



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

Marcello Imbrizi Rabello

Estudo piloto de avaliação da microbiota intestinal em portadores de Doença
de Crohn antes e após tratamento com Infliximabe e Azatioprina.

CAMPINAS
2024

Marcello Imbrizi Rabello

Estudo piloto de avaliação da microbiota intestinal em portadores de Doença de Crohn antes e após tratamento com Infiximabe e Azatioprina.

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Claudio Saddy Rodrigues Coy

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE PARA A ETAPA DE QUALIFICAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO MARCELLO IMBRIZI RABELLO, E ORIENTADO PELO PROF. DR. CLAUDIO SADDY RODRIGUES COY.

CAMPINAS

2024

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

R112e Rabello, Marcello Imbrizi, 1987-
Estudo piloto de avaliação da microbiota intestinal em portadores de Doença de Crohn antes e após tratamento com Infiximabe e Azatioprina / Marcello Imbrizi Rabello. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

Orientador: Claudio Saddy Rodrigues Coy.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculdade de Ciências Médicas.

1. Doenças inflamatórias intestinais. 2. Doença de Crohn. 3. Microbioma. 4. Infiximabe. 5. Disbiose. I. Coy, Claudio Saddy Rodrigues, 1961-. II. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Pilot study evaluating changes in the Intestinal microbiota of Crohn's disease patients before and after treatment with Infiximab and azathioprine

Palavras-chave em inglês:

Inflammatory bowel disease

Crohn's disease

Microbiome

Infiximab

Dysbiosis

Area de concentração: Cirurgia Translacional

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Claudio Saddy Rodrigues Coy [Orientador]

Aderson Omar Mourão Cintra Damião

Cristiane Kibune Nagasako Vieira da Cruz

Paulo Gustavo Kotze

Rogério Saad Hossne

Data de defesa: 06-06-2024

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Cirurgia

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-5397-0084>

- Currículo Lattes do autor: <https://lattes.cnpq.br/1830149180701694>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

MARCELLO IMBRIZI RABELLO

ORIENTADOR: PROF. Dr. CLAUDIO SADDY RODRIGUES COY

MEMBROS TITULARES:

- 1. PROF. DR. Claudio Saddy Rodrigues Coy**
- 2. PROF. DR. Aderson Omar Mourão Cintra Damião**
- 3. PROF. DRA. Cristiane Kibune Nagasako Vieira da Cruz**
- 4. PROF. DR. Paulo Gustavo Kotze**
- 5. PROF. DR. Rogério Saad Hossne**

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 06/06/2024

DEDICATÓRIA

Um filho cuidado com amor, sonhos e educação pode realizar tudo. Dedico aos meus pais Carlos e Rosilene por me fazerem acreditar.

AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa foi feita com a ajuda de muitas pessoas, agradeço a todos os envolvidos.

Ao Professor Cláudio Saddy Rodrigues Coy pelo acolhimento, apoio, ensinamentos e incentivo incondicional desde o dia que nos conhecemos, mas especialmente, obrigado pela simplicidade e atenção que sempre teve comigo.

À Professora Daniela Oliveira Magro pelas análises e ensinamentos sobre estatísticas, aprendizados sobre nutrição, revisões de texto, mas principalmente, pela amizade e muitos momentos de risadas.

Ao Professor Mário José Abdala Saad por permitir que a análise da microbiota fosse realizada no laboratório LICRI e pela liberação de recursos e aos biólogos Andrey dos Santos, Diose Guadagnini e Heloisa Assalin por me ensinarem os meios de realização da análise e executarem o complexo processo de avaliação da microbiota.

Ao Professor Ciro Garcia Montes por permitir que os exames endoscópicos fossem realizados de acordo com o protocolo de pesquisa no Gastrocentro, assim como proporcionou um espaço para que o estudo pudesse ser realizado.

À disciplina de Coloproctologia da Unicamp, à Professora Maria de Lurdes Setsuko Ayrisono e ao Doutor Michel Garderi Camargo por permitirem que o estudo transcorresse no ambulatório de Doenças Inflamatórias Intestinais.

A todos os funcionários do Gastrocentro, especialmente às enfermeiras do Serviço de Endoscopia Digestiva que receberam e orientaram os pacientes antes e após os exames, às funcionárias do Laboratório de Trato Gastrointestinal por armazenarem as coletas, e aos funcionários da recepção que acolhiam os pacientes quando necessário.

À Universidade de Campinas por abrir suas portas e fornecer conhecimento, mas especialmente à Disciplina de Gastroenterologia, que me acolheu, me ensinou e me faz sentir parte de um grupo que tanto admiro.

Aos pacientes que mesmo diagnosticados com uma doença tão grave e cientes de que não seriam favorecidos diretamente pela pesquisa, não somente aceitaram participar da pesquisa, mas se sentiam felizes em poder ajudar.

Aos integrantes da banca de qualificação que realizaram importantes correções e sugestões aumentando a qualidade deste estudo.

Aos que estão desde sempre ao meu lado, Dete, Roberta, Junior, Karolina, meus avós, meus tios e Deus. Nada seria possível sem vocês.

Por fim, não somente agradeço, mas também dedico esta tese à minha esposa, Mariana, por embarcar junto a mim em cada projeto e comemorá-los como seus. Aos meus filhos, Eduardo e Sara que dividiram o tempo em que tinham comigo com esta tese, desde seus primeiros dias de vida, e que fizeram com que ela fosse executada com muito mais alegria e amor.

EPÍGRAFE

*“Todo grande progresso da ciência resultou de uma
nova audácia da imaginação”*

John Dewey

RESUMO

Introdução:

As Doenças Inflamatórias Intestinais (Retocolite Ulcerativa ou Doença de Crohn) resultam de uma interação complexa entre o sistema imunológico e outros sistemas, como o microbioma, que desempenha um papel fundamental na patogênese dessas doenças. Este estudo teve como objetivos descrever a composição da microbiota bacteriana intestinal antes e após a terapia com Infiximabe e Azatioprina, investigar a influência de exposições na microbiota e desenvolver um protocolo de avaliação de microbiota de portadores de Doenças Inflamatórias Intestinais para a Universidade de Campinas.

Métodos:

Estudo longitudinal em uma série de brasileiros com Doença de Crohn atendidos na cidade de Campinas-SP, tratados com Infiximabe e Azatioprina e submetidos à avaliação da microbiota intestinal pela leitura do 16s rRNA antes e após a terapia. Analisadas variáveis epidemiológicas, ambientais, clínicas, laboratoriais e endoscópicas.

Resultados e Conclusões:

Foram avaliados sete pacientes e a terapia empregada se mostrou capaz de alterar a composição microbiana intestinal promovendo mudança na abundância de filos específicos apesar de não ter impactado na alfa-diversidade. Não observamos diferenças na composição microbiana dos pacientes com fatores de exposição distintos.

Palavras-chaves: Doenças Inflamatórias Intestinais. Doença de Crohn. Microbioma. Infiximabe. Disbiose.

ABSTRACT

Background:

Inflammatory Bowel Diseases (IBD), including Ulcerative Colitis and Crohn's Disease, arise from a complex interplay between the immune system and other systems, such as the microbiome, which plays a pivotal role in the pathogenesis of these diseases. This study aimed to describe the composition of the intestinal bacterial microbiota before and after therapy with Infliximab and Azathioprine, investigate the influence of exposure factors on the microbiota, and develop a protocol for evaluating the microbiota of IBD patients at the University of Campinas.

Methods:

A longitudinal study was conducted on a cohort of Brazilian patients with Crohn's Disease treated with Infliximab and Azathioprine in Campinas-SP. The intestinal microbiota was assessed by 16s rRNA sequencing before and after therapy. Epidemiological, environmental, clinical, laboratory, and endoscopic variables were analyzed.

Results and Conclusions:

Seven patients were evaluated, and the employed therapy demonstrated the ability to alter the intestinal microbial composition by promoting changes in the abundance of specific phyla, despite not impacting alpha diversity. No differences in the microbial composition were observed between patients with distinct exposure factors.

Keywords: Inflammatory Bowel Diseases. Crohn's disease. Microbiome. Infliximab. Dysbiosis.

LISTA DE FIGURAS

Figuras:

- Figura 1 Esquematização do Sistema dos Três Domínios.
- Figura 2 Representação dos Filos bacterianos nos diferentes microbiomas humanos.
- Figura 3 Variação da composição microbiana humana ao longo da vida.
- Figura 4 Variações comuns na diversidade bacteriana em portadores de DII.
- Figura 5 Eletroferograma gerado pelo equipamento Bioanalyzer após a RCP.
- Figura 6 Organização dos *Index*.
- Figura 7 Fluxograma da captação de pacientes e amostra final.
- Figura 8 Representação da variação entre os filos no período prévio e após o tratamento e da baixa variação da α diversidade.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráficos:

Gráficos 1 e 2	Hábito alimentar dos pacientes.
Gráficos 3 e 4	Consumo de fontes de proteína animal pelos pacientes.
Gráfico 5	Variação do IADC.
Gráfico 6	Variação da PCR.
Gráfico 7	Variação da VHS.
Gráfico 8	Variação do SES-CD.
Gráfico 9	Variação da composição microbiana dividida por Filos.
Gráficos 10 e 11	Variação da alfa diversidade.
Gráfico 12:	Principais espécies metabolizadoras de propionato.
Gráfico 13:	Principais espécies metabolizadoras de Indol.
Gráfico 14:	Principais espécies metabolizadoras de Butirato

LISTA DE QUADROS

Quadros:

Quadro 1	Classificação de Montreal
Quadro 2	Terapias aprovadas e recomendadas para o tratamento da Doença de Crohn
Quadro 3	Metabólitos produzidos por bactérias e sua ação benéfica à saúde humana.
Quadro 4	Sequência de primers para região V3/V4 do gene 16S
Quadro 5	Filos detectados através do sequenciamento do 16S rRNA das amostras fecais

LISTA DE TABELAS

Tabelas:

Tabela 1	Características fenotípicas da Doença de Crohn.
Tabela 2	Dados gerais dos pacientes.
Tabela 3	Dados sociais e exposições ambientais dos pacientes.
Tabela 4	Avaliação do hábito alimentar.
Tabela 5	Frequência de consumo de fontes de proteínas por semana.
Tabela 6	Alterações do peso e IMC dos pacientes durante a indicação da terapia biológica.
Tabela 7	Marcadores de atividade inflamatória.
Tabela 8	Marcadores laboratoriais relacionados a nutrição do portador de Doença de Crohn.
Tabela 9	Composição microbiana por filos mais prevalentes.
Tabela 10	Resultado do p-valor da comparação da composição dos Filos entre grupos com diferentes exposições ambientais.
Tabela 11	Comparação da composição bacteriana entre pacientes em remissão e atividade endoscópica.
Tabela 12	Avaliação da oscilação dos principais metabolizadores de Ácidos Graxos de Cadeia Curta e Indol e das principais re-dutoras de FOS e GOS.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac:	Anticorpo
AGCC:	Ácidos Graxos de Cadeia Curta
AR:	Amido Resistentes
AUP:	Alimentos Ultraprocessados
AZA:	Azatioprina
ATP:	Adenosina Trifosfato
BP(bp):	Base pair
CEP:	Colangite Esclerosante Primária
CPF:	Calprotectina Fecal
CrF:	Creeping fat
DC:	Doença de Crohn
DII:	Doenças Inflamatórias Intestinais
DRL:	Dieta rica em lipídeos
FOS:	Fruto-oligossacarídeos
GABA:	Ácido Gama-Aminobutírico
GAVA:	Ácido Gama-Aminobutírico
GLP:	Peptídeo semelhante ao glucagon
GOS:	Galactooligossacarídeos
IADC:	Índice de Atividade de Doença de Crohn
IBGE:	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFX:	Infliximabe
Ig:	Imunoglobulina
IL:	Interleucina
IMC:	Índice de Massa Corporal
IQR:	Intervalo interquartil
JAK:	Janus Quinases
KB (kb)	Quilobase
LICRI:	Laboratório de Investigação Clínica em Resistência à Insulina
MEI:	Manifestações extraintestinais

NOD2:	Intracellular pathogen molecular sensor nucleotide binding oligomerization domain 2
PCR:	Proteína C Reativa
RCP:	Reação em cadeia da polimerase
RCU:	Retocolite Ulcerativa
rRNA:	RNA ribossomal
S1p:	Esfingosina 1 fosfato
SES-CD:	Simple Endoscopy Score for Crohn's Disease
SSZ:	Sulfassalazina
TCLE:	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGI:	Trato gastrointestinal
TMF:	Transplante de microbiota fecal
TNF:	Fator de Necrose Tumoral
TNF- α :	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UFC:	Unidades Formadoras de Colônia
VIC:	Válvula ileocecal
VHS:	Velocidade de hemossedimentação
XOS:	Xilo-oligossacarídeos

