

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL E SUAS ALTERAÇÕES EM  
PACIENTES ADULTOS DE TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO  
HEMATOPOIÉTICAS ALOGÊNICO DE UM HOSPITAL DO SUL DO BRASIL**

JÉSSICA HÄRTER

Porto Alegre

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL E SUAS ALTERAÇÕES EM  
PACIENTES ADULTOS DE TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO  
HEMATOPOIÉTICAS ALOGÊNICO DE UM HOSPITAL DO SUL DO BRASIL**

JÉSSICA HÄRTER

Orientador: Profa. Dra. Lucia Silla

Tese apresentada como requisito parcial para  
obtenção do título de Doutor em Medicina:  
Ciências Médicas, da Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação  
em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2024

### CIP - Catalogação na Publicação

Härter, Jéssica

Avaliação da microbiota intestinal e suas alterações em pacientes adultos de transplante de células tronco hematopoiéticas alogênico de um hospital do sul do Brasil / Jéssica Härter. -- 2024. 75 f.

Orientadora: Lucia Mariano da Rocha Silla.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. transplante de células tronco hematopoiéticas. 2. microbiota intestinal. 3. microbiota. 4. infecções. 5. doença do enxerto contra hospedeiro. I. Silla, Lucia Mariano da Rocha, orient. II. Título.

Trabalho apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Ciências Médicas.

Aprovado em: 1 de julho de 2024.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Leo Sekine

PPGCM-UFRGS

---

Prof. Dr. Odirlei André Monticielo

PPGCM-UFRGS

---

Profa. Dra. Liane Esteves Daudt

PPGSCA-UFRGS

---

Profa. Dra. Cláudia Cáceres Astigarraga

FAMED, UFRGS

---

Profa. Dra. Lucia Mariano da Rocha Silla (orientadora)

PPGCM-UFRGS

## **Agradecimentos**

À minha orientadora, Profa. Dra. Lúcia Silla, que aceitou entrar nessa jornada comigo e que, a cada etapa, me inspirou com seu conhecimento e entusiasmo com o universo da pesquisa. Não tenho palavras para agradecer pelo incentivo e apoio ao longo desses anos.

À Ana Maria Keller Jochims, que sempre acreditou em mim e me passou toda a segurança para fazer o doutorado. Aos dedicados Enfermeiros da Unidade de Ambiente Protegido do HCPA que tornaram possível a realização logística desse trabalho: Ozir Ubirajara Macedo Pereira, Leticia Silva Ribeiro, Maryana Schwartzaupt de Matos, Gabrielli Mottes Orlandini, Patrícia Garcia Guilardi, Fabiane de Avila Marek, vocês foram essenciais nesse processo.

Ao pessoal da Unidade de Pesquisa Laboratorial do HCPA, em especial à Marina Siebert, que me prestou auxílio em diversos momentos. Ao Pabulo Henrique Rampelotto, que foi atencioso e disposto para atender às demandas da pesquisa sempre que solicitado.

Ao FIPE/HCPA e à CAPES pelo auxílio financeiro para realização deste estudo. Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade de realizar o doutorado, aos professores pelo conhecimento compartilhado e aos funcionários do programa que auxiliaram de forma sempre prestativa nas inúmeras vezes em que os acionei.

Ao Ricardo Pretto Reolom, que foi meu incansável incentivador. Obrigada por compartilhar comigo de forma tão intensa, paciente e amorosa o desenvolvimento deste projeto. À minha família e amigos, pelo companheirismo, preocupação e apoio contínuo. Agradeço, especialmente, a todos os participantes deste estudo que contribuíram para o desenvolvimento deste projeto doando seu tempo em prol da ciência. Muito obrigada!

## RESUMO

O transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) é um procedimento complexo utilizado para tratar diversas doenças hematológicas malignas ou benignas. Requer um condicionamento com quimioterapia acompanhada ou não de radioterapia e, frequentemente, uso de antibióticos. Pode resultar em toxicidade, infecções e doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH). Diversos estudos demonstram que há uma diminuição na diversidade da microbiota intestinal associada a desfechos negativos nesse contexto. Entretanto, existem poucos dados acerca da população brasileira. Portanto, o objetivo desse trabalho foi caracterizar a microbiota intestinal antes e depois do TCTH alogênico em uma amostra de pacientes adultos de um hospital público no sul do Brasil, e relaciona-la com desfechos pós-transplante como infecção, DECH e mortalidade. O projeto teve a aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CAAE 54679321.7.0000.5327). Participaram do estudo 15 pacientes (8 homens e 7 mulheres), submetidos ao TCTH alogênico pela primeira vez, que produziram 21 amostras de fezes viáveis para análise. A avaliação da microbiota intestinal foi realizada a partir de amostras fecais coletadas antes do condicionamento e após a enxertia, das quais extraiu-se o DNA. A partir disto, a região V4 do gene 16S rRNA foi amplificada seguida de sequenciamento no equipamento Ion S5™. Os resultados deste trabalho estão apresentados na forma de artigo de acordo com o regimento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. De maneira geral, os resultados das análises da diversidade alfa e beta demonstraram diferenças significativas entre as amostras pré e pós-transplante. Confirmou-se que há um desequilíbrio na composição da microbiota intestinal após o TCTH com a redução de bactérias importantes para a saúde e aumento de bactérias potencialmente patogênicas. Além disso, foi encontrada associação da microbiota intestinal com DECH aguda.

**Palavras-chave:** transplante de células tronco hematopoiéticas; microbiota intestinal; microbiota; infecções; doença enxerto contra hospedeiro.

## ABSTRACT

Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is a complex procedure used to treat several malignant or benign hematological diseases and requires conditioning with high-dose chemotherapy, accompanied or not by radiotherapy and use of antibiotics. It can result in toxicity, infections, and graft-versus-host disease (GVHD). Several studies demonstrate that there is a decrease in the diversity of the intestinal microbiota associated to negative outcomes in this context. However, there is little data on this in the Brazilian population. Therefore, the objective of this work was to characterize the intestinal microbiota before and after allogeneic HSCT in a sample of adult patients from a public hospital in southern Brazil and relate it to post-transplant outcomes such as infection, GVHD and mortality. The project was approved by the Research Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CAAE 54679321.7.0000.5327). The study included 15 patients (8 men and 7 women), undergoing allogeneic HSCT for the first time, who produced 21 viable stool samples for analysis. The evaluation of the intestinal microbiota was carried out using fecal samples collected in preconditioning period and after grafting, from which DNA was extracted. From this, the V4 region of the 16S rRNA gene was amplified followed by sequencing on the Ion S5™ equipment. The results of this work are presented in the form of an article in accordance with the regulations of the Post-Graduate Program in Medical Sciences at Universidade Federal do Rio Grande do Sul. In general, the results of alpha and beta diversity analyze demonstrated significant differences between pre- and post-transplant samples. It was confirmed that there is an imbalance in the composition of the intestinal microbiota after HSCT with a reduction in bacteria important for health and an increase in potentially pathogenic bacteria. Furthermore, an association between intestinal microbiota and acute GVHD was found.

**Key Words:** hematopoietic stem cell transplantation; gut microbiota; microbiota; infections; graft versus host disease.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estratégia de seleção dos artigos para inclusão na revisão.....	<b>16</b>
<b>Figura 2.</b> Marco conceitual da relação das alterações da microbiota intestinal com desfechos negativos após o TCTH .....	<b>28</b>

## LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

<b>Figure 1.</b> The microbiota composition differed significantly between before (A) and after (B) HSCT as analyzed by Beta-diversity index. PERMANOVA was used for statistical analysis.....	<b>60</b>
<b>Figure 2.</b> Alpha diversity analysis according to different metrics. Observed (A), Shannon (B), ACE (C). Statistical significance was accessed using T-test, considering $p < 0.05$ ..	<b>61</b>
<b>Figure 3.</b> Differentially abundant taxa at the genus level by LefSe. Taxa were ranked by LDA score. Differences were considered significant with a LDA score threshold of $\pm 2.0$ and $p < 0.05$ .....	<b>62</b>
<b>Figure 4.</b> Metabolic pathways. Differentially abundant pathways were determined using LefSe. Differences were considered significant for a logarithmic LDA score threshold of $\pm 4.0$ and a $p < 0.05$ .....	<b>62</b>
<b>Figure S1.</b> Intestinal microbiota relative abundance by phylum.....	<b>66</b>
<b>Figure S2.</b> Intestinal microbiota relative abundance by genus.....	<b>67</b>
<b>Figure S3.</b> Intestinal microbiota relative abundance by family.....	<b>68</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Estratégia de busca utilizada na base de dados PubMed.....	<b>15</b>
---	-----------

## LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

<b>Table 1.</b> Characteristics of the enrolled patients (n=15).....	<b>63</b>
--	-----------

<b>Table 2.</b> Description of the presence of acute or chronic GVHD and death in the sample of allo-HSCT patients (n=14).....	<b>64</b>
--	-----------

<b>Table S1.</b> Description of antibiotics and days of utilization by allo-HSCT patients after collecting the first stool sample and before the second stool sample (n=7).....	<b>65</b>
---	-----------

