ação dos alimentos, da flora bacteriana e da absorção intestinal como reguladores inflamatórios em doenças crônicas.

Docentes responsáveis: Prof. Dr. Fernando Gomes Romeiro e Prof. Dr. Ligia Yukie Sasaki

Docente colaborador: Dr. Ellen Cristina Souza de Oliveira

Semestre: Segundo semestre de 2024

Carga Horária: 03 créditos, 45 horas (Teórica: 40 horas e Teórica/Prática: 5 horas)

Nível: Mestrado e Doutorado

Local: Departamento de Clínica Médica

Conteúdo programático: A disciplina abordará a interação entre fatores internos e externos dos portadores de doenças crônicas como moduladores do processo inflamatório. Entre esses fatores, os principais a serem abordados serão a capacidade absorptiva da mucosa intestinal, a flora bacteriana dos órgãos digestivos e os alimentos ingeridos. Será abordado o papel desses fatores como possíveis fontes de inflamação em doenças como o diabetes, a insuficiência cardíaca congestiva, a cirrose hepática e as doenças inflamatórias intestinais, analisando possíveis efeitos de moduladores que possam aumentar ou reduzir a inflamação crônica.

Ementa: O curso será desenvolvido da seguinte forma:

1) Aulas teóricas e práticas com discussão de casos clínicos:

1.1- Ação da flora intestinal e dos alimentos na resistência insulínica e na obesidade;

1.2- Ação do edema gastrointestinal na insuficiência cardíaca congestiva;

1.3- Ação do edema gastrointestinal na insuficiência hepática crônica;

1.4- Ação da flora intestinal e dos alimentos nas doenças inflamatórias intestinais.

2) Estudo dirigido:

2.1) Leitura e análise crítica de artigos publicados sobre os tópicos abordados nas aulas teóricas e nos casos clínicos apresentados para discussão.

Objetivo: A disciplina visa mostrar aos alunos da pós-graduação os principais efeitos sobre a modulação de processos inflamatórios crônicos através de agentes como os alimentos, a absorção gastrointestinal, a flora bacteriana e o tratamento da retenção hídrica quando presente.

Avaliação: Será avaliado o desempenho dos alunos durante as atividades teóricas e práticas, mostrando conhecimentos específicos sobre a fisiopatologia do processo inflamatório em doenças crônicas.

CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO DA APRENDIZAGEM

Serão consideradas para avaliação final a entrega das análises críticas dos artigos científicos realizadas durante o estudo dirigido e a participação dos alunos durante as aulas teóricas.

Bibliografia:

- The intestinal microbiota and chronic disorders of the gut. Andrew W. DuPont and Herbert L. DuPont. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 8, 523-531 (2011)
<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrgastro.2011.133>
- Gut Microbiota Is a Key Modulator of Insulin Resistance in TLR 2 Knockout Mice. Andrea M. Caricilli¹, Paty K. Picardi¹, Lelia L. de Abreu, Mirian Ueno¹, Patricia O. Prada, Eduardo R. Ropelle, Sandro Massao Hirabara, Angela Castoldi, Pedro Vieira, Niels O. S. Camara, Rui Curi, Jose B. Carnevali, Mario J. A. Saad. PLoS Biol 9(12): e1001212. doi:10.1371/journal.pbio.1001212
- Mucosa-associated but not luminal Escherichia coli is augmented in Crohn's disease and ulcerative colitis. Helton Luis de Souza, Vanessa R de Carvalho, Fernando Gomes Romeiro, Ligia Yukie Sasaki, Rogeria Keller, Josias Rodrigues. Gut Pathogens 2012, 4:21 doi:10.1186/1757-4749-4-21
- Gastrointestinal changes associated to heart failure. Romeiro FG, Okoshi K, Zornoff LA, Okoshi MP. Arq Bras Cardiol. 2012 Mar;98(3):273- 7.

7.2) Participação em congresso:

- Participação 20th Congress of ECCO European Crohn's and Colitis Organisation 2025 de 19 a 22 de fevereiro de 2025, em Berlim (Alemanha) – Congresso Internacional (ANEXO 2).