SUMÁRIO

1. Introdução.....	20
1.1 Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa: definição.....	21
1.2 Doença de Crohn: fenótipos.....	22
1.3 Terapias medicamentosas no tratamento da Doença de Crohn	23
1.3.1 Azatioprina	25
1.3.2 Infliximabe	25
1.4 O microbioma humano.....	26
1.5 O microbioma intestinal.....	29
1.6 Funções fisiológicas da microbiota intestinal.....	31
1.6.1 Funções protetivas	31
1.6.2 Função metabólica da microbiota intestinal.....	32
1.6.3 Carboidratos e fibras não absorvíveis.....	32
1.6.4 Proteínas	33
1.6.5 Lipídeos	34
1.7 A camada de muco intestinal	36
1.8 Alterações de microbioma e doenças.....	36
1.9 Correlação entre microbioma e a Doença de Crohn	37
1.10 Microbioma, genoma e demais interatomas	40
1.11 Meios de avaliação do microbioma.....	41
2. Justificativa	43
3. Objetivos	44
3.1 Objetivo principal:.....	44
3.2 Objetivos secundários:	44
4. Metodologia.....	45
4.1 Pesquisa de Pacientes	45
4.2 Critérios de Inclusão e Exclusão	45
4.2.1 Inclusão:	45
4.2.2 Exclusão:	45
4.3 Ocorrências inesperadas.	46
4.4 Variáveis Analisadas	46

4.4.1 Avaliação da resposta terapêutica	46
4.4.2 Avaliação do hábito alimentar.....	47
4.4.3 Avaliação dos hábitos de vida.....	48
4.4.4 Avaliação antropométrica	48
4.4.5 Avaliação laboratorial.....	48
4.5 Avaliação da microbiota intestinal.....	51
4.6 Análise Estatística	55
4.7 Formulação do Protocolo para Avaliação da Microbiota Intestinal em Portadores de DII.....	56
5. Aspectos Éticos	57
6. Resultados.....	58
6.1 Apresentação da coorte.	58
6.2 Exposições Ambientais	61
6.3 Resultados Terapêuticos.....	65
6.4 Avaliação da Composição Microbiana	67
6.4.1 Resultados por Filos	69
6.4.2 Resultados por Ordem e Famílias.....	72
6.4.3 Resultado por Gêneros e Espécies.....	73
7. Discussão	78
7.1 Epidemiologia e Fenótipo da DC	79
7.2 Resposta Terapêutica.....	80
7.3 Fatores Familiares.....	81
7.4 Fatores Ambientais	82
7.5 O hábito alimentar.....	85
7.5.1 Leguminosas.....	86
7.5.2 Frutas	87
7.5.3 Verduras (folhosos)	89
7.5.4 Legumes	89
7.5.5 Carnes processadas.....	90
7.5.6 Doces (açúcares e doces processados)	91
7.5.7 Ultraprocessados	92
7.5.8 Gorduras animais e vegetais.....	94
7.5.9 Fontes proteicas.....	95
7.6 Avaliação da microbiota.....	97

7.6.1 Avaliação da microbiota: Filos	98
7.6.2 Avaliação da microbiota: Famílias e Espécies	99
8. Fragilidades do estudo	101
9. Conclusões.....	102
10. Referências Bibliográficas	103
11. Anexos.....	132
11.1 Anexo 1: Termo De Consentimento Livre e Esclarecido	132
11.2 Anexo 2: Questionário Social e Alimentar:	140
11.3 Anexo 3: Acesse o código QR para visualizar as famílias e/ou ordens.	143
11.4 Anexo 4: Acesse o código QR para visualizar os gêneros e/ou espécies.....	144
11.5 Anexo 5: Composição dos filos nos dois momentos avaliados.	145
11.6 Anexo 6: Proposta para o protocolo para avaliação da microbiota intestinal em portadores de Doenças Inflamatórias Intestinais.....	146
11.7 Anexo 7: Parecer Consubstanciado do CEP.	151

1. Introdução

As Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) são doenças imunomediadas que promovem o acometimento inflamatório do trato gastrointestinal (TGI), podendo também repercutir de forma sistêmica. São subdivididas em Doença de Crohn (DC) e Retocolite Ulcerativa (RCU) que se diferem quanto a apresentação da doença, segmentos do TGI acometidos e até mesmo pela abordagem terapêutica. Estas doenças podem ocorrer em qualquer idade embora a principal faixa etária de incidência seja a população de adultos jovens (faixa etária entre 20 e 40 anos). A patogênese é complexa e parcialmente esclarecida, sabendo-se tanto a DC quanto a RCU resultam de várias interações, especialmente genéticas e ambientais, favorecendo uma resposta imune descontrolada à microbiota intestinal, ocasionando assim o dano tecidual¹⁻³.

As DII apresentam distribuição geográfica heterogênea, com maior prevalência em países desenvolvidos da América do Norte e Europa Ocidental. Essa disparidade epidemiológica está associada a fatores ambientais, como urbanização, dieta ocidental, higiene aprimorada, menor exposição solar e uso frequente de antibióticos. Essa associação é reforçada pelo aumento do diagnóstico de DII em indivíduos que migram de áreas com baixa incidência para regiões mais urbanizadas. A elucidação das complexas relações entre ambiente, microbiota intestinal e DII é crucial para o desenvolvimento de estratégias eficazes de prevenção e tratamento⁴⁻⁶.

Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) revelam uma acentuada urbanização da população brasileira nas últimas décadas. Em 1960, apenas 44,67% da população vivia em áreas urbanas, enquanto em 2010 esse número saltou para 84,36%. A região Sudeste se destaca como a mais urbanizada (92,95%), enquanto o Nordeste apresenta a menor taxa (71,76%). Essa transformação social, impulsionada por fatores socioeconômicos e demográficos, acarretou modificações significativas no estilo de vida da população brasileira. Melhorias na higiene, acesso à água potável e saneamento básico, combinadas com alterações na dieta, caracterizadas por um maior consumo de alimentos processados e industrializados, configuram um cenário propício ao de-

envolvimento de doenças inflamatórias intestinais (DII)^{7,8}. Em 2017, uma pesquisa da Associação Brasileira de Retocolite e Doença de Crohn (ABCD), embora tenha sido realizada por procura passiva dos próprios pacientes (self-selection), demonstrou maior prevalência das DII na região sudeste (58%), seguida pelas regiões sul (22%), nordeste (12%), centro-oeste (6%) e norte (3%)⁹. Uma recente publicação epidemiológica nacional apontou um aumento da incidência das DII entre os anos de 2012 e 2020 de 9,4 para 9,6 para cada 100 mil habitantes. Neste período observou-se um aumento da incidência da RCU (5,7 para 6,9 / 100.000 habitantes) e redução da incidência da DC (3,7 para 2,7 / 100.000 habitantes). Já a prevalência geral das DII aumentou de 30 para 100 pacientes para cada 100.000 habitantes, sendo um aumento de 15,7 para 56,5 (pacientes por 100 mil habitantes) na RCU e 12,6 para 33,6 (pacientes por 100 mil habitantes) na DC¹⁰. A distribuição geográfica brasileira segue um gradiente de maior incidência e prevalência do sul para o norte do país, mas observamos distribuição mais heterogênea (por exemplo, o estado de Pernambuco com maior incidência de Retocolite Ulcerativa e o estado de São Paulo e Goiás com a maior incidência de Doença de Crohn) pelo país além de um destaque da prevalência das doenças em cidades interioranas¹⁰.

A avaliação da influência da raça nos índices de prevalência das DII é dificultosa no Brasil, devido a alta taxa de miscigenação racial. As publicações atuais não demonstram diferenças nas frequências destas doenças considerando a declaração de raça ou a ancestralidade^{9,11}.

1.1 Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa: definição

A DC se caracteriza pelo acometimento mais frequentemente descontínuo do trato gastrointestinal (TGI), podendo atingir todo o trajeto do tubo digestivo. O processo inflamatório que é transmural, em sua maioria, se caracteriza pelo comprometimento de todas as camadas da parede do órgão doente, da mucosa até a serosa. A doença promove o aparecimento de úlceras profundas e, até mesmo, de trajetos fistulosos, comunicando o intestino com estruturas vizinhas ou com o meio exterior e, ainda, formando abscessos. O processo de cicatrização pode gerar deformidades e levar a diferentes graus de estenoses³.

A RCU causa inflamação contínua da mucosa afetando o reto e, de forma variável, o cólon. Um acometimento do íleo terminal pode ocorrer nos casos de acometimento de todos os segmentos colônicos até o ceco, decorrente do re-fluxo inflamatório até aproximadamente os cinco centímetros distais do intestino delgado. O processo inflamatório tem como particularidade ser restrito à mucosa, não invadindo as camadas profundas da parede intestinal doente, exceto em casos especiais como no megacólon tóxico².

1.2 Doença de Crohn: fenótipos

A DC é representada por um amplo espectro de manifestações que variam de paciente para paciente. Existe uma tendência de ser clinicamente mais grave em pacientes jovens, especialmente com menos de 40 anos ao diagnóstico, embora não exclua os demais de uma grave apresentação clínica. Por poder se manifestar em qualquer parte do TGI, os sintomas são muito variáveis, sendo a dor abdominal o sintoma mais prevalente¹².

Quadro 1. Classificação de Montreal¹³

Idade ao Diagnóstico	
< 16 anos	A1
17 – 40 anos	A2
> 40 anos	A3
Localização	
Doença ileal	L1
Doença colônica	L2
Doença Ileocolônica	L3
Doença isolada do TGI superior	L4
Comportamento	
Não penetrante, não estenosante	B1
Estenosante	B2
Penetrante	B3
Perianal	p

Classificação de Montreal de acordo com idade ao diagnóstico, localização da doença do TGI e comportamento. A doença concomitante de cólon e áreas do TGI proximais devem ser mencionadas como L1+L4. A doença perianal, quando presente, deve ser classificada a parte, ao final da classificação, incluindo a letra p (ex: A1L2B2p).

As localizações com maior concentração da microbiota, seja pela colonização (como o cólon) ou pela estase fisiológica (íleo terminal e reto) são os locais de maior incidência da doença¹⁴. O acometimento da região perianal classicamente confere pior prognóstico além de várias complicações como formações de fístulas e abscessos e sequelas como a incontinência fecal^{15,16}. O comprometimento e dano tecidual também é variável, podendo a doença se manifestar somente com inflamação da mucosa (gerando enantema, erosões ou ulcerações), ocorrência de estenoses, que podem ser secundárias ao edema proporcionado pela inflamação ou a cicatrização de áreas doentes, além de formação de fístulas entre a região acometida e estruturas adjacentes ou abscessos¹².

Considerando as características variadas da DC foi proposta uma classificação fenotípica dos pacientes no *International Working Party* em Roma no ano de 1991, mas somente concluída no ano de 1998 em no Congresso Mundial de Gastroenterologia de Viena, tendo recebido o nome da cidade como titulação. A classificação foi posteriormente modificada como classificação de Montreal no ano de 2005 (Quadro 1)^{13,17}. Esta classificação foi ainda adaptada para ser aplicada em crianças e adolescentes, como classificação de Paris¹⁸.

1.3 Terapias medicamentosas no tratamento da Doença de Crohn

Até a década de 1930, nenhuma terapia de eficácia comprovada era usada para o tratamento de doenças inflamatórias intestinais. Na primeira metade do século XX, o conhecimento dessas doenças era tão escasso quanto as opções terapêuticas. A primeira droga desenvolvida e testada na tentativa de controlar as DII foi a sulfassalazina (SSZ), por Nanna Svartz. Embora a SSZ e seus derivados sejam indicados até os dias atuais para o tratamento da RCU, seu uso não é recomendado no tratamento da DC^{19,20}. Seguiram-se o desenvolvimento dos glicocorticoides e imunomoduladores. Esse conjunto de modalidades terapêuticas é atualmente chamado de "terapias convencionais"²¹⁻²³.

Na década de 1990 ocorreu o amplo desenvolvimento de anticorpos monoclonais, inicialmente indicados à outras áreas médicas como a reumatologia e a oncologia, com posterior demonstração de eficácia nas DII. Os primeiros anti-

corpos monoclonais aprovados foram os antagonistas do TNF- α (anti-TNF), seguidos pelos antagonistas das integrinas (anti-integrinas) e mais recentemente antagonistas das interleucinas (anti-IL). Define-se como “terapias biológicas” o emprego dos anticorpos monoclonais no tratamento das DII. A partir da década de 2010 ocorreu o desenvolvimento de novas medicações de tecnologias sintéticas, chamadas “pequenas moléculas”, onde a eficácia foi observada nos inibidores das Janus Quinases (iJAK) e moduladores da Esfingosina-1-fosfato (moduladores-S1p) porém até o momento somente uma molécula inibidora da JAK (upadacitinibe) teve eficácia comprovada para o tratamento da Doença de Crohn²⁴. O Quadro 2 lista as terapias disponíveis para o tratamento da Doença de Crohn.