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AhR	Receptor aril-hidrocarboneto
ATG	Globulina Antitímocítica
DECH	Doença do enxerto contra o hospedeiro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GOS	Galactooligossacarídeos
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
IEC	Células epiteliais intestinais
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LPS	Lipopolissacarídeo
MAIT cells	<i>Innate-like mucosal-associated invariant T cells</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossomal
TCA	Ciclo do ácido tri carboxílico
TCTH	Transplante de células tronco hematopoiéticas
TGI	Trato gastrointestinal
Th17	Células T helper 17
Treg	Células T regulatórias

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações.....	15
2.2 Resultados da revisão.....	17
2.2.1 A microbiota no TCTH.....	17
2.2.2 Vias envolvidas nas alterações na microbiota intestinal e desfechos do TCTH	21
2.2.3 Nutrição, microbiota e TCTH.....	23
2.2.4 Relação com o uso de antibióticos.....	26
<b>3. MARCO CONCEITUAL.....</b>	<b>28</b>
<b>4. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>29</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
5.1 Objetivo primário.....	30
5.2 Objetivos secundários.....	30
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>31</b>
<b>7. ARTIGO: Characterization of intestinal microbiota before and after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in southern Brazilian patients and its relation with outcomes.....</b>	<b>41</b>
<b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>69</b>
<b>9 PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>70</b>
<b>APÊNDICE A. Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).....</b>	<b>71</b>
<b>ANEXO 1. STROBE Statement—checklist of items that should be included in reports of observational studies.....</b>	<b>73</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A microbiota intestinal pode ser entendida como um conjunto de microrganismos que povoa o trato gastrointestinal (TGI) humano, influenciando em processos locais e sistêmicos, como a transformação de nutrientes, o fornecimento de vitaminas, proteção contra patógenos, produção de metabólitos e a comunicação do eixo cérebro-intestino. (1-3) Executa funções essenciais para o organismo como barreira física, funcional e imunológica do TGI. (4)

O funcionamento adequado da microbiota intestinal é dependente do estado de equilíbrio da sua composição, um estado conhecido como eubiose, responsável por promover os efeitos benéficos à saúde recém citados. Em indivíduos saudáveis, essa composição é relativamente estável, sendo dominada por seis filos: Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes, Fusobacteria, Actinobacteria e Verrucomicrobia, com predominância das bactérias Gram-positivas Firmicutes seguida pelas Gram-negativas Bacteroidetes. (5,6)

Além da relação direta com os processos metabólicos do hospedeiro, a microbiota intestinal tem um papel importante na modulação da resposta imune e inflamatória. (7) Desta forma, quando há alteração no equilíbrio da microbiota, estado ao qual dá-se o nome de disbiose, há perda dos efeitos benéficos, além de haver uma correlação com diversos estados patológicos. (8) Nesse contexto, a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), cujo papel como mediadores imunes é muito relevante, fica prejudicada.

Desta forma, desde os avanços em estudos de sequenciamento baseados no gene 16S rRNA observou-se o quanto a disbiose pode interferir no processo saúde-doença em diversos contextos (9) podendo impactar inclusive nos desfechos do transplante de células

tronco hematopoiéticas (TCTH), um tratamento potencialmente curativo para diversas desordens hematológicas. (10)

Durante o complexo processo do TCTH, é realizada a etapa de condicionamento que consiste na aplicação de quimioterapia, acompanhada ou não de radioterapia, com o objetivo de imunossupressão e erradicação ou diminuição da doença. Posteriormente, é realizada infusão intravenosa de células progenitoras hematopoiéticas com o intuito de reestabelecer a função medular do paciente. (11,12) Esse tratamento pode resultar na ruptura da barreira intestinal e mudanças drásticas na microbiota intestinal (13), possivelmente agravadas pelo uso de antibióticos.

O desequilíbrio nos mecanismos regulatórios do epitélio intestinal torna a microbiota suscetível ao predomínio de espécies patogênicas, aumentando o risco de infecções, além de criar um ambiente favorável ao agravamento da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH), a partir da ativação de células T por lipopolissacarídeos (LPS) que passam pelo epitélio intestinal. (14)

Estudos clínicos têm demonstrado que as mudanças na diversidade da microbiota durante o TCTH alogênico estão associadas com o aumento da resposta imune pró-inflamatória e risco de complicações infecciosas, DECH e mortalidade. A DECH é uma das causas de morbimortalidade no pós-transplante alogênico e decorre de uma reação de alorreatividade dos linfócitos do enxerto (células doadas por doador aparentado ou não aparentado) contra os antígenos de histocompatibilidade do hospedeiro. (15)

Há alguns anos, Holler et al., demonstraram que no momento da admissão para o transplante os pacientes têm predominância de bactérias comensais, enquanto após o transplante há uma tendência ao aumento de bactérias do gênero *Enterococcus*, especialmente entre os pacientes que desenvolvem a DECH do TGI. (16) Este gênero é

considerado pró-inflamatório no TGI, visto que estimula a produção de fator de necrose tumoral por macrófagos e compromete a integridade do epitélio intestinal (17). Além disso, já foi associado a mortalidade global (18) e maior risco de infecções (17). A importância das infecções, para este estudo em particular, reside no fato de que, no Brasil, infecções são a maior causa de morte nos primeiros 100 dias pós transplante alogênico. (19)

A depleção de espécies de *Clostridiales* também já foi relacionada ao risco de DECH. (20). Por outro lado, o gênero *Blautia* parece ter efeito protetor estando associado a melhora da sobrevida global e menor incidência de DECH. (21) A espécie *Clostridium scindens* também parece ter um efeito positivo pois impediria o crescimento da espécie *Clostridium difficile*, sabidamente patogênica para esses pacientes. (17) O filo Bacteroidetes também é considerado de efeito protetor. (22,23)

Nesse contexto, a adequação das anormalidades quantitativas e/ou qualitativas da microbiota torna-se uma estratégia promissora para intervenção terapêutica, tanto através de abordagens com pre e probióticos como por meio da seleção de antibióticos. Entretanto, apesar de ser uma área em crescimento, os estudos ainda são recentes e pouco se encontra sobre a população brasileira nesse contexto, daí a necessidade de contribuir com esses estudos.

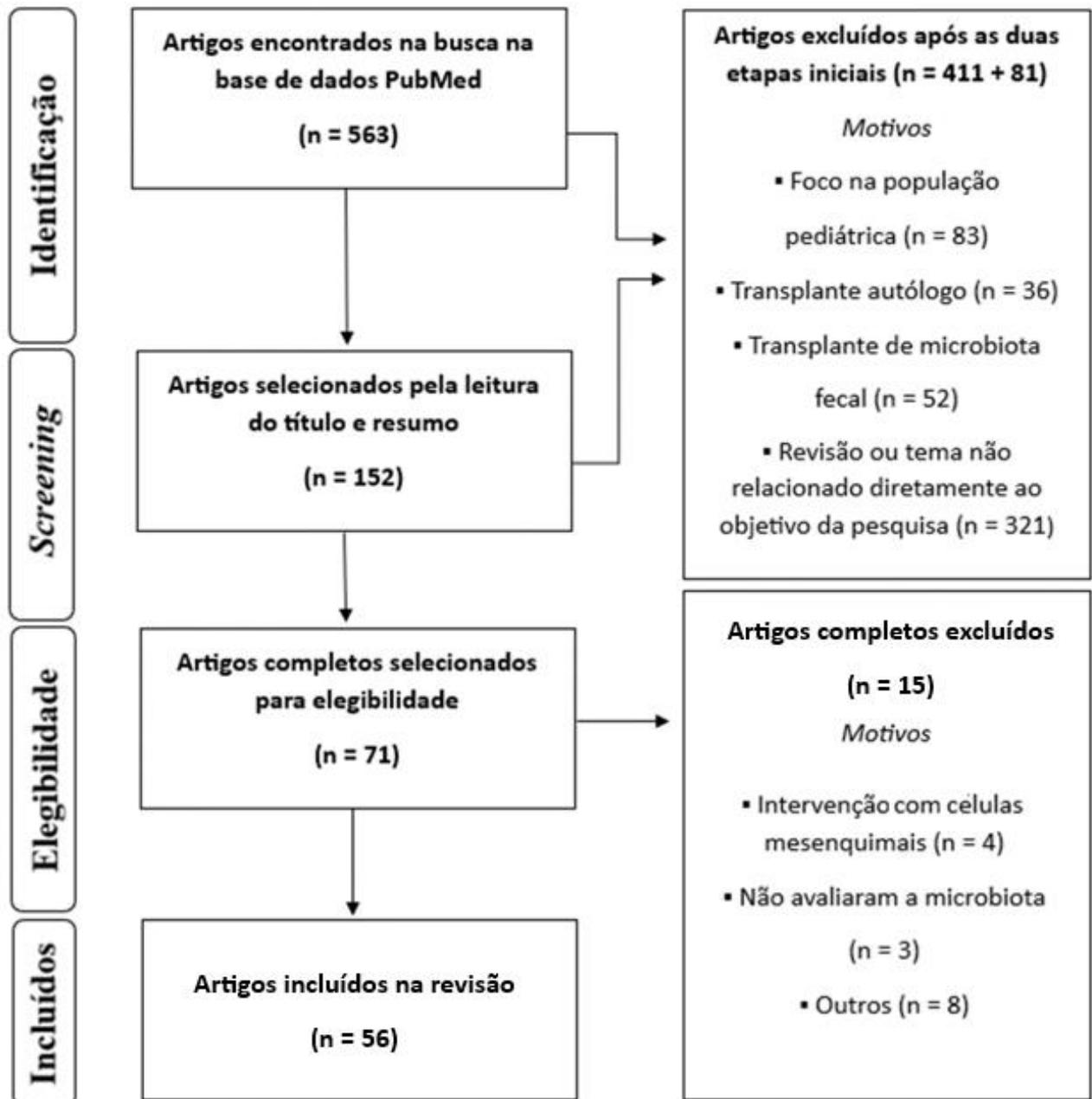
## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

A revisão foi realizada na base de dados PubMed conforme demonstrado na Tabela 1, buscando por trabalhos que avaliassem as alterações da microbiota intestinal no contexto do TCTH alogênico e sua relação com desfechos pós-transplante. Foram incluídos na pesquisa os trabalhos publicados nos últimos 5 anos, que estivessem disponíveis na íntegra e em língua inglesa, portuguesa ou espanhola. Não foram encontrados trabalhos relacionados ao foco dessa pesquisa nas bases de dados LILACS, SciELO e banco de teses da CAPES. A seleção dos artigos incluídos na revisão e motivos que levaram a exclusão dos demais em cada etapa estão descritas na Figura 1.