7.2.1) Trabalhos aprovados e apresentados em congressos internacionais na forma de pôster:

- **E.C.S.D. Oliveira**, M.A. Lopes, R.F. Beraldo, N.S. Castelhana, J.P. Baima, G.S.P. Herrerias, A.E.V. Quaglio, L.C. Di Stasi, W.F. Barbosa, G.F. Silva, L.Y. Sasaki. EVALUATION OF LIVER FIBROSIS AND STEATOHEPATITIS ASSOCIATED WITH METABOLIC DYSFUNCTION (MASH) IN PATIENTS WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASE (IBD) AND STEATOTIC LIVER DISEASE ASSOCIATED WITH METABOLIC DYSFUNCTION (MASLD). Trabalho apresentado no 20th Congress of ECCO, que ocorreu de 19-22 de fevereiro, 2025 em Berlim, Alemanha, sob o número P0243.

- **E.C.S.D. Oliveira**, M.A. Lopes, R.F. Beraldo, N.S. Castelhana, J.P. Baima, G.S.P. Herrerias, A.E.V. Quaglio, L.C. Di Stasi, W.F. Barbosa, G.F. Silva, L.Y. Sassaki. FACTORS ASSOCIATED WITH STEATOTIC LIVER DISEASE ASSOCIATED WITH METABOLIC DYSFUNCTION (MASLD) IN PATIENTS WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASE (IBD). Trabalho apresentado no 20th Congress of ECCO, que ocorreu de 19-22 de fevereiro, 2025 em Berlim, Alemanha, sob o número P0383.
- N.S. Castelhana, **E.C.S.D. Oliveira**, M.A. Lopes, R.F. Beraldo, J.P. Baima, G.S.P. Herrerias, A.E.V. Quaglio, L.C. Di Stasi, W.F. Barbosa, G.F. Silva, L.Y. Sassaki. NUTRITIONAL FACTORS ASSOCIATED WITH THE PRESENCE OF NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE (NAFLD) IN PATIENTS WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASE (IBD). Trabalho apresentado no 20th Congress of ECCO, que ocorreu de 19-22 de fevereiro, 2025 em Berlim, Alemanha, sob o número P0427.

7.3) Participações em projetos:

- Participação no projeto de pesquisa: Comparação da microbiota intestinal de gestantes com doenças inflamatórias intestinais e gestantes saudáveis e descendentes. (Projeto em parceria com as Instituições da UNICAMP, PUC e UNESP), desde março de 2021 até a presente data.
- Participação no projeto de pesquisa: Avaliação da permeabilidade intestinal, disbiose e expressão de microRNAs de pacientes portadores de Doença Inflamatória Intestinal (DII) e associação com Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA). (Projeto Regular Fapesp - 2022/15527-3), desde setembro de 2023 até a presente data.

7.4) Publicações durante o período vigente da bolsa:

7.4.1) Editorial:

- Ana EV Quaglio, Daniéla O Magro, Marcello Imbrizi, **Ellen CS De Oliveira**, Luiz C Di Stasi, Ligia Y Sassaki. Creeping fat and gut microbiota in Crohn's disease. WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY. v.31, 102042, 2025. Disponível em: <https://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v31/i1/102042.htm>

7.4.2) Artigos:

- Furieri, Francielen R.; **De Oliveira, Ellen C.S.**; Quaglio, Ana Elisa V.; Moutinho, Bruna D.; Di Stasi, Luiz C.; Sassaki, Ligia Y. Expression of MicroRNAs in Adults with Celiac Disease: A Narrative Review. International Journal of Molecular Sciences, v. 25, 9412, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms25179412>
- Figueiredo, M.C.; F. V. Zanutto, F.V.; Sabri, A.; Cândido, T.Z.; Medina, L.S.; Sousa, I.M. O.; Basting, R.T.; Braga, L.E.O.; **De Oliveira, E.C.S.**; De Feiria, S.N.B.; Fonseca-Santos,

B.; Chorilli, M.; Murata, R.M.; Foglio, M.A. Development, Evaluation, and Characterization of a Novel Mucoadhesive Film Containing *Pterodon pubescens* Benth Ethanolic Extract for Dental Use. Journal of Applied Polymer Science, e57747, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/app.57747>.

7.4.3) Artigos aceitos para publicação:

- Lopes, M. A.; **Oliveira, E. C. S.**; Quaglio, A. E. V.; Santos, A.; Imbrizi, M.; Mendes, L. E. R.; Beraldo, R. F.; Baima, J. P.; Spiller, A. L.; Magro, D. O.; Sasaki, L.Y. From gut to liver: Exploring the relationship between inflammatory bowel disease and metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease. World Journal of Hepatology, 2025.
- Shintaku, Daniel N.; Lopes, Marina A.; Beraldo, Rodrigo, F.; **De Oliveira, Ellen C.S.**; Herreiras, Giedre S. P.; Oliveira, Ana Carolina B.; Baima, Julio P.; Barbosa, Walnei, F.; Silva, Giovanni, F; Sasaki, Ligia Y. Investigation of liver diseases using liver Doppler ultrasound in patients with inflammatory bowel diseases. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2025.