Quadro 2. Terapias aprovadas e recomendadas para o tratamento da Doença de Crohn²⁴

Classe	Drogas	Ensaio Clínico	Disponível no Brasil*
Glicocorticoides	Primeira geração		
	• Prednisona	Não	Sim
	• Prednisolona	Não	Sim
	• Hidrocortisona	Não	Sim
	Segunda geração		
	• Budesonida	Sim	Sim**
	• Budesonida MMX	Sim	Sim
Imunomoduladores	• Betametasona	Não	Sim***
	Azatioprina	Não	Sim
	6-Mercaptopurina	Não	Sim
	Metotrexato	Não	Sim
Anti-TNF	Infliximabe	Sim	Sim
	Adalimumabe	Sim	Sim
	Certolizumabe pegol	Sim	Sim
Anti-Integrinas	Natalizumabe	Sim	Não
	Vedolizumabe	Sim	Sim
Anti-Interleucinas	Ustequinumabe	Sim	Sim
	Risanquizumabe	Sim	Não**
Inibidores JAK	Upadacitinibe	Sim	Sim

* Disponível no Brasil para a indicação de tratamento da Doença de Crohn. ** Produto aprovado para comercialização no Brasil, porém não disponibilizado pela fabricante. *** Produto aprovado para comercialização no Brasil, porém vendido somente por farmácias de manipulação.

1.3.1 Azatioprina

A Azatioprina, um imunomodulador do grupo das tiopurinas, atua por diversos mecanismos, incluindo a inibição da replicação do DNA ou RNA de células hematopoiéticas e a indução de apoptose (morte celular programada) de células T ativadas. Essa ação diminui a população dessas células inflamatórias de forma sistêmica, atenuando suas funções celulares e humorais²⁴.

A Azatioprina tem um início de ação imunomoduladora lento, mas se destaca como terapia de manutenção de remissão de Doença de Crohn enquanto o uso para induzir remissão da DC é questionado. Esta molécula sintética é constantemente utilizada junto aos anticorpos monoclonais, especialmente ao Infliximabe, pois são capazes de reduzir a taxa de formação de anticorpos antidrogas conforme demonstradas pelos estudos SONIC e UC SUCCES^{25,26}. Desta forma, as principais recomendações de terapia para o tratamento da DC recomendam a associação da Azatioprina (ou outra terapia imunomoduladora convencional) quando o Infliximabe for a terapia avançada de escolha^{20,27,28}.

1.3.2 Infliximabe

O $\text{TNF}\alpha$ compõe uma importante parte das proteínas e receptores envolvidos na regulação imune. Muitas das manifestações inflamatórias, como a febre, a ativação de células T e de granulócitos são medidas pelo $\text{TNF}\alpha$ e especificamente nas DII, este mediador recruta células inflamatórias, promove o edema, a angiogênese e a hipervascularização, ativa a cascata de coagulação e especificamente na DC, o anti-TNF atua na formação do granuloma²⁹⁻³¹.

O primeiro anti-TNF liberado para o tratamento da DC foi o Infliximabe (IFX) que é um anticorpo monoclonal quimérico (composto 75% de porção humana e 25% de porção murina) que tem alta afinidade e especificidade pelo $\text{TNF}\alpha$. A eficácia desta droga na DC foi inicialmente apontada nos estudos AC-CENT 1, onde observou-se resposta clínica na segunda semana de tratamento em 58% dos pacientes e remissão clínica em 39% dos pacientes ao final de um

ano³². A mesma droga foi testada em portadores de DC com manifestação perianal com presença de fístulas no estudo ACCENT 2, onde a resposta e remissão clínica foi observada em 46% e 36% dos integrantes do grupo estudado³³.

Muitos pacientes em uso de IFX utilizam concomitantemente a Azatioprina (AZA), 6-Mercaptopurina ou Metotrexato visando, na maioria dos casos, o aumento da efetividade da droga em consequência da redução da formação de anticorpos anti-Infliximabe (Ac anti-IFX). Esta prática é corroborada pelos resultados do estudo SONIC que comparou estratégias de tratamento da DC e apon- tou um aumento da efetividade do grupo em uso de IFX+AZA quando comparado com o grupo IFX em monoterapia, atingindo (o grupo em combinação terapêutica) 44% de remissão clínica e 56% de cicatrização de mucosa versus 30% e 43% quando em monoterapia²⁵.

1.4 O microbioma humano

O surgimento das bactérias ocorreu há cerca de 3,8 bilhões de anos, aproximadamente 1,4 bilhões de anos antes da linhagem eucariótica, a qual os humanos pertencem. Embora sejam encontradas como células únicas de vida livre, muitas bactérias se associaram a um hospedeiro, juntamente com as arqueas, fungos e protistas formando assim o holobionte (nome atribuído a um organismo hospedeiro que vive em simbiose com outros agentes). O holobionte animal configura o hospedeiro animal e sua microbiota associada: bactérias, arqueas, fungos, protistas, helmintos e vírus. Microbioma ou microbiota são terminologias intercambiáveis que referem ao conteúdo do genoma coletivo da microbiota (também chamado de metagenoma microbiano)³⁴.

A classificação dos seres proposta por Carl Woese em 1990 agrupa os diferentes reinos em três domínios: Bacteria, Archaea e Eukarya, este último inclui todos os seres vivos compostos por células com um núcleo organizado, dentre eles os reinos Protista, Fungi e Animalia. Os reinos são ainda subdivididos em Filos, Classes, Ordens, Famílias, Gêneros e Espécies. Desta forma, as análises da microbiota devem ser organizadas de acordo com o tipo de classificação proposto pela metodologia de cada estudo^{35,36}. A Figura 1 exemplifica estas classificações.

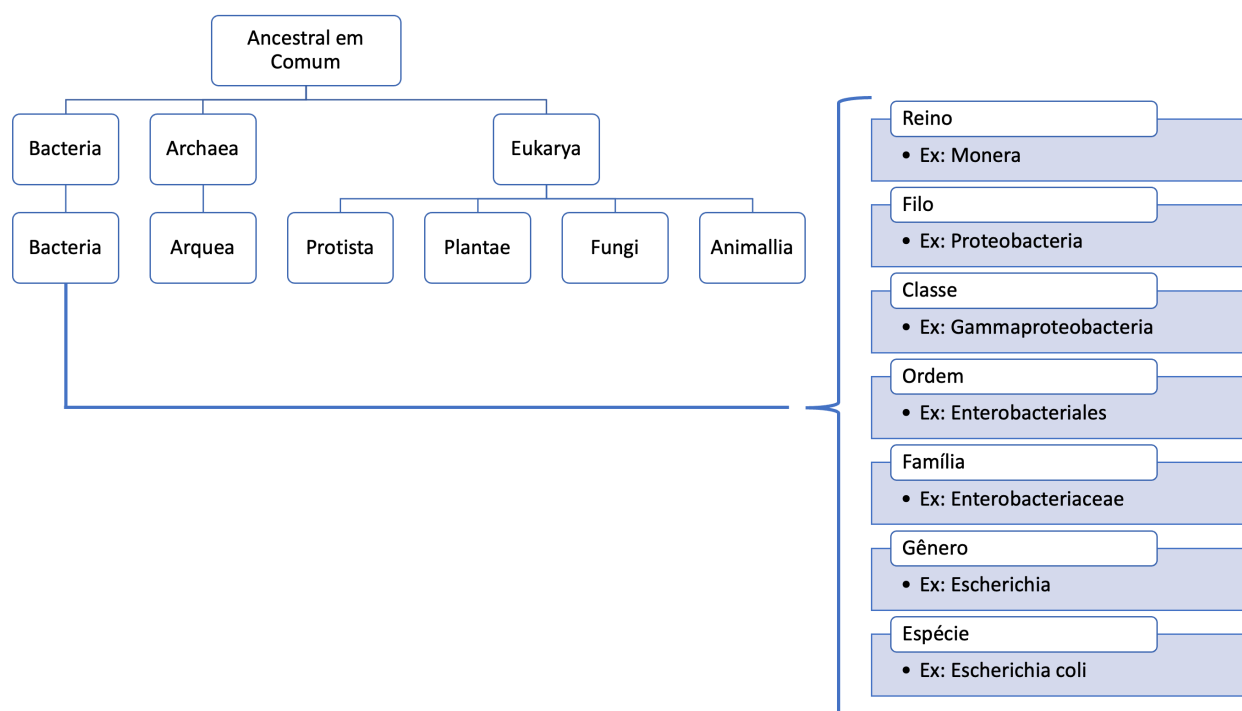


Figura 1. Esquemática do Sistema dos Três Domínios e exemplificação da Classificação Taxonômica baseada na espécie *Escherichia coli*. As espécies ainda são subdivididas, por exemplo, a *Escherichia coli* 0157:H7, um patógeno alimentar, e a *Escherichia coli* Nissle 1917, utilizada como probiótico no tratamento da RCU^{35,37}.

O Projeto Genoma Humano previa, em seus objetivos, encontrar cerca de 100.000 genes, a despeito dos 20.000 genes codificadores de proteína realmente encontrados ao final do projeto (número relativamente semelhante ao número de genes de uma mosca). Entretanto, considerando que o microbioma humano é parte atuante e necessária ao funcionamento do holobionte humano, uma completa avaliação metagenômica poderia ultrapassar 100.000 genes³⁸. O microbioma é parte atuante de todos os sítios de interação do corpo humano com o meio externo, sendo encontrado na cavidade oral, na superfície da pele, nos intestinos (em diferentes composições de acordo com a localização), nos pulmões, dentre outros. As bactérias tendem a predominar em todos os sítios, (em relação ao número de espécies), o que é exemplificado na Figura 2³⁹.

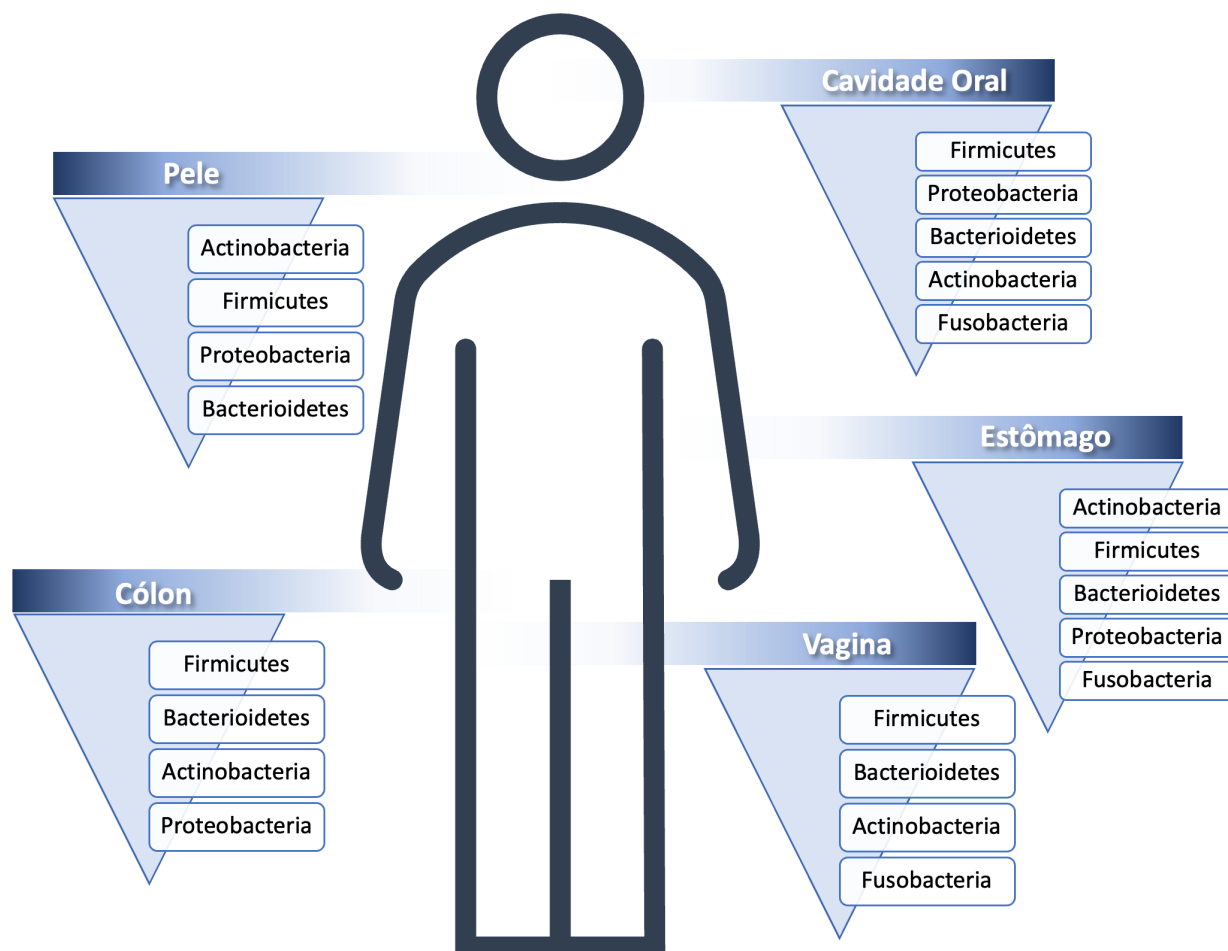


Figura 2. Representação dos Filos bacterianos nos diferentes microbiomas humanos ^{40,41}.