**Tabela 1.** Estratégia de busca utilizada na base de dados PubMed

Busca	Query	Resultados	
		Encontrados	Utilizados
#4	Search: #1 AND #2 Filters: Full text, in the last 5 years, English, Portuguese, Spanish	563	56
#3	Search: #1 AND #2	798	-
#2	Search: ((((((Stem Cell Transplantation) OR (Stem Cell Transplantations)) OR (Transplantations, Stem Cell)) OR (Transplantation, Stem Cell)) OR (Hematopoietic Stem Cell Transplantation)) OR (Stem Cell Transplantation, Hematopoietic)) OR (Transplantation, Hematopoietic Stem Cell)	161 841	-
#1	Search: (((((((((((((((Microbiota) OR (Microbiotas)) OR (Microbial Community)) OR (Community, Microbial)) OR (Microbial Communities)) OR (Microbial Community Composition)) OR (Community Composition, Microbial)) OR (Composition, Microbial Community)) OR (Microbial Community Compositions)) OR (Microbial Community Structure)) OR (Community Structure, Microbial)) OR (Microbial Community Structures)) OR (Microbiome)) OR (Microbiomes)) OR (Human Microbiome)) OR (Human Microbiomes)) OR (Microbiome, Human)	208 898	-



**Figura 1.** Estratégia de seleção dos artigos para inclusão na revisão

## 2.2 Resultados da revisão

### 2.2.1 A microbiota no TCTH

A microbiota intestinal do paciente que realiza o TCTH torna-se alvo de diversas perturbações que podem alterar sua composição e repercutir nos resultados do procedimento. Estudos demonstram que a redução na diversidade pós-TCTH tende a ser acompanhada pela aquisição de padrões com aumento de bactérias potencialmente patogênicas e redução da abundância de bactérias potencialmente benéficas como as bactérias produtoras de AGCC. (24-26) Em alguns casos, alterações já são observadas antes do transplante e podem estar relacionadas a desfechos negativos. (27,28).

Na literatura, encontramos estudos que relacionam as alterações da microbiota intestinal com bacteremia, recuperação celular (29,30), neutropenia febril (31,32), DECH crônica (33), fadiga (34), mortalidade e sobrevida. (35) Contudo, grande parte dos trabalhos demonstram, principalmente, a relação com o desenvolvimento da DECH aguda. (26, 36-42)

Entre os grupos de bactérias identificados em indivíduos que desenvolveram DECH, parecem estar em menor abundância os gêneros *Feacalibacterium*, *Akkermansia*, *Veillonella* e as famílias *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae*, enquanto pode haver um enriquecimento de bactérias multirresistentes pertencentes a *Escherichia*, *Shigella* e *Bacteroides*. (37,42). A redução da bactéria anti-inflamatória *Feacalibacterium prausnitzii* foi identificada em pacientes com DECH crônica. (41) A Dominância relativa de *Enterococcaceae* foi associada ao aumento do risco para DECH (28) e especificamente a DECH de TGI. A dominância relativa de *Staphylococcaceae* foi considerada preditora de DECH aguda com envolvimento hepático. Já a diminuição de *Lachnospiraceae* foi preditor de envolvimento intestinal. (43)

Nesse sentido, autores hipotetizaram que alguns padrões de disbiose poderiam estar correlacionados com DECH em locais específicos. Burgos da Silva et al. observaram que aqueles que estavam com DECH de TGI superior e inferior tiveram respectivamente 3,4 e 3,6 vezes menor abundância do gênero *Blautia*, enquanto o gênero *Anaerostipes* foi menos abundante entre aqueles que tiveram DECH de pele ou fígado (37,2 vezes), TGI superior (4,6 vezes) e TGI inferior (26,4 vezes) em relação aos que não tiveram DECH. (36). Interessante observar que *Blautia* já foi associada à melhora da saúde intestinal, parecendo, inclusive, proteger contra neutropenia febril. (44)

Outro estudo trouxe resultados que mostraram que nos 20 dias anteriores ao início da DECH, os pacientes tinham menor abundância de membros da classe *Clostridia*, menor contagem de produtores de butirato e menores proporções de bactérias anaeróbias estritas/facultativas em relação aos que não tiveram DECH. (36) Esse achado foi corroborado por outro estudo que mostrou que *Clostridium spp.* estava elevado em pacientes sem GVHD. (40) Nesse sentido, os clostrídios produtores de butirato foram identificados como possíveis protetores para o desenvolvimento de GVHD, o que se daria através do aumento da presença de células Treg no intestino. (45)

O propionato e o butirato parecem ser protetores para DECH crônica (46) ao passo que a redução da concentração fecal de AGCC foi relacionada a gravidade da DECH aguda do TGI, como demonstrado por um estudo no qual pacientes com DECH grave tiveram diminuição altamente expressiva dos níveis dos principais AGCC: acetato (75,8%), propionato (95,8%) e butirato (94,6%). Os pacientes com DECH aguda leve apresentaram níveis preservados de propionato, enquanto o butirato esteve significativamente diminuído em todos os graus de DECH aguda do TGI. (42). Esse achado é preocupante à medida que a recuperação de bactérias produtoras de butirato parece ocorrer lentamente e a disbiose pode persistir por pelo menos um ano após o

TCTH. (24) A supressão prolongada dessas bactérias ocorre, possivelmente, através de protocolos de descontaminação intestinal e uso de antibióticos de amplo espectro antes do D0, havendo uma associação conhecida com morte relacionada a DECH. (45)

Outro aspecto extremamente importante no TCTH é a recuperação imune, que pode impactar diretamente a sobrevida do paciente. Embora estudos não encontrem efeito significativo da microbiota na recuperação de monócitos (30) ou na doença refratária (40), a diversidade da microbiota foi relatada como preditora independente da contagem de células T CD4 nos 3 meses após o TCTH em receptores de aloenxertos com CD34. O aumento da abundância relativa fecal de *Staphylococcus* associou-se a pior contagem de células T CD4. (29) Pouco foi encontrado a esse respeito na literatura.

Porém, acerca de desfechos duros em si, estudos verificaram que uma alta diversidade da microbiota foi um preditor independente do aumento da sobrevida (35) e menor mortalidade (27), ao passo que a baixa diversidade no momento da enxertia esteve associada ao aumento de DECH intestinal e a morte relacionada ao transplante (38). Observa-se ainda, que além da relação com mortalidade por DECH (27), pacientes que apresentam baixa diversidade da microbiota tem maior chance de óbito por infecções (35). Este dado é de particular interesse a população brasileira, considerando a alta taxa de óbitos por infecção no TCTH nessa população. (19)

Segundo Peled et al., após realizar um estudo que avaliou 8767 amostras fecais, o risco de infecções da corrente sanguínea poderia ser previsto pela composição da microbiota antes do TCTH e o risco de morte relacionada ao transplante poderia ser previsto pelo momento da exposição à antibióticos e colonização por bactérias resistentes a antibióticos antes mesmo do transplante. (27)

Autores propõem que a dominação intestinal de bactérias Gram-negativas, como as dos gêneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas*, é altamente preditora de bacteremia. (24) Na mesma linha, um estudo de microbioma, relacionou a dominância de bactérias da família *Enterobacteriaceae* como altamente preditoras de bacteremia. (47)

Apesar de todos esses achados demonstrando o impacto do TCTH na microbiota, nem todos os pacientes vão apresentar alterações pronunciadas. Autores avaliaram diariamente a microbiota de pacientes do início do condicionamento até o D+30. Viu-se que alguns pacientes tiveram alterações drásticas na microbiota enquanto alguns conseguiram mantê-la relativamente estável. Em função do tamanho da amostra, não foi possível determinar a causa para essas diferenças, entretanto, viu-se que é possível manter a microbiota estável durante o TCTH apesar da quimio e/ou radioterapia e uso de antibióticos. Esse estudo também identificou que os pacientes com a microbiota mais preservada tiveram melhores resultados em relação aos que tiveram alterações maiores (24).