7.4.4) Capítulo de livro:

- **Oliveira, E. C. S.**; Quaglio, A. E. V.; Sasaki, L.Y. Microbioma intestinal, doença inflamatória e câncer colorretal. In: Joel Faintuch. (Org.). Microbioma, Disbiose, Probióticos e Bacterioterapia. 2ªed. Barueri - SP: Editora Manole LTDA, 2024, v., p. 209-220.

7.4.5) Trabalhos publicados em anais de congressos:

- N. Castelhana, M. Amorim Lopes, E. Zucari Nogueira, R. Fedatto Beraldo, **E. Oliveira**, G. Herrerias, D. Salate Biagioni Vulcano, J. Baima, W. Barbosa, L. Yukie Sasaki. EXPLORING THE RELATIONSHIP BETWEEN NUTRITIONAL STATUS AND NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASE: A CROSS-SECTIONAL ANALYSIS. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/ueg2.12615>.
- **E.C.S.D. Oliveira**, M.A. Lopes, R.F. Beraldo, N.S. Castelhana, J.P. Baima, G.S.P. Herrerias, A.E.V. Quaglio, L.C. Di Stasi, W.F. Barbosa, G.F. Silva, L.Y. Sasaki. EVALUATION OF LIVER FIBROSIS AND STEATOHEPATITIS ASSOCIATED WITH METABOLIC DYSFUNCTION (MASH) IN PATIENTS WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASE (IBD) AND STEATOTIC LIVER DISEASE ASSOCIATED WITH METABOLIC DYSFUNCTION (MASLD). Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjae190.0417>.

- **E.C.S.D. Oliveira**, M.A. Lopes, R.F. Beraldo, N.S. Castelhana, J.P. Baima, G.S.P. Herrerias, A.E.V. Quaglio, L.C. Di Stasi, W.F. Barbosa, G.F. Silva, L.Y. Sassaki. FACTORS ASSOCIATED WITH STEATOTIC LIVER DISEASE ASSOCIATED WITH METABOLIC DYSFUNCTION (MASLD) IN PATIENTS WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASE (IBD). Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjae190.0557>.
- N.S. Castelhana, **E.C.S.D. Oliveira**, M.A. Lopes, R.F. Beraldo, J.P. Baima, G.S.P. Herrerias, A.E.V. Quaglio, L.C. Di Stasi, W.F. Barbosa, G.F. Silva, L.Y. Sassaki. NUTRITIONAL FACTORS ASSOCIATED WITH THE PRESENCE OF NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE (NAFLD) IN PATIENTS WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASE (IBD). Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjae190.0601>.

8) COMENTÁRIOS DO SUPERVISOR

A pesquisadora cumpriu com todos os requisitos necessários para a finalização do projeto em questão. Desenvolveu o projeto e participou de outros projetos e publicações do grupo de pesquisa. A pesquisadora é competente, dedicada, interage com a equipe, atua de forma responsável, ética e profissional. Apresenta ótimo relacionamento com os outros membros da equipe. Atuou de forma ativa em todos os processos do projeto. Permanece trabalhando nas análises faltantes do projeto de pesquisa. Voto pela aprovação do relatório do projeto. Agradecemos a oportunidade de realização desse projeto de pesquisa. Obrigada.

ANEXOS

ANEXO 1 - Protocolo de avaliação clínica

Data da avaliação: ____/____/____

Nome: _____ RGHC: _____

Sexo: () masculino () feminino

Data de Nasc.: ____/____/____ Idade: ____ anos

Cidade: _____

Telefone: (____) _____ - _____

1. Informações sociodemográficas

Estado Civil

- () união estável
() solteiro
() viúvo
() separado/divorciado

Categoria na profissão:

- () ativo
() afastado
() aposentado
() sem profissão

Escolaridade

- () Fundamental - Incompleto
() Fundamental - Completo
() Médio - Incompleto
() Médio - Completo
() Superior - Incompleto
() Superior - Completo
() Pós-graduação Incompleto
() Pós-graduação Completo

Etnia

- () Branco
() Negro
() Amarelo
() Pardo
() Indígena

Renda familiar

- () menos de 1 salário-mínimo
() 1 a 2 salários-mínimos
() 2 a 3 salários-mínimos
() 3 ou + salários-mínimos

Etilismo

- () Sim. Dose:
() Não

Tabagismo

- () Sim. Anos-maço
() Não

Comorbidades

- () Diabetes

() Hipertensão

() Dislipidemia

() Hipotireoidismo

() Hipertireoidismo

() Doença autoimune.
Qual? _____

2. Informações clínicas:

Doença inflamatória intestinal:

- () Doença de Crohn
() Retocolite ulcerativa

Data do diagnóstico: _____

Cirurgia prévia para DII

- () Não
() Sim. Qual: _____ Data: _____

Tem ostomia?