A formação do microbioma humano se inicia logo após o nascimento, de forma dinâmica e inicialmente dominado pelo filo Actinobactérias (principalmente pelo gênero *Bifidobactérias*), especialmente nos primeiros dois anos, e com o passar do tempo, a composição da microbiota aumenta em número e diversidade de espécies, o que é chamado de alfa-diversidade, ao passo que ocorre uma redução da variação das espécies e da sua abundância nas diferentes áreas ou entre os humanos e seus pares, o que é chamado de beta diversidade⁴². Inúmeros fatores irão influenciar as variações da composição microbioma, como o tipo de aleitamento, o início da alimentação com sólidos, a má alimentação ou a desnutrição, o uso de antibióticos, obesidade, idade etc⁴². Em indivíduos saudáveis o microbioma tende a se estabilizar na vida adulta, dominado pelos filos Bacterioidetes e Firmicutes, e ao final da vida a microbiota torna-se menos diversa, ainda com a mesma predominância, porém com um aumento

das Proteobactérias e redução das Actinobactérias. Esta variação pode ser exemplificada na figura 3.

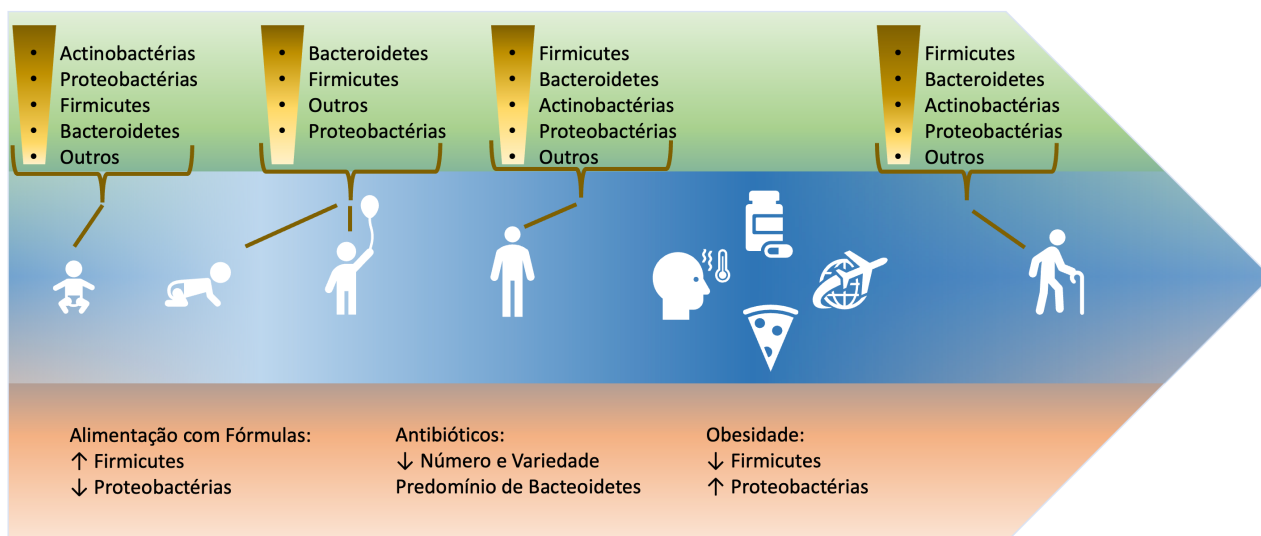


Figura 3. Variação da composição microbiana humana ao longo da vida e com adaptações a interferências externas como fórmulas de alimentação e uso de antibióticos. Adaptado de Ottman et al ⁴².

1.5 O microbioma intestinal

Dentre os microbiomas humanos, o intestinal é o mais estudado. Nele, as espécies bacterianas apresentam maior grau de diversidade do que nos demais microbiomas do corpo. Dentre os maiores estudos relacionados ao microbioma, destacam-se o *Human Microbiome Project* (extensão conceitual do Projeto Genoma Humano, multidisciplinar e multicêntrico que avalia o microbioma e visa a caracterização dos genomas, seus respectivos RNAs mensageiros, proteínas e produtos metabólicos) e o *MetaHIT* (projeto da União Europeia de sequenciamento metagenômico intestinal com cooperação internacional) que identificaram cerca de 3000 espécies bacterianas nas fezes humanas classificadas em 11 filos porém com predomínio de quatro: Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobactérias e Actinobactérias.

A microbiota gastrointestinal humana está concentrada principalmente no cólon e é composta em sua grande maioria pelas bactérias e em menor proporção arqueas, eucariotas e vírus⁴⁰. Ela participa de inúmeras funções no corpo humano, como na defesa contra patógenos invasores, na produção de metabólitos essenciais, interage com o sistema imune, tem papel fundamental na diges-

tão e no metabolismo, controlam a proliferação e diferenciação celular no epitélio, modificam a resistência insulínica assim como sua produção, influenciam a comunicação cérebro intestinal e participam da manutenção de um intestino fisiologicamente normal e saudável⁴³.

A formação do microbioma gastrointestinal decorre de uma sequência de fatores e expositores culminando em um status final comum a raça humana, porém com características distintas entre populações e uma “assinatura” minuciosamente diferenciada de pessoa para pessoa⁴². Ao nascimento inicia-se o processo de colonização e adaptação do trato gastrointestinal. O equilíbrio da microbiota intestinal com seus componentes de interação (por exemplo: mucosa e sistema imune) é instável e sofre interferências das sequenciais mudanças do conteúdo ingerido: líquido amniótico, colostro, leite materno, fórmulas infantis e alimentos⁴⁴. A alta concentração de oxigênio na luz intestinal na primeira semana de vida favorece a proliferação de anaeróbios facultativos, especialmente do filo das Proteobacterias. Embora a colonização intraútero não seja esclarecida, alguns trabalhos apontam para a translocação de bactérias por via placentária, como algumas espécies de *Escherichia coli*. Outro fato para sugerir esta predominância é que, durante a gestação há aumento da prevalência das Proteobacterias na microbiota intestinal materna. Com a colonização do TGI, ocorrerá o consumo de oxigênio, alteração do pH, produção de dióxido de carbono e nutrientes que tornam o ambiente favorável para a colonização local por outros filos, especialmente anaeróbios estritos como os Bacteroidetes e Firmicutes. A redução das Proteobacterias ocorrerá por competição e pela presença de oligossacarídeos (especialmente os galactooligossacarídeos: GOS) e imunoglobulina a (IgA) no leite materno.

A composição microbiana no TGI segue um gradiente de proximal para distal, com uma menor para maior concentração e maior frequência de aeróbios para anaeróbios. No estômago ocorre influência do pH, pepsina e amilase, e a concentração microbiana média é de 10^3 Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/mm³. As principais espécies encontradas são os *Lactobacillus*, *Streptococcus* e o *Helicobacter pylori*. As enzimas pancreáticas, os sais de bicarbonatos e os sais biliares modulam a microbiota no duodeno e jejuno, com uma concentração aproximada de 10^3 - 10^4 UFC/mm³ e com predomínio de *Lactobacillus*, *En-*

terococcus, *Streptococcus* e *Actinobactérias*. Esta concentração aumenta expressivamente no íleo, com um equilíbrio do pH (média de 7,3 – 7,7) e a estase fecal proporcionada pela Válvula Ileocecal (VIC), chegando à média de $10^7 - 10^9$ UFC/mm³. Os principais componentes do microbioma ileal são *Enterococos*, *Bacteroidetes*, *Lactobacillus*, *Clostridium* e *Corynobactéria*. No cólon, com íntima relação com a camada de muco produzida, atinge-se a maior concentração da microbiota no corpo humano chegando a $10^{10} - 10^{12}$ UFC/mm³ composta por *Bacteroidetes*, *Provetella*, *Porphyromonas*, *Eubactérias*, *Ruminococcus*, *Lactobacillos*, *Peptostreptococcus* e *Fusobactérias*⁴⁵.

1.6 Funções fisiológicas da microbiota intestinal

Entre as principais funções fisiológicas exercidas pela microbiota, destacam-se as funções protetivas e metabólicas, que serão abordadas separadamente a seguir.

1.6.1 Funções protetivas

A microbiota intestinal confere proteção ao hospedeiro aumentando a resistência contra patógenos invasores e garante uma estrutura e o funcionamento normal do sistema imunológico na mucosa. O papel protetivo principal é físico: a microbiota ocupa as superfícies intestinais criando um estável ecossistema que impede que agentes patogênicos possam colonizar algum segmento ⁴³. Ainda considerando a imunidade de barreira, a microbiota utiliza alimentos não digestíveis (especialmente as fibras) em seu processo de metabolização anaeróbio (utilização de alimentos não digeridos ou pouco digeridos como fonte energética resultando na liberação de produtos nomeados metabólitos), gerando ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e estes são a principal fonte de nutrição das células do endotélio do intestino grosso, fundamentais na manutenção da integridade da barreira mucosa ⁴⁶⁻⁴⁸.

A microbiota exerce uma evidente função de proteção anticarcinogênica especialmente quando relacionamos às espécies produtoras de propionato e butirato (tipos de AGCC). As ações anti-inflamatórias e anticarcinogênicas destas

substâncias parecem ocorrer reduzindo a atividade da histona desacetilase nos colonócitos ^{43,49}. Algumas espécies como *Lactobacillus* e *Bifidobacterias* são capazes de suprimir espécies reativas ao oxigênio, que são relacionadas a inflamação e neoplasias, através da estimulação da atividade da glutathione S-transferase (enzima com capacidade de catalisar a conjugação da forma reduzida de glutathione a substratos xenobióticos para fins de desintoxicação).

1.6.2 Função metabólica da microbiota intestinal

O trato gastrointestinal é capaz de digerir cerca de 85% dos carboidratos e entre 66-95% das proteínas e gorduras consumidas. Do restante, 10-30% serão aproveitados pela microbiota. O tipo de fornecimento energético modula a composição da microbiota assim como está diretamente associado aos metabólitos produzidos. Abordaremos os metabólitos de acordo com o agrupamento alimentar.

1.6.3 Carboidratos e fibras não absorvíveis

Os carboidratos não digestíveis: oligossacarídeos [ex: fruto-oligossacarídeos (FOS), galacto-oligossacarídeos (GOS)], a lignina, polissacarídeos não amiláceos e os amido resistentes (AR) são utilizadas como fonte energética por diversos organismos que possuem capacidade de utilizá-los como fontes de carbono (carboidratos) através de enzimas próprias chamadas de glicosídes. Enquanto os humanos têm a capacidade genômica de codificar somente 17 enzimas capazes de metabolizar 3 glicanos alimentares: amido, sacarose e lactose, uma ampla gama de enzimas bacterianas (atualmente conhecemos 130 glicosídeo-hidrolases, 22 polissacarídeos-liases e 16 carboidratos-esterases) são capazes de utilizar as fibras como fontes energéticas⁵⁰. Dentre os filos predominantes, os Bacteroidetes e Firmicutes são os com maior capacidade de exercer esta função.

A fermentação das fibras alimentares decorrerá em⁵¹⁻⁵⁵:

- a. Liberação de gases: metano, hidrogênio e dióxido de carbono.

- b. Formação de ácidos graxos de cadeia curta: acetato, propionato, butirato (estes três são predominantes), valerato, isovalerato e hexanoato.
- c. Formação de ácidos orgânicos: lactato e succinato.
- d. Formação de álcoois: metanol e etanol.

Os ácidos graxos de cadeia curta são absorvidos no cólon e correspondem a 10% da demanda calórica humana. Eles possuem ações individualizadas na fisiologia:

- Acetato: aproveitado como fonte de energia para os tecidos periféricos e utilizado no fígado na lipogênese e síntese de colesterol.
- Butirato: utilizado pelos colonócitos como fonte energética. Atua na regulação energética estimulando as células enteroendócrinas intestinais a produzir leptina a partir dos adipócitos, incluindo a produção do peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP1). Reduz os efeitos nocivos dos sais biliares e dos fenóis.
- Propionato: é transportado ao fígado onde funcionará como acetato, convertido em acetil-coenzima A na produção de ácidos graxos, corpos cetônicos e colesterol. Na corrente sanguínea o acetato poderá ser utilizado na oxidação em outros tecidos através do ciclo de Krebs.