Além desses achados, existe ainda a identificação de vias metabólicas relacionadas a microrganismos alteradas no TCTH. Uma análise de correlação revelou que os metabólitos relacionados à tirosina foram inversamente relacionados com *Clostridium XIVa*. (39) Outras vias já identificadas como alteradas devido ao impacto do processo de transplante foram as do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), metabolismo de alanina, aspartato e glutamato, metabolismo do propanoato, butanoato, biossíntese de arginina, metabolismo do piruvato, biossíntese de esteroides e glicólise/gliconeogênese. (37) Assim, entende-se que não somente a diversidade e a composição da microbiota devem ser consideradas, mas também a sua funcionalidade potencial deve ser explorada. (48)

### 2.2.2 Vias envolvidas nas alterações na microbiota intestinal e desfechos do TCTH

Os mecanismos pelos quais a diversidade da microbiota intestinal interfere nos desfechos do TCTH ainda não são bem conhecidos. Vários estudos investigam as possíveis vias envolvidas nesse processo, no qual as células T parecem ter um importante papel. O que pode ser visto através do equilíbrio Treg/Th17, que junto com fatores inflamatórios, parece estar ligado ao desenvolvimento da DECH induzida pelo condicionamento, aliado às alterações na microbiota intestinal. (49,50)

Aqui cabe ressaltar que intensidade do condicionamento também é um fator crucial, pois dados apontam que há uma interação entre intensidade do condicionamento e o nível de dano a microbiota, com os condicionamentos mieloablativos causando maior dano. Isto pode ser observado inclusive pela consistência mais líquida das fezes, presentes nesse tipo de regime (51) e pela associação com maiores alterações taxonômicas e a nível metabólico funcional, quando comparados aos condicionamentos não mieloablativos. (52) Nesse sentido, um estudo sugeriu que o uso de Globulina Antitimocítica (ATG) em altas doses, parece reduzir o dano ao epitélio intestinal no contexto de condicionamentos mieloablativos. A quantidade de células T nos enxertos também parecem ser uma variável determinante para a disbiose intestinal. (35)

Um subtipo de células T também identificado como associado positivamente à diversidade da microbiota intestinal logo após o transplante alogênico, são as *innate-like mucosal-associated invariant T (MAIT) cells*. Maiores quantidades dessas células foram associadas à melhor sobrevivência e menor ocorrência de DECH aguda. O subconjunto V $\delta$ 2 de células T  $\gamma\delta$  correlacionado com as células MAIT no ambiente pós transplante parece ser dependente das características da microbiota intestinal. Para os autores do estudo que investigou essas células, a conservação da microbiota auxiliaria na manutenção e

recuperação de células T não convencionais, o que pode ser um dos mecanismos pelos quais a diversidade da microbiota influencia nos desfechos pós-transplante. (53)

Outro mecanismo que relaciona a microbiota com um desfecho potencialmente letal pós TCTH, que é o DECH de TGI, é via *major histocompatibility complex* (MHC). A microbiota parece exercer influência na expressão de MHC classe II nas células epiteliais intestinais (IEC) no íleo, cuja apresentação de antígeno leva a ativação de células T CD4+, iniciando o processo de DECH do TGI. Essa expressão estava ausente em animais *germ free* e a deleção específica da expressão de MHC classe II nas IEC preveniu o desenvolvimento da DECH. Assim, os autores deste estudo mostraram que a depleção da microbiota mediada por antibiótico inibiu a produção de IL-12/23p40 por macrófagos ileais, cuja neutralização impediu a *upregulation* de MHC classe II nas IEC impedindo o início da DECH do TGI. (54)

A respeito da DECH aguda, estudos mostram relação não somente com alterações dinâmicas na composição da microbiota intestinal e citocinas (55), mas que a resposta imune pode ser influenciada pelos ácidos biliares e pela diminuição da produção de ligantes receptor aril-hidrocarboneto (AhR) pela microbiota, o que poderia limitar a indução da indoleamina 2,3-dioxigenase e influenciar a reatividade das células T alogênicas. (56) Além disso, as células T no enxerto parecem exigir um receptor de butirato, o GPR109A, para induzir morbidade e mortalidade por DECH. (57)

Sobre citocinas, um estudo apontou que através do bloqueio da sinalização do receptor de interferon gama (IFNGR) seria possível modular a microbiota intestinal e reduzir a DECH. Descobriu-se que este bloqueio leva a *upregulation* de proteínas recombinantes S100A9 e que a superexpressão de S100A9 em células T do doador está associada a reconstituição da microbiota intestinal, tornando essa uma possível nova via de alvo terapêutico no TCTH relacionada a microbiota. (58)

### 2.2.3 Nutrição, microbiota e TCTH

Intervenções nutricionais como modificadoras da diversidade da microbiota intestinal, bem como promotoras de melhora na sobrevida e na redução do risco de DECH em receptores de TCTH alogênico ainda são um tema controverso na literatura. Embora o suporte nutricional quando introduzido precocemente pareça ser uma alternativa que contribui para a melhoria dos desfechos do transplante, não apenas pela nutrição *per se*, mas também pela possível relação com a manutenção da homeostase da microbiota intestinal, estudos não encontraram diferença na diversidade da microbiota quando comparada nutrição enteral e parenteral (59) ou intervenção com suporte de nutrição via sonda enteral. (60)

Quanto a dieta por via oral, sabe-se que transplante comumente é seguido por modificações importantes no comportamento alimentar dos receptores. Segundo o estudo de Michonneau et al, estas alterações, principalmente entre os indivíduos que mantêm alimentação apenas por via oral, parecem afetar de forma mais importante o metabolismo de xantinas ou metabólitos derivados de condimentos. Os autores também observaram que no início da DECH aguda, houve produção reduzida de metabólitos derivados do triptofano, especialmente ligantes do AhR, que é um fator de transcrição presente em várias células e em células inflamatórias infiltrantes envolvido na regulação de diversos processos biológicos incluindo a resposta imune. (56) Identificaram ainda, a produção reduzida de plasmalogênios juntamente com o aumento do nível de ácidos biliares e ácidos poli-insaturados. Essas vias podem estar envolvidas na resposta pró-inflamatória durante a DECH.

A disbiose, juntamente com a alteração do metabolismo no transplante, induz grandes mudanças na circulação de metabólitos que podem influenciar a reatividade do sistema imunológico. Assim, estudos em modelo animal vêm explorando diferentes

alternativas envolvendo microbiota intestinal e fatores dietéticos no TCTH. Um estudo testou diferentes dietas com tirosina durante o transplante e verificou que houve alteração da estrutura e da composição da microbiota intestinal, do fenótipo metabólico fecal e melhora da sobrevivência global e dos sintomas na fase inicial da DECH aguda. (39) Já um outro estudo com uma combinação de um composto com cinco ervas medicinais, conhecido como Xuebijing, dado em forma de injeção, acompanhado de uma dose reduzida de ciclosporina, verificou que houve proteção da microbiota intestinal de camundongos para DECH aguda com reversão da disbiose em nível de filo, gênero e espécie. Além disso, houve inibição da expansão de *Enterococcus* e de *Escherichia coli*. A análise patológica revelou que o tratamento combinado melhorou a integridade do tecido intestinal e reduziu a permeabilidade intestinal em animais com DECH. (61)

Em contrapartida aos efeitos positivos encontrados, efeitos negativos também foram verificados e reforçam a necessidade de cautela nos cuidados relacionados à nutrição no TCTH alogênico. No caso da suplementação leve de vitamina A, por exemplo, houve associação com aumento da DECH pulmonar e disbiose intestinal em modelo animal. (62)

Quanto ao uso de prebióticos, estudo com modelo animal, demonstrou que a administração oral de galactooligossacarídeos (GOS) poderiam atenuar a DECH aguda. (63) Já em humanos, a administração de amido resistente e uma mistura de prebióticos (glutamina, fibra e oligossacarídeos) foi iniciada desde o condicionamento pré-transplante até o D+28 e viu-se que houve redução de lesões na mucosa e incidência de todos graus de DECH aguda. É importante observar que nesse estudo houve manutenção da diversidade da microbiota intestinal e que a população de bactérias produtora de butirato foi preservada. (64)

Em relação ao uso de probióticos, acredita-se que a melhoria do desequilíbrio imunológico pelos probióticos teria potencial terapêutico para DECH. Em um experimento, viu-se que o uso concomitante de *L. acidophilus* ao Tacrolimus reduziu a inflamação e a gravidade da DECH em comparação com o Tacrolimus sozinho. Os autores deste estudo propuseram que o tratamento combinado de *L. acidophilus* com Tacrolimus poderia prevenir a progressão da DECH através da modulação de células T efetoras e células Treg. (65) A administração de *Bacteroides fragilis* através de gavagem oral aumentou a diversidade microbiota intestinal, bactérias comensais benéficas e melhorou significativamente sintomas agudos e desenvolvimento crônico de DECH em modelo animal. A preservação da integridade intestinal após uso de *B. fragilis* pareceu relacionada ao aumento de AGCC, IL-22 e células Treg. Esse estudo concluiu que uma única cepa de bactéria comensal pode ser um meio seguro e eficaz para proteger a integridade intestinal e melhorar a DECH após transplante alogênico. (66)

Além dos estudos com pré e probióticos, um estudo publicado em 2019 sugeriu uma nova estratégia terapêutica para redução da DECH: uma dieta sem lactose para atenuar o crescimento de patobiontes e possivelmente melhorar os resultados clínicos no TCTH alogênico. Os autores viram que a depleção de lactose *in vitro* e *in vivo* inibiu a expansão enterocócica e reduziu a DECH. Clinicamente, pacientes portadores de um alelo de má absorção de lactose apresentaram dominação de *Enterococcus* após exposição a antibióticos. Este mecanismo envolveria a perda de lactase em função dos danos causados aos enterócitos pelo condicionamento ou por células T alorreativas e a lactose remanescente favoreceria a expansão das bactérias mencionadas. (67) Assim, postula-se que a modulação da dieta com foco em determinados nutrientes, para redução de bactérias patogênicas, poderiam ser mais um alvo estratégico para ser explorado em novos estudos.