- () Sim. Desde quando:
() Não

Medicações em uso para DII

	Uso prévio	Uso atual, Data início	Dose
Prednisona			
Budesonida			
Mesalazina Oral			
Mesalazina supositório			
Mesalazina enema			
Sulfassalazina			
Azatioprina			
Metotrexate			
Infliximabe			
Adalimumabe			
Certolizumabe			
Vedolizumabe			
Ustequinumabe			
Antibióticos. Quais			
Outros			

Classificação de Montreal para doença de Crohn

Idade no momento do diagnóstico

- () A1 $\leq$ 16 anos
 () A2 entre 17 e 40 anos
 () A3 $>$ 40 anos

Extensão da doença

- () L1 - Ileal
 () L2 - Colônica
 () L3 - Ileocólica
 () L4 - Doença TGI superior isolada
 (modificador que pode ser adicionado a L1-L3

quando houver, concomitantemente, doença envolvendo o TGI superior)

Comportamento da doença

- () B1 – Não estenosante, não penetrante
 () B2 – Estenosante
 () B3 – Penetrante

Doença Perianal

- () Sim
 () Não

Atividade Clínica doença de Crohn – Escore de Harvey & Bradshaw

Bem estar geral dos pacientes (no dia anterior)

- () Muito bem
 () Bom/Intermediário
 () Ruim
 () Muito ruim
 () Péssimo

Presença de massa abdominal

- () Nenhuma massa
 () Duvidosa
 () Presente
 () Presente e dolorosa

Dor abdominal (no dia anterior)

- () Nenhuma dor
 () Leve
 () Moderada
 () Grave

Complicações

- () Artralgia
 () Uveíte
 () Eritema Nodoso
 () Pioderma Gangrenoso
 () Úlcera aftóide oral
 () Fístula ou fissura anal
 () Nova fistula
 () Abscesso

Número de evacuações líquidas por dia:
/dia

Extensão da Retocolite Ulcerativa

() Colite distal	inflamação da mucosa até 30 cm da linha denteada
() Hemicolite esquerda	Inflamação da mucosa até a flexura esplênica (eventualmente, até o cólon transversal distal)
() Pancolite	Inflamação da mucosa estendendo-se além do cólon transversal proximal

Avaliação da atividade da Retocolite - Escore de Mayo

Número de evacuações: 0 – habitual do paciente 1 – 1 a 2 vezes além do habitual 2 – 3 a 4 vezes além do habitual 3 – 5 ou + vezes além do habitual	Pontos
Presença de sangramento retal: 0 – sem sangue visível 1 – estrias nas fezes em menos de metade das evacuações 2 – sangue vivo nas fezes na maioria das evacuações 3 – evacuação apenas com sangue	
Achados endoscópicos: 0 – normal ou doença inativa 1 – leve: eritema, diminuição do padrão vascular, discreta friabilidade 2 – moderada: eritema intenso, perda padrão vascular, friabilidade, erosões 3 – grave: sangramento espontâneo, ulceração	
Avaliação global: desconforto abdominal, bem-estar, PPS, exame físico 0 – normal 1 – doença discreta 2 – doença moderada 3 – doença grave	
TOTAL de Pontos	

Avaliação Nutricional

Peso habitual:

Peso atual:

Estatura:

IMC:

Circunferências:

- CB

- CC

- CQ

- PCT

- CP

- CMB

- AMB

- EMAP

Dinamometria:

Bioimpedância:

USG hepático

() ausência de esteatose hepática

() presença de esteatose hepática.

Grau: _____



CERTIFICATE OF ATTENDANCE

This is to certify that

Ellen Cristina Souza De Oliveira

attended the

20th Congress of ECCO
European Crohn's and Colitis Organisation
Inflammatory Bowel Diseases 2025

Berlin, Germany
February 19-22, 2025

Britta Siegmund
ECCO President



Fernando Magro
President-Elect of ECCO