1.6.4 Proteínas

As proteínas que atingem o intestino grosso serão quebradas por proteases bacterianas principalmente em peptídeos e aminoácidos. A dieta com alto teor de fontes proteicas modulam a composição microbiota. Especialmente uma dieta rica em carne bovina é associada ao aumento da população de *Bacteroides* e *Clostridiuns* e uma redução de algumas espécies de *Bifidobactérias* enquanto uma dieta com maior quantidade de proteína de ervilha ou do soro do leite aumentam a população das *Bifidobactérias* e *Lactobacilos*. Isto é particularmente importante no estudo das DII, pois alguns metabólitos de origem proteica, como o fenol, indol e o p-cresol demonstram potencial em induzir a DII, o câncer color-

retal e a disfunção renal. Porém na proporção adequada, os metabólitos possuem efeitos fisiológicos como o próprio indol, que foi associado a homeostasia da interação hospedeiro-microbioma e do fortalecimento da barreira intestinal⁵⁶.

Os metabólitos de origem proteica podem ser divididos em: compostos neuroativos (óxido nítrico, triptamina, fenetilamina), metabólitos sulfetados, compostos aromáticos (fenol, p-cresol, indol), poliaminas (espermina, espermidina, cadaverina), triglicérides de cadeia curta (isobutirato, 2-metilbutirato, isovalerato) e amônia⁵⁶.

No estudo de Kevin J et al, que avaliou o metabolismo bacteriano das proteínas, observou-se que a disparidade da proporção de proteínas e carboidratos na dieta determina vias catabólicas da microbiota. O catabolismo aumentou a produção de Ácido Gama-Aminobutírico (GABA) por algumas espécies de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Lactococcus lactis*, de noradrenalina por espécies de *Escherichia* e *Bacillus*, de dopamina por *Bacillus*, histamina e serotonina por *Streptococcus*, *Escherichia* e *Enterococcus*, podendo estes produtos do catabolismo interferirem na modulação do eixo intestino-cérebro⁵⁶.

1.6.5 Lipídeos

A dieta rica em lipídeos (DRL) induz disbiose, aumenta a infiltração gordurosa nos tecidos e promove leve ativação inflamatória no tecido adiposo. Estudos experimentais com DRL apontam redução de Bacteroidetes e aumento de Proteobacterias e Firmicutes e estas mudanças parecem aumentar a permeabilidade intestinal, a atividade inflamatória na mucosa além da lipogênese e adipogênese. O aumento do percentual de gordura corporal se mostra inversamente proporcional à abundância de *Akkermansia* (filo Verrucomicrobia) e diretamente proporcional à abundância de *Lactococcus* (filo Firmicutes) e de *Allobaculum* (filo Bacteroidetes)⁴⁵. O tipo de fonte lipídica também altera de forma singular a composição microbiana, como demonstrou HUANG et al. (2013) em seu estudo experimental que subdividiu as fontes de gordura em oriundas do leite, oriundas da banha (estes dois fontes de ácidos graxos saturados) ou oriundas do óleo de cártamo (ácidos graxos poliinsaturados)⁵⁷.

O quadro 3 exemplifica a função principal dos metabólitos bacterianos sobre o intestino e a sua interferência sobre a imunidade, assim como lista os principais agentes metabolizadores.

Quadro 3. Metabólitos produzidos por bactérias e sua ação benéfica à saúde humana.

Metabólitos	Agentes envolvidos	Via de produção	Função
Butirato	<i>Clostridium</i> <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> <i>Coprococcus catus</i> <i>Anaerostipes hadrus</i>	Metabolismo de carboidratos	• ↑ função de barreira intestinal • Modulam a função do macrófago • ↓ a inflamação colônica • ↑ sensibilidade insulínica
Propionato	<i>Blautia obeum</i> <i>Coprococcus catus</i> <i>Roseburia inulinivorans</i> <i>Prevotella copri</i>	Metabolismo de carboidratos	• ↓ a inflamação colônica • ↓ a resposta imune inata ao estímulo microbiano • ↓ inflamação das vias aéreas por alérgenos
Indol	<i>Lactobacillus spp.</i> <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Bacteroides fragilis</i>	Metabolismo do triptofano	• Homeostase microbiota-hospedeiro via IL 22 • ↑ função de barreira intestinal • Modulação do metabolismo humano
Indol-3-aldeído	<i>Lactobacillus spp.</i>	Metabolismo do triptofano	• Homeostase microbiota-hospedeiro via IL 22
Indol-3-propionato	<i>Clostridium sporogenes</i>	Metabolismo do triptofano	• ↑ função de barreira intestinal e homeostasia
10-hidroxi-cis-12-ocatadecato	<i>Lactobacillus spp.</i>	Derivado do ácido linoleico Metabolismo lipídico	• ↑ função de barreira intestinal • ↓ inflamação • ↑ produção de IgA intestinal

IL: Interleucina, Ig: Imunoglobulina. Tabela adaptada de Gomaa EZ⁴³.

1.7 A camada de muco intestinal

A integridade da barreira de muco é essencial para a saúde. A produção reduzida de muco (geralmente por defeitos congênitos ou déficit de substratos) ou a degradação aumentada (relacionada a expositores) aumentam condições inflamatórias locais e a distância, podendo ocorrer doenças como o câncer e as DII. A barreira mucosa é constituída por peptídeos antimicrobianos e imunoglobulinas e é a primeira estrutura que um patógeno necessita vencer para constituir uma infecção. Ela fornece ainda um distanciamento físico entre as células epiteliais e o conteúdo da luz intestinal⁵⁸. A camada de muco do cólon é dividida em duas partes: uma parte externa, solta e outra parte interna, densa, praticamente impenetrável pelas bactérias. Já a camada externa pode ser colonizada por bactérias e utilizada como fonte dietética⁵⁹.

Nos humanos, a camada de muco atinge cerca de 100µm e se renova a cada uma hora (a título de comparação, o epitélio intestinal se renova a cada 4-5 dias). Ela é formada pelas células caliciformes e a camada interna é ainda subdividida em duas denominadas “b1” e “b2”. A camada “b1” deriva das células caliciformes do cólon proximal e é a parte principal, enquanto a camada “b2” é produzida pelas células do cólon distal e permanece adjacente à mucosa, praticamente sem contato com a microbiota local. A ausência de qualquer das partes da camada de muco é suficiente para modificar a microbiota local e induzir colite demonstrando que tem função de barreira e de tolerância à microbiota^{60,61}.

Em condições ambientais em que o hospedeiro ingere baixa quantidade de oligossacarídeos não absorvíveis (especialmente fibras vegetais), a própria camada de muco serve como fonte energética para determinadas espécies bacterianas (glicoproteínas da camada de muco), assim ocorre o aumento da população de bactérias degradadoras do muco reduzindo a espessura da camada, podendo induzir um processo inflamatório⁵⁸.

1.8 Alterações de microbioma e doenças

O microbioma coevolui com seu hospedeiro. Evoluções discretas e que ocorrem em um grande intervalo de tempo promovem uma afinidade hospedeiro-

microbioma, onde as mutações promovem evoluções adaptativas às novas condições ambientais, sendo este um processo de seleção natural da microbiota³⁴. Por outro lado, modificações ambientais rápidas podem gerar “má adaptações”, onde se mostram benéficas em um primeiro momento, porém com consequências ruins a longo prazo, em novas condições ambientais. Este tipo de adaptação abrupta ocorre atualmente em consequência da era e que vivemos (modernização) e dos hábitos que adotamos (urbanização)⁶².

1.9 Correlação entre microbioma e a Doença de Crohn

Estudos mais aprofundados envolvendo a avaliação do microbioma em portadores de DC começaram a ser publicados a partir dos anos 2000⁶³. Embora dificilmente ocorra alternância entre os filos predominantes, pacientes com DC tendem apresentar aumento de microrganismos patogênicos e redução das cepas comensais. Entende-se também que não há um fator primário para a ocorrência da disbiose, ou seja, assim como a disbiose faz parte da gênese multifatorial da DC, a inflamação intestinal promove disbiose e o controle inflamatório tende a melhorar as alterações do microbioma, mas não parece ser capaz de equipara-lo ao de indivíduos saudáveis⁶⁴.

Tentar compreender a correlação entre microbiota e DC em uma visão simplista promove conclusões equivocadas. A análise deve ser realizada de forma ampla e compreendendo as diversas interações que ocorrem entre componentes do hospedeiro (ex: proteínas e genes) e componentes do microbioma (ex: metabólitos e toxinas). Condições de risco como a inflamação endotelial ou transmural ou a barreira vascular prejudicada facilitam a translocação bacteriana ou de seus componentes para outros segmentos intestinais ou até mesmo para sítios extraintestinais, podendo promover e/ou perpetuar a doença inflamatória. O mecanismo de regulação da translocação, assim como do processo inflamatório adjacente ainda é desconhecido⁶⁵. Um exemplo desta complexidade é a interação entre (I) seguimento intestinal inflamado, (II) microbiota local e (III) gordura mesenterial local. A microbiota intestinal parece estimular a inflamação da gordura mesenterial junto ao segmento intestinal adjacente (chamado de gor-

dura rastejante ou “creeping fat” CrF) que são alterações anatômicas macroscópicas produtoras de citocinas pró-inflamatórias ⁶⁶. Quando a ressecção cirúrgica intestinal é instituída, existe menor chance de recorrência pós-operatória caso o segmento do mesentério adjacente seja ressecado também ^{65,67}. Por outro lado, este complexo de gordura parece funcionar como barreira à translocação microbiana e delimitador do segmento intestinal envolvido pela DC. Em um estudo de avaliação desta interação, observou-se uma abundância do *Clostridium innocuum* na CrF causando um efeito pró-fibrótico e pró-inflamatório por estar associado à ativação imune, com destaque aos macrófagos M2 com potencial de remodelamento tecidual e interferindo diretamente no fenótipo da DC neste grupo avaliado. As recorrências em outros sítios poderiam estar associada a disseminação daquela microbiota local ^{65,68,69}.

Devido a variedade fenotípica da Doença de Crohn e principalmente referindo-se à localização, não se pode afirmar que todos os portadores de DC têm alterações da microbiota de forma semelhante. A composição microbiana em indivíduos saudáveis ou não se altera ao longo do tubo digestivo e, embora exista disbiose em todos os sítios do TGI nos portadores de DII, as alterações são mais acentuadas nos locais inflamados. Esta afirmação nos alerta sobre a adequação metodológica necessária para o estudo da microbiota em cada segmento acometido ⁷⁰. A presença da estase fecal proporcionada pela válvula ileocecal promove um aumento da população microbiana local, fato que também ocorre no ceco devido a concentração microbiana no apêndice cecal. A DC de acometimento ileal ou ileocecal (classificação L1 de Montreal) é o fenótipo de maior alteração de composição microbiana quando comparada a indivíduos saudáveis, seguidas pela doença colônica (classificação L2 de Montreal) ⁸. Portanto, a avaliação da microbiota intestinal obtida pela análise de fezes é válida nestes dois fenótipos, enquanto outros sítios da doença mereçam outras técnicas de avaliação, como por amostras teciduais ou aspiração de conteúdo luminal.

Um estudo prospectivo avaliou a composição microbiana de 3483 parentes de primeiro grau de portadores de DC, saudáveis, visando identificar alterações precedentes ao diagnóstico da DC. Observou-se alterações da composição bacteriana aproximadamente 5 anos antes do diagnóstico de novos casos de DC. Destaca-se o aumento da abundância de *Ruminococcus torques* e *Blautia*

que são espécies degradadoras de mucina ^{71,72}. Por outro lado, notou-se a redução do gênero *Roseburia*, que é associada ao aumento de células T regulatórias e redução da produção de interleucina 17⁷³. Naqueles que não desenvolveram DC, notou-se o papel protetor da *F. prausnitzii*, com redução da abundância nos que desenvolveram a doença. Esta bactéria já vem sendo apontada por sua ação anti-inflamatória e a coorte estudada demonstrou um declínio da abundância da espécie nos anos que antecedem o diagnóstico⁷⁴. A figura 4 exemplifica algumas espécies associadas às DII.

Portadores de DC apresentam maior número de bactérias associadas à superfície da mucosa com maior potencial de adesão e/ou invasão quando comparados aos indivíduos saudáveis⁶⁴.

Muitos estudos buscam encontrar evidências de que terapias baseadas em probióticos ou transplante de microbiota fecal (TMF) possam ser eficazes no tratamento da DC, entretanto, a maioria dos estudos são pequenas amostras em populações muito selecionadas com resultados singelos. Embora existam poucas indicações deste tipo de tratamento em algumas formas de Retocolite Ulcerativa e até mesmo nas *bolsites* (inflamação da bolsa ileal utilizada para a reconstrução do trânsito de portadores de RCU submetidos a colectomia total), não existem evidências da efetividade desta modalidade terapêutica na DC (exceto pelo tratamento da infecção refratária por *Clostridioides difficile* com TMF)⁷⁵.