#### **2.2.4 Relação com o uso de antibióticos**

Estudos como o de Severyn et al. mostraram que a descontaminação intestinal com antibióticos como a vancomicina e polimixina B antes do TCTH tiveram um efeito protetor contra bacteremias por bactérias advindas do intestino. (68) Profilaxia com fluoroquinolona foi associado à diminuição de bacteremias e à colonização intestinal por microrganismos gram-negativos. (25) Contudo, a descontaminação intestinal é uma prática controversa para prevenção de DECH aguda e bacteremia.

A exposição aos antibióticos pode ser considerada uma das principais impulsionadoras das alterações da microbiota pós-transplante. (31, 69) Segundo Bansal et al. (2022), a alorreatividade, a intensidade do condicionamento ou a imunossupressão têm menos efeito na microbiota que o uso de antibióticos. (69)

Nesse sentido, diversos estudos vêm demonstrando a relação da microbiota alterada por antibióticos com desfechos negativos ou o uso racional para preservação da microbiota com melhora dos resultados. Daoud-Asfour et al., mostraram que a omissão da ciprofloxacina profilática preservou a microbiota sem aumentar a DECH do TGI e não foi associada a piores resultados clínicos (70). Em uma meta-análise, a profilaxia com antibióticos sistêmicos aumentou a DECH aguda e a diversidade da microbiota se relacionou com mortalidade relacionada ao transplante e sobrevida global (71). Ainda, o uso de antibióticos de amplo espectro durante o período de neutropenia esteve associado a uma maior incidência de DECH intestinal por meio da perda da diversidade do microbioma. (72)

A exposição a antibióticos se correlaciona ainda com a redução da abundância de linfócitos Treg no intestino. Há importância fisiopatológica dos clones de linfócitos T CD8 expandidos na progressão da DECH aguda e parece que o desenvolvimento de

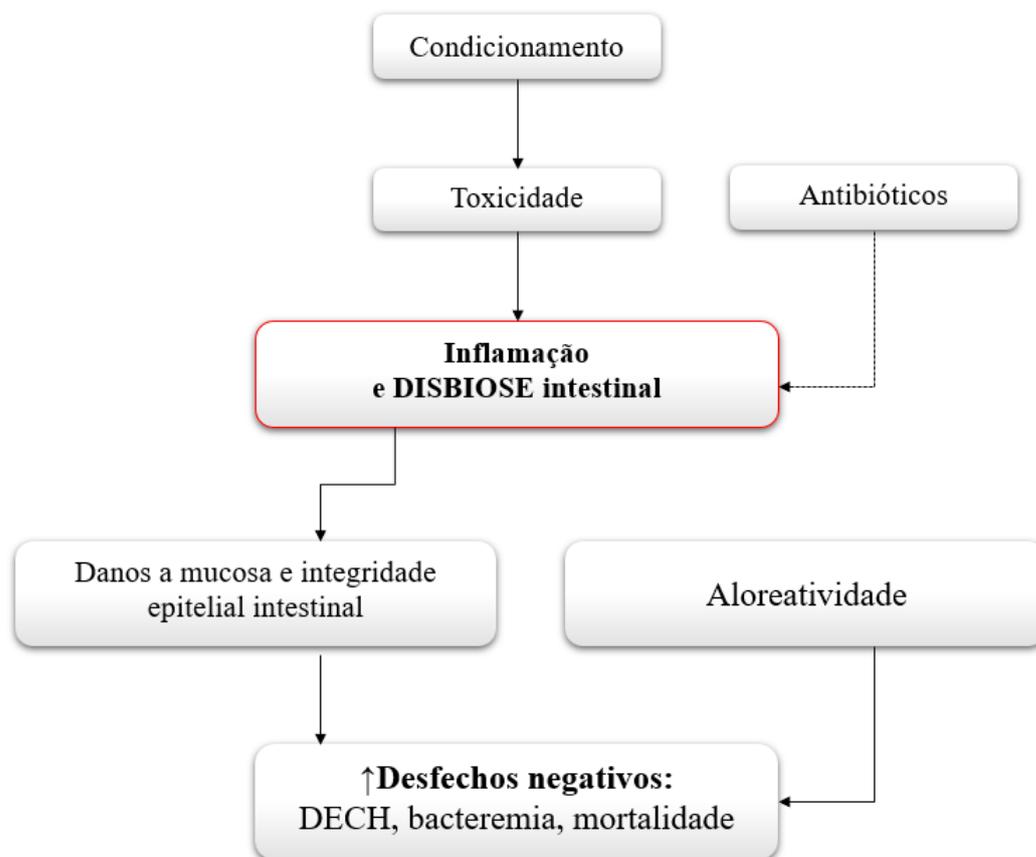
intervenções no microbioma para tratamento da DECH através do repovoamento do nicho Treg intestinal para suprimir a inflamação é uma alternativa promissora a ser estudada. (73) Um estudo em modelo animal de DECH crônica verificou que os animais tratados com gentamicina tinham menos células Th17 e mais Tregs nas glândulas lacrimais do que o grupo controle sem tratamento. (74)

Os beta-lactâmicos estão relacionados com redução da razão Treg/Th17 no D+15 e perda de *Lachnospiraceae*. Piperacilina-tazobactam, um antibiótico da classe dos beta-lactâmicos, parece causar declínios mais intensos entre os microrganismos anaeróbios obrigatórios. (75) Segundo Tanaka et al., o uso de piperacilina-tazobactam ou carbapenêmicos deve ser reservado somente para casos de neutropenia febril em que há suspeita de infecções anaeróbicas ou multirresistentes. (76)

Em comparação com outros tipos de antibióticos, a profilaxia com Rifaximina mono-antibiose foi capaz de preservar a microbiota intestinal e pareceu manter um efeito protetor na presença de antibióticos adicionais de amplo espectro. As febres de origem desconhecida ou complicações infecciosas não aumentaram no grupo Rifaximina em comparação com o grupo Ciprofloxacina/Metronidazol segundo um estudo retrospectivo com 161 pacientes. (77)

As maiores mudanças na composição da microbiota parecem ocorrer entre o momento da infusão de células-tronco e a reconstituição de células imunológicas saudáveis (75). Entretanto, é necessário ressaltar que o início dessas mudanças pode ser observado durante o condicionamento e pode ter relação com uso de antibióticos nesse período. Assim, a limitação do uso de antibióticos de amplo espectro, especialmente de forma profilática, deve ter como alvo também o período pré-transplante e não apenas o peri-transplante. (69)

### 3 MARCO CONCEITUAL



**Figura 2.** Marco conceitual da relação das alterações da microbiota intestinal com desfechos negativos após o TCTH (elaborado pelo autor).

#### **4 JUSTIFICATIVA**

O TCTH é um procedimento com uma elevada taxa de morbimortalidade relacionada principalmente à presença de infecções e DECH. Segundo a revisão da literatura, diversos estudos demonstram a importância da microbiota intestinal nesse contexto. Porém, relacionar microrganismos específicos com desfechos pós-transplante é algo complexo dada a heterogeneidade da composição da microbiota entre as populações e os indivíduos. Contudo, alguns marcadores já são conhecidos por suas associações com resultados importantes do TCTH, tanto os positivos quanto os negativos. Entretanto, existem poucos estudos descrevendo a microbiota intestinal e suas alterações em pacientes adultos de TCTH alogênico no Brasil. Desta forma, é importante contribuir com a caracterização da microbiota da população brasileira, neste caso na região Sul do país, antes do transplante e verificar quais alterações ocorrem após o procedimento e qual sua relação com desfechos pós transplante, atentando ao uso de antibióticos e focando, principalmente, nas infecções dada sua alta prevalência nessa população. Assim, a partir destes resultados, será possível planejar estudos maiores, visando estratégias de intervenção para adequação das anormalidades quantitativas e/ou qualitativas da microbiota de acordo com o impacto esperado nos resultados do TCTH.

## **5 OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo geral**

Caracterizar a microbiota intestinal antes e depois do TCTH alogênico em uma amostra de pacientes adultos de um hospital do sul do Brasil e relaciona-la com desfechos pós-transplante.

### **5.2 Objetivos específicos:**

Comparar a diversidade alfa e beta da microbiota intestinal nas amostras fecais do pré e pós-transplante.

Identificar os táxons diferencialmente abundantes nas amostras fecais do pré e pós-transplante.

Identificar diferenças nas vias metabólicas microbianas nas amostras fecais do pré e pós-transplante.

Correlacionar as alterações na microbiota intestinal com condicionamento e uso de antibióticos.