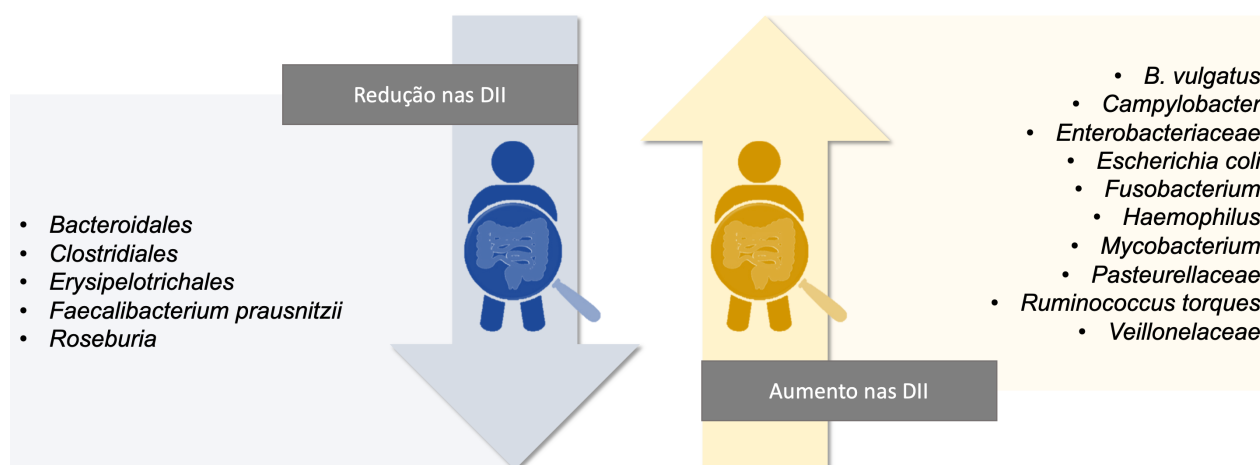


Figura 4. Variações comuns na diversidade bacteriana em portadores de DII^{71,72,74-77}.

1.10 Microbioma, genoma e demais interatomas

A investigação de associação genética com as DII é um desafio devido a heterogeneidade tanto metodológica quanto dos resultados das pesquisas⁷⁸. De acordo com o maior estudo genético sistematizado para avaliação de alterações genéticas de risco para doenças imunomediadas, existem 206 locis de risco para as Doenças Inflamatórias Intestinais. De forma comparativa, o mesmo estudo apontou somente 20 e 48 locis de risco para Colangite Esclerosante Primária (CEP) e Espondilite Anquilosante, respectivamente ⁷⁸. De fato, no que diz respeito à gênese das DII, as evidências apontam para as interações das modificações genéticas com outros fatores e não somente às alterações genômicas isoladas, sendo que estas representam menos de 15% da herdabilidade da doença⁷⁹.

Muitos dos genes de suscetibilidade às DII identificados são relacionados à microbiota intestinal, dentre os mais conhecidos estão o NOD2 (*intracellular pathogen molecular sensor nucleotide binding oligomerization domain 2*) e o ATG16L1 (*autophagy gene recombinant autophagy related protein 16 Like Protein 1*) ⁷⁸. Considerando-se esta interação amplia-se o cenário de interações para^{78,80}:

- a- Interação de componentes celular e não celulares:
 - Microbiota *versus* endotélio e/ou imunidade celular.
- b- Interação de componentes externos:
 - Exposição solar, tabagismo, drogas *versus* ação sobre genes e microbioma (exposoma).
 - Ativação e decodificação de genes (transcriptoma).
- b- Interação metabólica:
 - Metabólitos *versus* ação direta sobre hospedeiro.
 - Metabólitos *versus* ação sobre genes (metagenômica).
- c- Interação nutricional:

- Dieta consumida *versus* microbioma.
- Metabólitos da dieta específica *versus* ação sobre genes (nutrigenômica).

d- Interação proteica:

- Citocinas e metabólitos x síntese proteica (proteômica).

1.11 Meios de avaliação do microbioma

A avaliação da microbiota através de amostras fecais é a técnica mais comumente utilizada, no entanto, ela possui algumas limitações ⁶⁴. É preciso interpretar os dados de acordo com a localização da doença entendendo que:

I- A DC ileocecal ou ileocolônica tem classicamente maior alteração da microbiota que a doença colônica ⁶⁴.

II- Na DC de segmentos proximais (ileal extensa ou DC proximal / L1 ou L4 de Montreal), a técnica de avaliação de microbiota por componentes fecais não se mostra realista, pois é afetada pela enorme carga microbiana de um cólon não envolvido pela DC. Neste contexto, técnicas de avaliação em fragmentos de mucosa normal seriam melhor indicadas ⁷⁰.

O método ITS amplicon (Internal Transcribed Spacer amplicon) se destaca por sua alta especificidade e resolução taxonômica, e baseia na amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (RCP) de um segmento de DNA específico, presente no DNA nuclear ribossômico. O espaçador transcrito interno (ITS) é altamente variável entre diferentes espécies, tornando-o um alvo útil para identificar e diferenciar procariotas entre si (como bactérias e arqueas) e entre eucariotas (como fungos e protozoários)^{81,81,82}.

As técnicas mais utilizadas na avaliação (leitura) da microbiota são: *16 S rRNA gene sequence*, *Shotgun metagenomics* e *Long-read metagenomics*.

A sequenciação do gene rRNA 16S, um método metagenômico clássico e mais utilizado, concentrando-se no sequenciamento da região variável do gene rRNA 16S, presente em todos os ribossomos, responsáveis pela síntese de proteínas em todas as células. A região variável do gene rRNA 16S apresenta alta diversidade entre diferentes espécies de microrganismos, tornando-a ideal para

a identificação e classificação desses organismos. A sequenciação do gene rRNA 16S é um método relativamente barato em comparação com outras técnicas metagenômica. Como desvantagens em relação aos demais métodos, o sequenciamento do rRNA 16S fornece informações limitadas sobre a função da comunidade microbiana, restringindo-se à identificação e classificação dos microrganismos e pode não identificar todos os microrganismos em uma comunidade, especialmente aqueles raros ou com sequências de rRNA 16S altamente divergentes^{83,84}.

A metagenômica Shotgun é um método poderoso na investigação da diversidade e função de comunidades microbianas, oferece uma visão abrangente do material genético de todos os microrganismos presentes em uma amostra. Essa técnica realiza o sequenciamento aleatório de todo o DNA presente na amostra, sem a necessidade de primers específicos para genes ou regiões genômicas conhecidas. As leituras de sequenciamento são montadas em contigs (sequências longas de DNA) e analisadas usando ferramentas bioinformáticas para identificar genes, funções e taxonomia dos microrganismos presentes na amostra. Como desvantagens, tem custo elevado, menor resolução para detecção de microrganismos (quando comparado ao sequenciamento 16S rRNA) e necessita análise complexa devido a grande quantidade de dados gerados⁸⁵.

A avaliação metagenômica de leitura longa (Long-read metagenomics) permite a montagem de genomas microbianos completos com alta resolução e precisão. Ao contrário das técnicas tradicionais de sequenciamento de curto comprimento (short-read), que geram leituras de DNA mais curtas (até 500 bp), a metagenômica de leitura longa produz leituras de DNA muito mais longas (até 100 kb), possibilitando a montagem de genomas microbianos completos, incluindo regiões repetitivas e estruturas genômicas complexas. É a técnica de maior resolução para a identificação de variantes genéticas e a análise de estruturas genômicas, permite a detecção de novos genes e elementos regulatórios que podem ser perdidos em técnicas de sequenciamento de curto comprimento e facilita a caracterização de microrganismos raros ou de difícil cultivo, que são frequentemente sub-representados em técnicas de sequenciamento de curto comprimento. Esta técnica tem custo elevado, tempo de realização longo e é dependente de maior estrutura laboratorial e de bioinformática⁸⁶.

2. Justificativa

As DII estão em ascensão no Brasil e deixaram de ser consideradas doenças raras desde a segunda década dos anos 2000. Assim como nos países norte americanos, europeus e alguns da Oceania, deverá ocorrer um aumento considerável do número de portadores de DII e posteriormente assumiremos um elevado platô de pacientes, pois trata-se de doença de baixa mortalidade, porém de alta morbidade, elevado consumo de recursos financeiros e de alta demanda de profissionais de saúde.

Existe grande investimento privado em pesquisas para o tratamento das DII, comprovados pelo aumento exponencial do número de terapias biológicas e pequenas moléculas desenvolvidas nas últimas duas décadas, mas esta não é a realidade para pesquisas relacionadas ao entendimento da gênese da doença e das interações entre ambiente (exposoma), genética (genoma), microbiota (microbioma) e ativação imunológica (imunoma) que a ocasiona.

A microbiota intestinal é um dos grandes pilares de interação para a ocorrência das DII e existe um elevado número de publicações relacionando a DC (assim como a RCU) à microbiota, todavia a maioria das publicações ocorrem em populações distintas, com hábitos diferentes da população brasileira. O Brasil ainda não se destaca nesse campo da ciência. Com esta premissa, em busca de maior esclarecimento sobre a microbiota intestinal dos portadores de DC em brasileiros, e visando contribuir com dados à comunidade científica internacional, justificamos este estudo.

3. Objetivos

3.1 Objetivo principal:

a- Descrever a microbiota intestinal de portadores de Doença de Crohn ileocecal ou ileocolônica antes e após a terapia com Infliximabe e Azatioprina, sem intervenção nutricional.

3.2 Objetivos secundários:

a- Comparar a atividade da Doença de Crohn, a resposta terapêutica à Azatioprina e o Infliximabe e os hábitos de vida dos pacientes com a composição microbiana.

b- Desenvolver um protocolo para pesquisa da microbiota intestinal em portadores de Doenças Inflamatórias Intestinais.

4. Metodologia

4.1 Pesquisa de Pacientes

Foram selecionados pacientes portadores de Doença de Crohn atendidos no ambulatório de Doenças Inflamatórias Intestinais da disciplina de Proctologia entre os anos de 2020 e 2022 que tinham a doença acometendo a região ileocecal ou ileocolônica, sem uso prévio de terapia biológica, com indicação de terapia com Infliximabe.

4.2 Critérios de Inclusão e Exclusão

4.2.1 Inclusão:

- Portadores de Doença de Crohn maiores que 17 anos: classificação A2 ou A3 de Montreal¹³.
- Doença de Crohn L1 ou L3 conforme classificação de Montreal¹³.
- Ausência de tratamento prévio com terapia biológica ou com pequenas moléculas.
- Indicação terapêutica de Infliximabe e Azatioprina.
- Menos de 2 anos de diagnóstico até a prescrição do Infliximabe.
- Doença de Crohn moderada a grave conforme o Índice de Atividade de Doença de Crohn²⁰.
- Ter capacidade de entender a pesquisa, ler e assinar de forma autônoma o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo 1).

4.2.2 Exclusão:

- Doença de Crohn L2 ou L4 conforme classificação de Montreal¹³.
- Ausência de acometimento do ceco.
- Ter sido submetido à apendicectomia.
- Tabagismo nos últimos dois anos⁸⁷.
- Troca da referência de Infliximabe (Remicade – Biomanguinhos®) por Infliximabe biossimilar durante o estudo.

- Contraindicação ao uso de Infliximabe ou Azatioprina.

4.3 Ocorrências inesperadas.

O projeto deste doutorado foi submetido à pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas em 08 de janeiro de 2021, porém o projeto original foi impactado pela pandemia do SARS-COV-2 declarada em fevereiro de 2020. Durante este período ocorreu a determinação de restrição do atendimento ambulatorial e o bloqueio de abertura de novos prontuários não urgentes, o que interferiu no número de pacientes inicialmente estimado para a pesquisa.

No ano de 2020 ocorreu o início da substituição do Infliximabe Biomanquinhos – Remicade®³² pelo Infliximabe Celtrion – Remsima®⁸⁸. De forma a preservar a integridade da pesquisa, desconhecendo o impacto da troca da medicação sobre a doença e sobre o microbioma, optamos por encerrar o estudo com menor número de pacientes mantendo a população estudada homogênea.

4.4 Variáveis Analisadas

4.4.1 Avaliação da resposta terapêutica

A atividade clínica foi determinada pelo Índice de Atividade de Doença de Crohn⁸⁹. Considerou-se resposta clínica a redução de 100 pontos no IADC enquanto remissão clínica quando o resultado do IADC foi menor ou igual a 150²⁰.

A atividade endoscópica foi determinada pelo *Simplified Endoscopic Activity Score* (SES-CD)⁹⁰. Reduções do SES-CD maior ou igual a 50% da pontuação inicial foram consideradas respostas endoscópicas e ausência de ulcerações como cicatrização da mucosa²⁰. Os exames endoscópicos foram realizados no Gastrocentro da Unicamp.

Pacientes que não apresentaram resposta terapêutica foram considerados não respondedores primários. Pacientes que responderam a terapia de in-

dução, mas apresentaram recaída dos sintomas foram considerados não respondedores secundários²⁰. Pacientes com perda de resposta primária ou secundária com necessidade de troca terapêutica continuaram sendo avaliados.

Utilizou-se os biomarcadores de atividade inflamatória sistêmica Proteína C Reativa (PCR) e Velocidade de Hemossedimentação (VHS) como parâmetros de avaliação de melhora laboratorial (valores de referência estão citados adiante).

4.4.2 Avaliação do hábito alimentar

O hábito alimentar foi investigado através do consumo por porções semanais dos grandes grupos alimentares baseados nas recomendações alimentares do Ministério da Saúde para a população brasileira⁹¹:

- Leite e Derivados: um copo de leite ou uma porção de derivados do leite como iogurtes e queijos. Não foram consideradas nenhuma bebida ou comida fabricadas com extratos vegetais.

- Outras proteínas animais: porções de carnes preparadas *in natura* para o consumo ou ovos.

- Verduras: porções de vegetais folhosos como alface, couve e rúcula.

- Leguminosas: porções deste grupo representado principalmente pelos feijões, ervilhas, grão de bico e lentilha.

- Legumes e tubérculos: porções dos vegetais como abóbora, tomate, mandioca, batata, dentre outros.

- Frutas: qualquer porção de fruta *in natura* ou preparada pelo próprio paciente ou pela sua família antes da ingestão.

- Carnes processadas: são alimentos baseados em proteínas animais (carnes) preparados pela indústria junto à aditivos, corantes, realçadores de sabor, dentre outros como bifes para hamburguer, presunto, frangos empanados etc.

- Ultraprocessados: devido a amplitude destes alimentos e às divergências na aplicação deste termo a todos os produtos, considerou-se alimentos preparados pela indústria junto aos aditivos químicos e vendidos enlatados ou empacotados.

- Doces: doces caseiros, como doces de frutas cristalizadas ou doces com menor ou maior processamento (como chocolates e mousses congelados, respectivamente).

- Frituras: considerou-se o preparo de imersão completa do alimento em óleo.

4.4.3 Avaliação dos hábitos de vida

A atividade física foi considerada quando o paciente praticava qualquer atividade física por tempo maior que vinte minutos por pelo menos três vezes por semana⁹².

O tabagismo foi avaliado em tabagismo atual, antigos fumantes (mais de seis meses sem fumar) ou não fumantes (menos que 100 cigarros fumados ao longo da vida) e o tempo (em anos) sem fumar foi investigado⁹³.

Foram calculadas a média e mediana de horas de sono por dia, no último mês, antes e após a intervenção terapêutica.

4.4.4 Avaliação antropométrica

A avaliação do peso corpóreo dos pacientes foi realizada pelo Índice de Massa Corporal (IMC) ($\text{peso}/\text{altura}^2$) na data da prescrição do Infliximabe. O status físico foi classificado em⁹⁴:

- Baixo peso grau 3: $\text{IMC} < 16 \text{Kg/m}^2$
- Baixo peso grau 2: $\text{IMC } 16\text{-}16.00 \text{Kg/m}^2$
- Baixo peso grau 1: $\text{IMC } 17\text{-}18.49 \text{Kg/m}^2$
- Peso normal: $\text{IMC } 18.5 - 24.9 \text{Kg/m}^2$
- Sobrepeso/obesidade grau 1: $\text{IMC } 25\text{-}29.99 \text{Kg/m}^2$
- Obesidade grau 2: $\text{IMC } 30\text{-}39 \text{Kg/m}^2$
- Obesidade grau 3: $\text{IMC} > 39 \text{Kg/m}^2$

4.4.5 Avaliação laboratorial

Análises laboratoriais foram coletadas previamente à infusão do Infliximabe e após 4 meses de terapia com Infliximabe:

- Hemoglobina
 - Valor de Referência - sexo masculino: 13,5 – 18g/dL
 - Valor de Referência - sexo feminino: 12 – 16g/dL
 - Método: contagem de glóbulos automatizada.

- Hematócrito
 - Valor de Referência - sexo masculino: 40 – 54%
 - Valor de Referência - sexo feminino: 36 – 47%
 - Método: contagem de glóbulos automatizada.

- Leucograma
 - Valor de Referência: 5000 – 10000/mm³
 - Método: contagem de glóbulos automatizada / contagem diferencial microscópica.

- Dosagem de plaquetas
 - Valor de Referência: 150000 – 400000/mm³
 - Método: contagem de glóbulos automatizada.

- Albumina
 - Valor de Referência: 3,5-5,2g/dL
 - Método: colorimétrico / Verde de Bromocresol.

- Pré-albumina (Transtiretina)
 - Valor de Referência: 20-40mg/dL
 - Método: Nefelometria.

- Proteína C Reativa (PCR)
 - Valor de Referência: <0,5mg/dL
 - Método: ultrassensível.

- Velocidade de Hemossedimentação (VHS)

- Valor de Referência - sexo masculino: <10mm/h
 - Valor de Referência - sexo feminino: <14mm/h
 - Método: Fotometria e Capilaridade.
- Ferro
 - Valor de referência: 70-180 ug/dL
 - Método: colorimétrico
- Ferritina
 - Valor de referência – sexo masculino: 30-400ng/mL
 - Valor de referência – sexo feminino: 13-150ng/mL
 - Método: eletroquimioluminescencia
- Vitamina B12
 - Valor de Referência: 197-771pg/mL
 - Método: eletroquimioluminescencia
- Ácido Fólico
 - Valor de Referência: 3,90-14,91ng/mL
 - Método: eletroquimioluminescencia
- Colesterol Total
 - Valor de Referência: 0-190mg/dL
 - Método: Enzimático Colorimétrico
- Colesterol HDL
 - Valor de Referência:
 - Desejável: >40mg/dL
 - Método: Enzimático Colorimétrico
- Colesterol LDL
 - Valor de Referência conforme risco cardiovascular:
 - Muito alto: <50mg/dL
 - Alto: <70mg/dL
 - Intermediário: <100mg/dL

- Baixo: <130mg/dL
 - Método: Enzimático Colorimétrico
- Triglicerídeos
 - Valor de Referência: <150mg/dL
 - Método: Enzimático Colorimétrico
- Glicose
 - Valor de Referência: 74-99mg/dL
 - Método: Enzimático Hexoquinase
- Hemoglobina Glicada
 - Valor de Referência: 4,0-5,6%
 - Método: Cromatografia Líquida de Alta Performance

4.5 Avaliação da microbiota intestinal

A coleta de fezes foi realizada em dois momentos sendo a comparação da composição microbiana antes da terapia com Infliximabe e 4 meses após a primeira infusão de Infliximabe. A primeira amostra fecal correspondeu ao controle do próprio paciente quando comparada a sua avaliação subsequente. O uso de antibióticos não foi fator de exclusão do estudo, mas a coleta das amostras fecais foi realizada com pelo menos 30 dias sem uso de antibióticos.

Períodos de coleta de fezes:

1. Entre o período de prescrição do Infliximabe e a data da infusão.
2. Após 4 meses de uso de Infliximabe.

Utilizou-se o conjunto comercial DNA/RNA Shield® que é utilizado tanto quanto meio de transporte quanto armazenamento de DNA ou RNA validado para diferentes amostras biológicas (sangue, fezes, saliva, ambientais, tecido, insetos e urinas). O ácido nucleico armazenado nesta solução pode ser isolado

sem necessidade de precipitação ou remoção de reagentes. A estabilidade do RNA é garantida em até 1 mês e do DNA em até 2 anos em temperatura ambiente (4°C a 25°C) e quando em temperatura menor ou igual a -20°C, a estabilidade é indefinida (testes ultrapassam 10 anos). Até quatro ciclos de descongelamentos podem ser realizados sem perder a qualidade do material. Todos os pacientes coletaram as amostras fecais dentro do Gastrocentro, com um Kit de captação fornecidos pela pesquisa. As amostras fecais eram imediatamente transferidas para o recipiente contendo a solução DNA/RNA Shield® e armazenado em geladeira com temperatura de 5°C por período máximo de 12 horas. Posteriormente as amostras foram transportadas ao Laboratório LICRI onde permaneceram congeladas a -70°C até a data de análise. Somente um ciclo de descongelamento foi realizado. Desta forma utilizamos tanto a inibição de enzimas que degradam o DNA/RNA (nucleases) quanto a baixa temperatura para preservar o conteúdo genético da amostra⁹⁵.

a- Análise da microbiota por sequenciamento do gene 16 rRNA

a.I- Extração do DNA Bacteriano

O DNA total da microbiota intestinal foi extraído com o kit DNA/RNA Shield Fecal Collection Tube (Zymo Research, Estados Unidos da América).

a.II- Preparo das Bibliotecas

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

Quadro 4. Sequência de primers para região V3/V4 do gene 16S

Região	Sequência 5' - 3'
V3 - 341	<i>TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG</i>
V4 - 785	<i>GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC</i>

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 respectivamente⁹⁶.

O ciclo de amplificação utilizado foi:

95C – 3 min

25 ciclos de:

95C – 30s

55C – 30 s

72C – 30s

72C – 5 min

Após a etapa de amplificação 1 ul do produto da Reação em Cadeia da Polimerase (RCP) foi analisado no equipamento *Bioanalyzer* utilizando chip específico para DNA (Bioanalyzer DNA 1000 chip) o que possibilitou verificar sua concentração e seu o tamanho (figura 4).

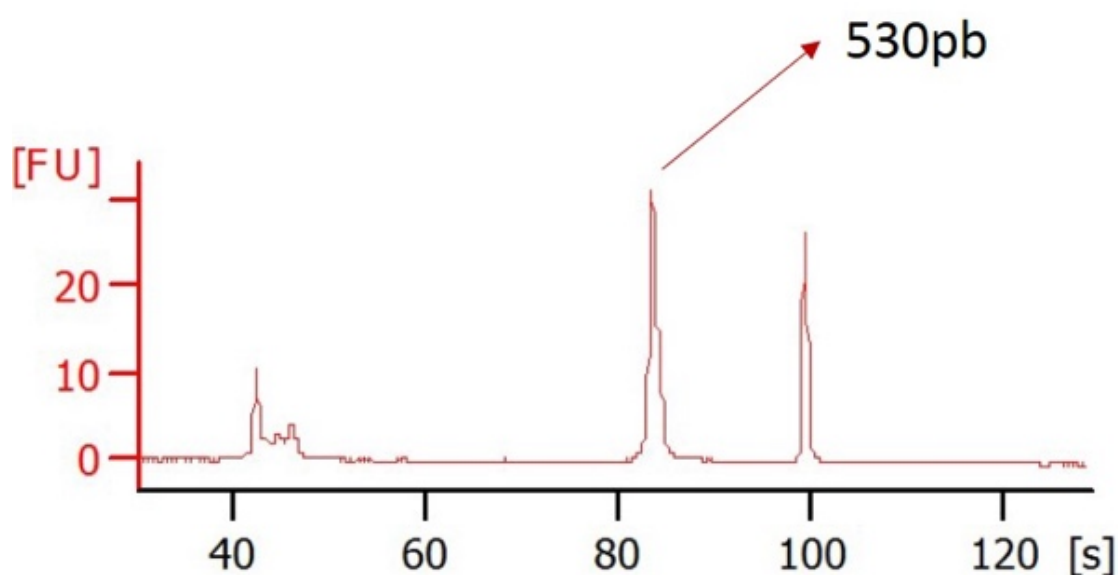


Figura 4. Eletroferograma gerado pelo equipamento Bioanalyzer após a RCP ⁹⁶.

c- Purificação

Os fragmentos da RCP serão purificados utilizando-se beads magnéticos com a finalidade de eliminar primers livres na reação.

c.I- Index PCR

Nesta etapa foram ligados aos fragmentos da RCP a duas sequencias de adaptadores (uma em cada extremidade do fragmento). A estratégia de indexação dupla usa dois *Index* (sequência com 8 bases), o *Index 1* (i7) adjacentes à

sequência P7, e *Index* 2 (i5) adjacentes à sequência de P5. Uma dupla indexação adiciona um índice exclusivo 1 (i7) e outro índice 2 (i5) para cada amostra. São ao todo 8 i5 e 12 i7 e cada amostra recebe uma combinação de *Index* única a qual permitirá identificar a amostra no final do sequenciamento (Figura 5).