Testar a associação da microbiota intestinal com o infecção, DECH e mortalidade através de análise multivariada.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gentile CL, Weir TL. The gut microbiota at the intersection of diet and human health. *Science*. 2018;362(6416):776-780. doi:10.1126/science.aau5812
2. Glowacki RWP, Martens EC. In sickness and health: Effects of gut microbial metabolites on human physiology. *PLoS Pathog*. 2020;16(4):e1008370. Published 2020 Apr 9. doi:10.1371/journal.ppat.1008370
3. García-Montero C, Fraile-Martínez O, Gómez-Lahoz AM, et al. Nutritional Components in Western Diet Versus Mediterranean Diet at the Gut Microbiota-Immune System Interplay. Implications for Health and Disease. *Nutrients*. 2021;13(2):699. Published 2021 Feb 22. doi:10.3390/nu13020699
4. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature*. 2007;449(7164):804-810. doi:10.1038/nature06244
5. Bull MJ, Plummer NT. Part 1: The Human Gut Microbiome in Health and Disease. *Integr Med (Encinitas)*. 2014;13(6):17-22.
6. Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, et al. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*. 2019;7(1):14. Published 2019 Jan 10. doi:10.3390/microorganisms7010014.
7. Gonçalves, JL, Yaochite, JNU.; Queiroz, CAA, Câmara, CC, Oriá, RB. Bases do sistema imunológico associado à mucosa intestinal. In: Oriá, RB; Brito, GAC; org. Sistema Digestório Integração Básico-Clínica. Blucher 2016. 370-388.
8. Lee YK, Mazmanian SK. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system?. *Science*. 2010;330(6012):1768-1773. doi:10.1126/science.1195568
9. Gao B, Chi L, Zhu Y, et al. An Introduction to Next Generation Sequencing Bioinformatic Analysis in Gut Microbiome Studies. *Biomolecules*. 2021;11(4):530. Published 2021 Apr 2. doi:10.3390/biom11040530
10. Armitage JO. Bone marrow transplantation. *N Engl J Med*. 1994;330(12):827-838. doi:10.1056/NEJM199403243301206

11. Duncombe A. ABC of clinical haematology. Bone marrow and stem cell transplantation. *BMJ*. 1997;314(7088):1179-1182.  
doi:10.1136/bmj.314.7088.1179
12. Thomas, ED. A History of Bone Marrow Transplantation. In: Blume, K.G.; Forman, S.J.; Appelbaum, F.R., eds. *Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation*. 3rd ed. Malden: Blackwell Publishing 2004.
13. Montassier E, Gastinne T, Vangay P, et al. Chemotherapy-driven dysbiosis in the intestinal microbiome. *Aliment Pharmacol Ther*. 2015;42(5):515-528.  
doi:10.1111/apt.13302
14. Docampo MD, Auletta JJ, Jenq RR. Emerging Influence of the Intestinal Microbiota during Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: Control the Gut and the Body Will Follow. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(8):1360-1366. doi:10.1016/j.bbmt.2015.02.016
15. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Ministério da Saúde, Brasil. Tópicos em transplante de células-tronco hematopoéticas. INCA, 2012. Disponível em:  
<[bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/topicos\\_transplantes.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/topicos_transplantes.pdf)>
16. Holler E, Butzhammer P, Schmid K, et al. Metagenomic analysis of the stool microbiome in patients receiving allogeneic stem cell transplantation: loss of diversity is associated with use of systemic antibiotics and more pronounced in gastrointestinal graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20(5):640-645. doi:10.1016/j.bbmt.2014.01.030
17. Shono Y, van den Brink MRM. Gut microbiota injury in allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(5):283-295.  
doi:10.1038/nrc.2018.10
18. Taur Y, Jenq RR, Perales MA, et al. The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2014;124(7):1174-1182. doi:10.1182/blood-2014-02-554725

19. Simione AJ, Neves HRA das, Silva CC da, et al. Current use and outcomes of hematopoietic stem cell transplantation: The first Brazilian summary slides. *JBMTCT*. 2023;2(2):p99.
20. Staffas A, Burgos da Silva M, van den Brink MR. The intestinal microbiota in allogeneic hematopoietic cell transplant and graft-versus-host disease [published correction appears in *Blood*. 2017 Apr 13;129(15):2204]. *Blood*. 2017;129(8):927-933. doi:10.1182/blood-2016-09-691394
21. Jenq RR. How's your microbiota? Let's check your urine. *Blood*. 2015;126(14):1641-1642. doi:10.1182/blood-2015-08-661504
22. Biagi E, Zama D, Rampelli S, et al. Early gut microbiota signature of aGVHD in children given allogeneic hematopoietic cell transplantation for hematological disorders. *BMC Med Genomics*. 2019;12(1):49. Published 2019 Mar 7. doi:10.1186/s12920-019-0494-7
23. Doki N, Suyama M, Sasajima S, et al. Clinical impact of pre-transplant gut microbial diversity on outcomes of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Hematol*. 2017;96(9):1517-1523. doi:10.1007/s00277-017-3069-8
24. Kusakabe S, Fukushima K, Maeda T, et al. Pre- and post-serial metagenomic analysis of gut microbiota as a prognostic factor in patients undergoing haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2020;188(3):438-449. doi:10.1111/bjh.16205
25. Stoma I, Littmann ER, Peled JU, et al. Compositional Flux Within the Intestinal Microbiota and Risk for Bloodstream Infection With Gram-negative Bacteria. *Clin Infect Dis*. 2021;73(11):e4627-e4635. doi:10.1093/cid/ciaa068
26. Ilett EE, Jørgensen M, Noguera-Julian M, et al. Associations of the gut microbiome and clinical factors with acute GVHD in allogeneic HSCT recipients [published correction appears in *Blood Adv*. 2023 Jun 27;7(12):2677]. *Blood Adv*. 2020;4(22):5797-5809. doi:10.1182/bloodadvances.2020002677

27. Peled JU, Gomes ALC, Devlin SM, et al. Microbiota as Predictor of Mortality in Allogeneic Hematopoietic-Cell Transplantation. *N Engl J Med*. 2020;382(9):822-834. doi:10.1056/NEJMoa1900623
28. Li DS, Wu YR, Du WH, et al. The composition of the intestinal microbiota after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation and its association with graft versus host disease as assessed by 16S ribosomal ribonucleic acid. *J Physiol Pharmacol*. 2023;74(1):10.26402/jpp.2023.1.10. doi:10.26402/jpp.2023.1.10
29. Miltiadous O, Waters NR, Andrlová H, et al. Early intestinal microbial features are associated with CD4 T-cell recovery after allogeneic hematopoietic transplant. *Blood*. 2022;139(18):2758-2769. doi:10.1182/blood.2021014255
30. Morjaria S, Zhang AW, Kim S, et al. Monocyte Reconstitution and Gut Microbiota Composition after Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Clin Hematol Int*. 2020;2(4):156-164. Published 2020 Nov 23. doi:10.2991/chi.k.201108.002
31. Murthy HS, Gharaibeh RZ, Al-Mansour Z, et al. Baseline Gut Microbiota Composition Is Associated with Major Infections Early after Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2020;26(11):2001-2010. doi:10.1016/j.bbmt.2020.07.023
32. Schwabkey ZI, Wiesnoski DH, Chang CC, et al. Diet-derived metabolites and mucus link the gut microbiome to fever after cytotoxic cancer treatment. *Sci Transl Med*. 2022;14(671):eabo3445. doi:10.1126/scitranslmed.abo3445
33. Konishi T, Kusakabe S, Hino A, et al. Low diversity of gut microbiota in the early phase of post-bone marrow transplantation increases the risk of chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*. 2021;56(7):1728-1731. doi:10.1038/s41409-021-01249-2
34. Farhadfar N, Gharaibeh RZ, Dahl WJ, et al. Gut Microbiota Dysbiosis Associated with Persistent Fatigue in Hematopoietic Cell Transplantation Survivors. *Transplant Cell Ther*. 2021;27(6):498.e1-498.e8. doi:10.1016/j.jtct.2021.02.017

35. Gu Z, Xiong Q, Wang L, et al. The impact of intestinal microbiota in antithymocyte globulin-based myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Cancer*. 2022;128(7):1402-1410. doi:10.1002/cncr.34091
36. Burgos da Silva M, Ponce DM, Dai A, et al. Preservation of the fecal microbiome is associated with reduced severity of graft-versus-host disease [published correction appears in *Blood*. 2023 Mar 9;141(10):1234]. *Blood*. 2022;140(22):2385-2397. doi:10.1182/blood.2021015352
37. Kouidhi S, Souai N, Zidi O, et al. High Throughput Analysis Reveals Changes in Gut Microbiota and Specific Fecal Metabolomic Signature in Hematopoietic Stem Cell Transplant Patients. *Microorganisms*. 2021;9(9):1845. Published 2021 Aug 31. doi:10.3390/microorganisms9091845
38. Galloway-Peña JR, Peterson CB, Malik F, et al. Fecal Microbiome, Metabolites, and Stem Cell Transplant Outcomes: A Single-Center Pilot Study. *Open Forum Infect Dis*. 2019;6(5):ofz173. Published 2019 Apr 4. doi:10.1093/ofid/ofz173
39. Li X, Lin Y, Li X, et al. Tyrosine supplement ameliorates murine aGVHD by modulation of gut microbiome and metabolome. *EBioMedicine*. 2020;61:103048. doi:10.1016/j.ebiom.2020.103048
40. Zeng K, Brewster R, Kang JB, et al. Acute Steroid-Refractory Gastrointestinal Graft-Versus-Host Disease Is Not Associated With Significant Differences in Gut Taxonomic Composition Compared to Steroid-Sensitive Gastrointestinal Graft-Versus-Host Disease Immediately Before Onset of Disease. *Transplant Cell Ther*. 2024;30(2):237.e1-237.e9. doi:10.1016/j.jtct.2023.11.006
41. Farhadfar N, Gharaibeh RZ, Lyon D, et al. Microbiota phylogenetic analysis revealed decreased abundance of *Faecalibacterium prausnitzii*, an anti-inflammatory commensal bacterium, in patients with chronic graft-versus-host disease. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*. 2021;14(3):263-265. doi:10.1016/j.hemonc.2021.03.004
42. Payen M, Nicolis I, Robin M, et al. Functional and phylogenetic alterations in gut microbiome are linked to graft-versus-host disease severity. *Blood Adv*. 2020;4(9):1824-1832. doi:10.1182/bloodadvances.2020001531

43. Greco R, Nitti R, Mancini N, et al. Microbiome markers are early predictors of acute GVHD in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Blood*. 2021;137(11):1556-1559. doi:10.1182/blood.2020007158
44. Rashidi A, Peled JU, Ebadi M, et al. Protective Effect of Intestinal *Blautia* Against Neutropenic Fever in Allogeneic Transplant Recipients. *Clin Infect Dis*. 2022;75(11):1912-1920. doi:10.1093/cid/ciac299
45. Meedt E, Hiergeist A, Gessner A, et al. Prolonged Suppression of Butyrate-Producing Bacteria Is Associated With Acute Gastrointestinal Graft-vs-Host Disease and Transplantation-Related Mortality After Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Clin Infect Dis*. 2022;74(4):614-621. doi:10.1093/cid/ciab500
46. Markey KA, Schluter J, Gomes ALC, et al. The microbe-derived short-chain fatty acids butyrate and propionate are associated with protection from chronic GVHD. *Blood*. 2020;136(1):130-136. doi:10.1182/blood.2019003369
47. Yin G, Guo Y, Ding Q, et al. *Klebsiella quasipneumoniae* in intestine damages bile acid metabolism in hematopoietic stem cell transplantation patients with bloodstream infection. *J Transl Med*. 2023;21(1):230. Published 2023 Mar 29. doi:10.1186/s12967-023-04068-9
48. Rashidi A, Kaiser T, Holtan SG, Weisdorf DJ, Khoruts A, Staley C. Pre-transplant recovery of microbiome diversity without recovery of the original microbiome. *Bone Marrow Transplant*. 2019;54(7):1115-1117. doi:10.1038/s41409-018-0414-z
49. Han L, Zhao K, Li Y, et al. A gut microbiota score predicting acute graft-versus-host disease following myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Am J Transplant*. 2020;20(4):1014-1027. doi:10.1111/ajt.15654
50. Han L, Zhang H, Chen S, et al. Intestinal Microbiota Can Predict Acute Graft-versus-Host Disease Following Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019;25(10):1944-1955. doi:10.1016/j.bbmt.2019.07.006
51. Shouval R, Waters NR, Gomes ALC, et al. Conditioning Regimens are Associated with Distinct Patterns of Microbiota Injury in Allogeneic

- Hematopoietic Cell Transplantation. *Clin Cancer Res.* 2023;29(1):165-173.  
doi:10.1158/1078-0432.CCR-22-1254
52. Jørgensen M, Nørgaard JC, Ilett EE, et al. Metabolic Potential of the Gut Microbiome Is Significantly Impacted by Conditioning Regimen in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Recipients. *Int J Mol Sci.* 2022;23(19):11115. Published 2022 Sep 21. doi:10.3390/ijms231911115
53. Andrlová H, Miltiadous O, Kousa AI, et al. MAIT and V $\delta$ 2 unconventional T cells are supported by a diverse intestinal microbiome and correlate with favorable patient outcome after allogeneic HCT. *Sci Transl Med.* 2022;14(646):eabj2829. doi:10.1126/scitranslmed.abj2829
54. Koyama M, Mukhopadhyay P, Schuster IS, et al. MHC Class II Antigen Presentation by the Intestinal Epithelium Initiates Graft-versus-Host Disease and Is Influenced by the Microbiota. *Immunity.* 2019;51(5):885-898.e7.  
doi:10.1016/j.immuni.2019.08.011
55. Qi L, Peng J, Huang X, Zhou T, Tan G, Li F. Longitudinal dynamics of gut microbiota in the pathogenesis of acute graft-versus-host disease. *Cancer Med.* 2023;12(24):21567-21578. doi:10.1002/cam4.6557
56. Michonneau D, Latis E, Curis E, et al. Metabolomics analysis of human acute graft-versus-host disease reveals changes in host and microbiota-derived metabolites. *Nat Commun.* 2019;10(1):5695. Published 2019 Dec 13.  
doi:10.1038/s41467-019-13498-3
57. Docampo MD, da Silva MB, Lazrak A, et al. Alloreactive T cells deficient of the short-chain fatty acid receptor GPR109A induce less graft-versus-host disease. *Blood.* 2022;139(15):2392-2405. doi:10.1182/blood.2021010719
58. Kim S, Lim S, Razmkhah F, Choi J. Overexpression of S100A9 in donor T cells is associated with reconstitution of gut microbiota and outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood Res.* 2023;58(2):105-111.  
doi:10.5045/br.2023.2022238
59. Andersen S, Staudacher H, Weber N, et al. Pilot study investigating the effect of enteral and parenteral nutrition on the gastrointestinal microbiome post-

- allogeneic transplantation. *Br J Haematol.* 2020;188(4):570-581.  
doi:10.1111/bjh.16218
60. Skaarud KJ, Hov JR, Hansen SH, et al. Mortality and microbial diversity after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: secondary analysis of a randomized nutritional intervention trial. *Sci Rep.* 2021;11(1):11593. Published 2021 Jun 2. doi:10.1038/s41598-021-90976-z
61. Zhou Z, Shang T, Li X, et al. Protecting Intestinal Microenvironment Alleviates Acute Graft-Versus-Host Disease. *Front Physiol.* 2021;11:608279. Published 2021 Feb 12. doi:10.3389/fphys.2020.608279
62. Pan P, Atkinson SN, Taylor B, et al. Retinoic Acid Signaling Modulates Recipient Gut Barrier Integrity and Microbiota After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Mice. *Front Immunol.* 2021;12:749002. Published 2021 Oct 25. doi:10.3389/fimmu.2021.749002
63. Holmes ZC, Tang H, Liu C, et al. Prebiotic galactooligosaccharides interact with mouse gut microbiota to attenuate acute graft-versus-host disease. *Blood.* 2022;140(21):2300-2304. doi:10.1182/blood.2021015178
64. Yoshifuji K, Inamoto K, Kiridoshi Y, et al. Prebiotics protect against acute graft-versus-host disease and preserve the gut microbiota in stem cell transplantation. *Blood Adv.* 2020;4(19):4607-4617.  
doi:10.1182/bloodadvances.2020002604
65. Beak JA, Park MJ, Kim SY, et al. FK506 and *Lactobacillus acidophilus* ameliorate acute graft-versus-host disease by modulating the T helper 17/regulatory T-cell balance. *J Transl Med.* 2022;20(1):104. Published 2022 Feb 25. doi:10.1186/s12967-022-03303-z
66. Sofi MH, Wu Y, Ticer T, et al. A single strain of *Bacteroides fragilis* protects gut integrity and reduces GVHD. *JCI Insight.* 2021;6(3):e136841. Published 2021 Feb 8. doi:10.1172/jci.insight.136841
67. Stein-Thoeringer CK, Nichols KB, Lazrak A, et al. Lactose drives *Enterococcus* expansion to promote graft-versus-host disease. *Science.* 2019;366(6469):1143-1149. doi:10.1126/science.aax3760

68. Severyn CJ, Siranosian BA, Kong ST, et al. Microbiota dynamics in a randomized trial of gut decontamination during allogeneic hematopoietic cell transplantation. *JCI Insight*. 2022;7(7):e154344. Published 2022 Apr 8. doi:10.1172/jci.insight.154344
69. Bansal R, Park H, Taborda CC, et al. Antibiotic Exposure, Not Alloreactivity, Is the Major Driver of Microbiome Changes in Hematopoietic Cell Transplantation. *Transplant Cell Ther*. 2022;28(3):135-144. doi:10.1016/j.jtct.2021.12.015
70. Daoud-Asfour H, Henig I, Ghersin I, et al. Omitting Ciprofloxacin Prophylaxis in Patients Undergoing Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Its Impact on Clinical Outcomes and Microbiome Structure. *Transplant Cell Ther*. 2022;28(3):168.e1-168.e8. doi:10.1016/j.jtct.2021.12.012
71. Gavriilaki M, Sakellari I, Anagnostopoulos A, Gavriilaki E. The Impact of Antibiotic-Mediated Modification of the Intestinal Microbiome on Outcomes of Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: Systematic Review and Meta-Analysis. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2020;26(9):1738-1746. doi:10.1016/j.bbmt.2020.05.011
72. Lee SE, Lim JY, Ryu DB, et al. Alteration of the Intestinal Microbiota by Broad-Spectrum Antibiotic Use Correlates with the Occurrence of Intestinal Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019;25(10):1933-1943. doi:10.1016/j.bbmt.2019.06.001
73. Jarosch S, Köhler J, Ghimire S, et al. Multimodal immune cell phenotyping in GI biopsies reveals microbiome-related T cell modulations in human GVHD. *Cell Rep Med*. 2023;4(7):101125. doi:10.1016/j.xcrm.2023.101125
74. Sato S, Shimizu E, He J, et al. Positive Effects of Oral Antibiotic Administration in Murine Chronic Graft-Versus-Host Disease. *Int J Mol Sci*. 2021;22(7):3745. Published 2021 Apr 3. doi:10.3390/ijms22073745
75. Morjaria S, Schluter J, Taylor BP, et al. Antibiotic-Induced Shifts in Fecal Microbiota Density and Composition during Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Infect Immun*. 2019;87(9):e00206-19. Published 2019 Aug 21. doi:10.1128/IAI.00206-19

76. Tanaka JS, Young RR, Heston SM, et al. Anaerobic Antibiotics and the Risk of Graft-versus-Host Disease after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2020;26(11):2053-2060. doi:10.1016/j.bbmt.2020.07.01126,11 (2020): 2053-2060.
77. Weber D, Hiergeist A, Weber M, et al. Detrimental Effect of Broad-spectrum Antibiotics on Intestinal Microbiome Diversity in Patients After Allogeneic Stem Cell Transplantation: Lack of Commensal Sparing Antibiotics. *Clin Infect Dis*. 2019;68(8):1303-1310. doi:10.1093/cid/ciy711

























































## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar do número restrito de pacientes que compuseram este estudo, nossos resultados confirmam um desequilíbrio na composição da microbiota intestinal após o TCTH e relação com DECH aguda em uma amostra de pacientes brasileiros. Os resultados corroboraram a algumas das mudanças observadas por outros trabalhos em relação às características taxonômicas durante o curso do transplante, com a redução de bactérias importantes para a saúde, como as do gênero *Bifidobacterium*, e aumento de bactérias potencialmente patogênicas, como as da família *Enterobacteriaceae*. Também foi possível observar a presença de alterações metabólicas microbianas, relacionadas especialmente ao metabolismo energético.

Apesar desses achados, a confirmação dos resultados em amostras maiores é recomendada. Entendemos ainda que as mudanças taxonômicas que podem impactar em diferentes perfis metabólicos e mecanismos moleculares e celulares que atuam nesse contexto, merecem ser estudadas de forma mais aprofundada quanto ao impacto nos resultados do TCTH. Além disso, o papel dos antibióticos nesse contexto precisa ser considerado, especialmente quando utilizados de forma profilática, tendo em vista que muitas das alterações na microbiota intestinal parecem ser provocadas pelo seu uso, possivelmente impactando nos desfechos pós-transplante.

## **9 PERSPECTIVAS FUTURAS**

O conhecimento mais aprofundado acerca da dinâmica da microbiota intestinal ao longo do desenvolvimento do processo de transplante, considerando as alterações no perfil metabólico e o envolvimento de mecanismos celulares e moleculares será interessante para a elucidação do impacto no TCTH. Estudos longitudinais com especial foco no uso de antibióticos, nas bactérias produtoras de butirato e no papel das células T podem ser promissores nesse sentido.

Posteriormente, estudos de intervenção com o intuito de restaurar e/ou preservar a integridade da microbiota intestinal, tendo em vista a relação com os desfechos do paciente, poderão ser planejados e implementados de forma mais assertiva. O uso racional de antibióticos, uso de pré e/ou probióticos ou, ainda, o transplante de microbiota fecal, poderão ser explorados como estratégias terapêuticas nesses estudos.

**APÊNDICE A - TCLE****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Nº do projeto GPPG: 2021-0500

Título do projeto: Avaliação da microbiota intestinal e suas alterações em pacientes adultos de transplante de células tronco hematopoiéticas alogênico de um hospital do Sul do Brasil

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa cujo objetivo é avaliar a microbiota intestinal e as alterações ocorridas pós-transplante de células tronco hematopoiéticas alogênico. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Nutrição e Serviço de Hematologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Se você aceitar o convite, sua participação na pesquisa envolverá uma entrevista de aproximadamente 20 minutos na qual você responderá perguntas relacionados ao seu nível socioeconômico e estado nutricional e será verificado seu peso e altura. Também será solicitado fornecimento de amostras de fezes em dois momentos: antes de iniciar o condicionamento para o transplante e na semana do dia 28 após o transplante. Você terá liberdade para fornecer a amostra de acordo com momento fisiológico apropriado, dentro do período preestabelecido na pesquisa. Você poderá chamar o coletador, que trará o frasco apropriado para coleta e irá orientá-lo. Dados sobre exames e tratamento serão acessados através do prontuário eletrônico.

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são desconforto ou cansaço/mal estar relacionado à hospitalização/doença ao responder as perguntas ou ao realizar a aferição do peso e altura; Desconforto/constrangimento para fornecimento de amostra de fezes; E risco baixo de quebra de confidencialidade dos dados.

Essa pesquisa não trará benefícios diretos aos participantes, porém, poderá contribuir para o aumento do conhecimento sobre o assunto estudado, e, poderá beneficiar futuros pacientes.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Rubrica do participante

Rubrica do pesquisador

Página 1 de 2

CEP Hospital de Clínicas de Porto Alegre (MR 01/06/2020)

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável Lúcia Silla, pelo telefone (51) 99911-2587, com a pesquisadora Jéssica Härter, pelo telefone (53) 99108-3884 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo e-mail cep@hcpa.edu.br, telefone (51) 33596246 ou Av. Protásio Alves, 211 - Portão 4 - 5º andar do Bloco C - Rio Branco - Porto Alegre/RS, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

\_\_\_\_\_  
Nome do participante da pesquisa

\_\_\_\_\_  
Assinatura

\_\_\_\_\_  
Nome do pesquisador que aplicou o Termo

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Local e Data: \_\_\_\_\_

**ANEXO 1. STROBE Statement—checklist of items that should be included in reports of observational studies**

	<b>Item No</b>	<b>Recommendation</b>
<b>Title and abstract</b>	1	(a) Indicate the study’s design with a commonly used term in the title or the abstract <b>PAG. 42</b>
		(b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found <b>PAG. 42</b>
<b>Introduction</b>		
Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported <b>PAG. 43</b>
Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses <b>PAG. 44</b>
<b>Methods</b>		
Study design	4	Present key elements of study design early in the paper <b>PAG. 44</b>
Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection <b>PAG. 44</b>
Participants	6	(a) <i>Cohort study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants. Describe methods of follow-up <b>PAG. 44</b>
		<i>Case-control study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of case ascertainment and control selection. Give the rationale for the choice of cases and controls <b>NA</b>
		<i>Cross-sectional study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants <b>NA</b>
		(b) <i>Cohort study</i> —For matched studies, give matching criteria and number of exposed and unexposed
		<i>Case-control study</i> —For matched studies, give matching criteria and the number of controls per case

Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable	<b>PAG. 44-47</b>
Data sources/ measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group	<b>PAG. 44-47</b>
Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias	<b>PAG. 44-47</b>
Study size	10	Explain how the study size was arrived at	<b>PAG. 44</b>
Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why	
Statistical methods	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding	<b>PAG 46-47</b>
		(b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions	<b>PAG 46-47</b>
		(c) Explain how missing data were addressed	
		(d) <i>Cohort study</i> —If applicable, explain how loss to follow-up was addressed	
		<i>Case-control study</i> —If applicable, explain how matching of cases and controls was addressed	<b>NA</b>
		<i>Cross-sectional study</i> —If applicable, describe analytical methods taking account of sampling strategy	<b>NA</b>
		(e) Describe any sensitivity analyses	

Continued on next page

## Results

Participants	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed <b>PAG 47-48</b>
		(b) Give reasons for non-participation at each stage <b>PAG 47</b>
		(c) Consider use of a flow diagram
Descriptive data	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders <b>Tab 1/2</b>
		(b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest <b>PAG 47-48</b>
		(c) <i>Cohort study</i> —Summarise follow-up time (eg, average and total amount)
Outcome data	15*	<i>Cohort study</i> —Report numbers of outcome events or summary measures over time <b>PAG 47-48</b>
		<i>Case-control study</i> —Report numbers in each exposure category, or summary measures of exposure <b>NA</b>
		<i>Cross-sectional study</i> —Report numbers of outcome events or summary measures <b>NA</b>
Main results	16	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included <b>NA</b>
		(b) Report category boundaries when continuous variables were categorized <b>NA</b>
		(c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period <b>NA</b>
Other analyses	17	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses
<b>Discussion</b>		
Key results	18	Summarise key results with reference to study objective <b>PAG 48</b>
Limitations	19	Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias <b>PAG 48-52</b>

Interpretation	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence	<b>PAG 48-52</b>
----------------	----	--	------------------

---

Generalisability	21	Discuss the generalisability (external validity) of the study results	<b>PAG 48-52</b>
------------------	----	---	------------------

---

<b>Other information</b>	<b>PAG. 41</b>
--------------------------	----------------

---

Funding	22	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based
---------	----	---

\*Give information separately for cases and controls in case-control studies and, if applicable, for exposed and unexposed groups in cohort and cross-sectional studies.

**Note:** An Explanation and Elaboration article discusses each checklist item and gives methodological background and published examples of transparent reporting. The STROBE checklist is best used in conjunction with this article (freely available on the Web sites of PLoS Medicine at <http://www.plosmedicine.org/>, Annals of Internal Medicine at <http://www.annals.org/>, and Epidemiology at <http://www.epidem.com/>). Information on the STROBE Initiative is available at [www.strobe-statement.org](http://www.strobe-statement.org).