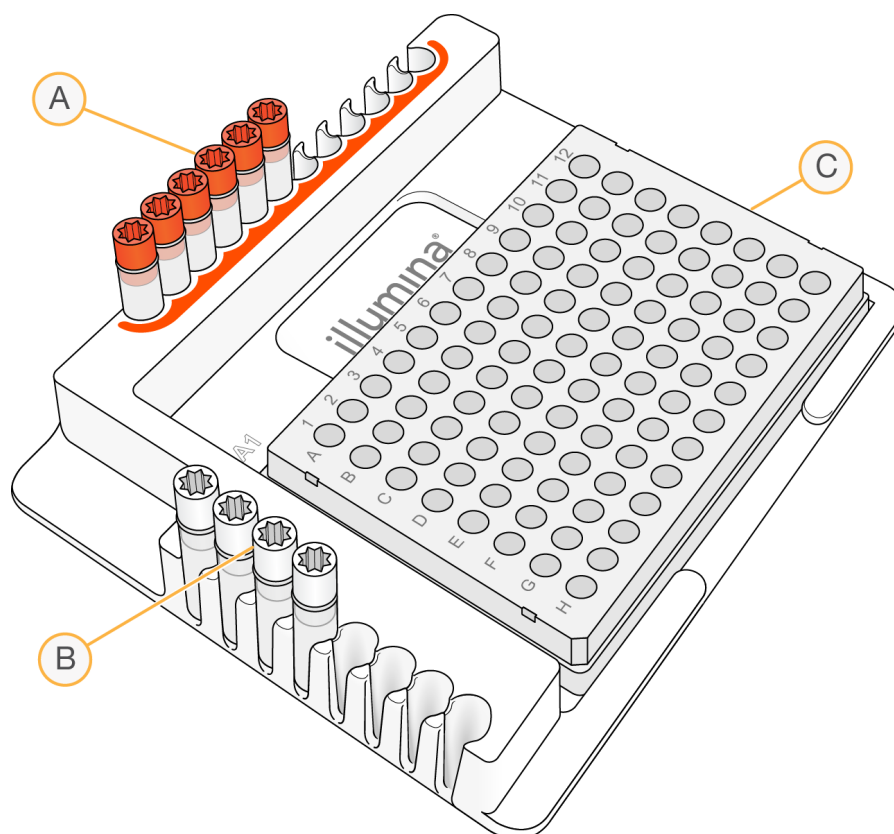


Figura 5. Organização dos *Index* 1 e 2: *Index* 7 (tampa laranja) verticalmente (1-12). *Index* 5 (tampa branca) verticalmente (A-H) ⁹⁶.

Para a adição dos *Index* foi realizada uma RCP utilizando 5 uL da RCP anterior (primers para 16S e adaptadores), 5 ul do *Index* 5/7 e 25 ul do pré-mix 2x KAPA HIFI hotStart em um volume total de 50 uL e seguindo o ciclo para a RCP:

95°C – 3 min

8 ciclos de:

95°C – 30seg

55°C – 30seg

72°C – 30seg

72°C – 5 min

Após a RCP os fragmentos foram novamente purificados e posteriormente quantificadas em um fluorímetro (Qubit® 2.0 Fluorometer, Life Technologies) que permite a quantificação de DNA, RNA e proteínas utilizando corantes fluorescentes. Estes corantes são específicos para cada tipo de biomolécula, mesmo em baixas concentrações, conferindo a esta metodologia uma alta especificidade e sensibilidade.

Uma vez quantificado as amostras foram diluídas para uma concentração de 4 nM. Como as amostras possuem os *index* ligados aos seus fragmentos foi feito um pool com 5uL de cada amostra diluída e este foi utilizado para o sequenciamento ⁹⁶.

d- Análise de bioinformática.

A composição taxonômica das comunidades bacterianas foi 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 foram realizadas segundo instruções do fabricante (Illumina, San Diego, CA, USA) e seguiram o mesmo fluxo descrito por Caporaso et al, 2012 ⁹⁷. Usando leituras pareadas de 300 bp e reagentes MiSeq v3, as extremidades de cada leitura são sobrepostas para gerar leituras completas de alta qualidade da região V3 e V4. São geradas mais que 100.000 leituras por amostra, comumente reconhecidas como suficientes para pesquisas metagenômicas. As sequências fastq foram analisadas analisados utilizando-se o software Illumina 16S Metagenomics que executa a classificação taxonômica da região v3/v4 do gene 16S rRNA por meio do banco de dados DADA2 ^{98,99}. As análises pareadas de abundância foi feita pelo software IBM SPSS® 20.0 (Wilcoxon Signed Ranks Test). A análise da alfa diversidade foi feita pelo software EZbioCloud ¹⁰⁰.

4.6 Análise Estatística

Os dados foram coletados e armazenados em uma planilha do Microsoft Excel® e IBM SPSS®.

Para as variáveis quantitativas com distribuição normal, apresentamos os resultados em média $\pm$ desvio padrão (DP) e o teste t de *Student* foi usado para

a comparação de amostra em pares como também para amostras independentes.

Para variáveis com distribuições não-normais, os valores foram apresentados com mediana (intervalo interquartil [IQR]) e o teste U de Mann-Whitney foi usado para a comparação de duas amostras independentes e o teste Wilcoxon para amostras pareadas. As variáveis qualitativas foram apresentadas em percentagem, e o teste Qui-quadrado foi usado para a comparação de duas proporções (de amostras independentes). O teste exato de Fisher foi usado para um pequeno número de frequências esperadas (quando o número total de casos foi menor que 20), para as quais o teste Qui-quadrado não é apropriado.

Para a avaliação da diversidade bacteriana utilizamos o Índice de Simpson, que é uma medida de diversidade que leva em consideração o número de espécies presentes e a abundância relativa de cada espécie. À medida que a riqueza e a uniformidade das espécies aumentam, a diversidade também aumenta. O valor de D varia entre 0 e 1. Utilizamos também o Índice de Shannon-Weiner que é calculado tomando o número de cada espécie, a proporção de cada espécie em relação ao número total de indivíduos e somando a proporção vezes o logaritmo natural da proporção de cada espécie. Tem seu valor semelhante ao Índice de Simpson, porém com a vantagem de levar em consideração as espécies dominantes.

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%. Foi utilizado os programas Microsoft Excel® versão 2023 e IBM SPSS® versão 21 para elaboração do banco de dados, análise estatística e o programa Microsoft Excel® e PRISMA® para elaboração dos gráficos.

4.7 Formulação do Protocolo para Avaliação da Microbiota Intestinal em Portadores de DII

O protocolo foi formulado com base no Guia do Ministério da Saúde para Formulação de Protocolos Terapêuticos e Diretrizes Clínicas, versão publicada em 2014¹⁰¹.

5. Aspectos Éticos

O projeto deste estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, com o número 34826220.4.0000.5404.

Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo 1).

6. Resultados

Esta tese foi constituída em 3 etapas: (1) formulação do projeto de pesquisa; (2) aplicação do estudo piloto em portadores de Doença de Crohn e (3) formulação do protocolo para avaliação de bactérias em portadores de Doenças Inflamatórias Intestinais. Os resultados apresentarão os dados do estudo piloto em portadores de DC. A proposta de protocolo para avaliação da composição de bactérias na microbiota intestinal em portadores de Doenças Inflamatórias Intestinais atendidos nos ambulatórios especializados da Unicamp pelas disciplinas de coloproctologia, gastroenterologia e gastroenterologia pediátrica está detalhada no Anexo 6.

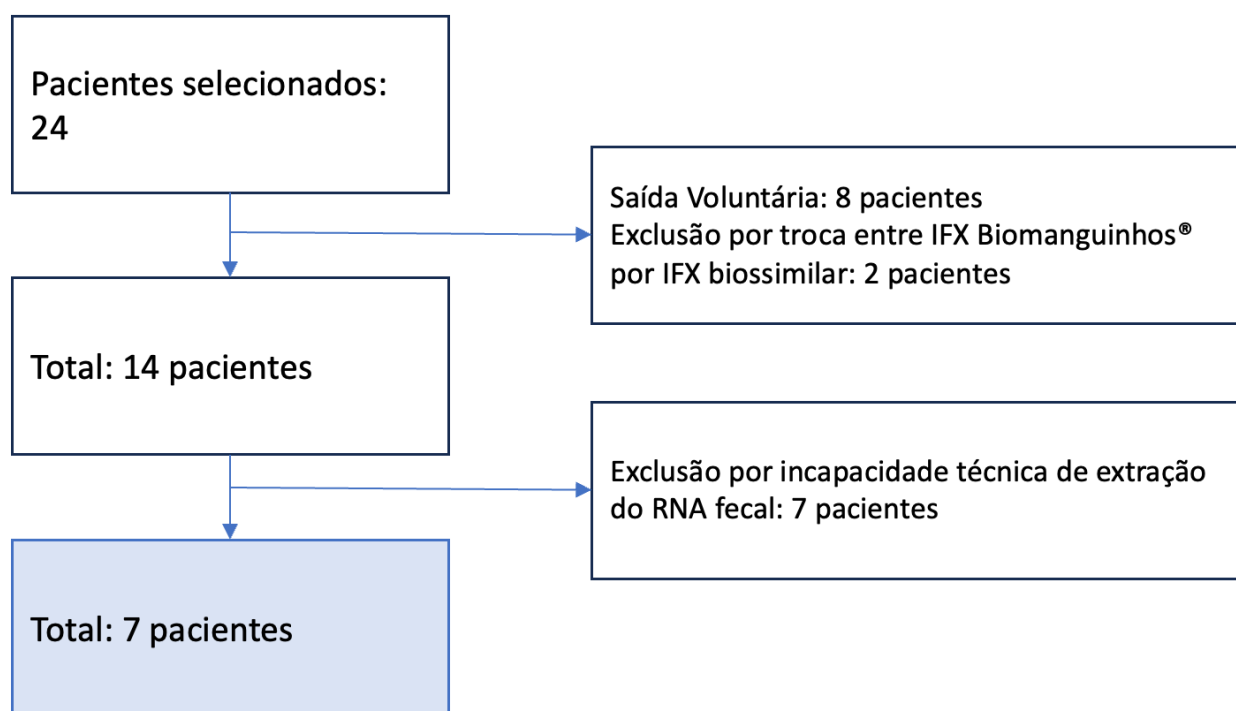


Figura 6. Fluxograma da captação de pacientes e amostra final.

6.1 Apresentação da coorte.

Foram recrutados 24 pacientes entre as datas de 01 de fevereiro de 2021 a 30 de junho de 2022. Todos os pacientes eram portadores de Doença de Crohn

em atividade clínica moderada a grave conforme o Índice de Atividade de Doença de Crohn⁸⁹. A maior parte dos pacientes não concluiu o estudo sendo que o desejo do paciente em não continuar em avaliação (n= 8) e a incapacidade da extração de ácido nucleico para avaliação da composição microbiana devido a consistência fecal líquida e grande diluição do conteúdo de ácido nucleico no conservante e na água fecal (n= 7) foram as principais causas de perda de seguimento (Figura 6). Dois pacientes iniciaram a terapia com Infliximabe-Bio-Man-guinhos® (registro no Brasil: 110630142, produzido pela Fundação Oswaldo Cruz) e a medicação foi substituída pelo Infliximabe-Remsima® (registro no Brasil: 192160001, produzido pela Celltrion Healthcare) conforme distribuição pela Secretaria de Estado de Saúde do Estado de São Paulo seguindo as diretrizes de fornecimento de imunobiológicos instituídas pelo governo federal¹⁰². Para preservar a homogeneidade da coorte, optamos pela exclusão destes pacientes.

Tabela 1. Características fenotípicas da Doença de Crohn

	n= 7	%
Idade		
• 17 – 40 anos	5	71
• > 40 anos	2	28
Localização		
• <i>Ileocecal</i>	2	28
• <i>Ileocolônica</i>	5	71
Comportamento		
• <i>Não estenosante, não penetrante</i>	4	57
• <i>Estenosante</i>	1	14
• <i>Penetrante</i>	2	28
Doença Perianal	2	28
Manifestações Extraintestinais	3	42
• <i>Artralgia</i>	3	42
• <i>Úlceras Orais</i>	1	14

A coorte foi formada por 7 pacientes, sendo 4 homens e 3 mulheres, com mediana de idade no início do estudo (primeira consulta) de 32 anos (22,5 – 47; IQR= 24,5) e mediana de idade ao diagnóstico da DC de 30 anos (19,5 – 43,5; IQR= 24). Considerando-se o fenótipo da DC conforme proposto na Classificação de Montreal (Tabela 1)¹³, 71,4% (n= 5) tiveram o diagnóstico entre 18 e 40

anos de idade e 28,4% (n= 2) dos pacientes tinham mais de quarenta anos ao diagnóstico (classificação A2 e A3 de Montreal, respectivamente). A localização ileocolônica (L3 de Montreal) prevaleceu em 71% da coorte, seguida de 28% dos pacientes com doença ileocecal (L1 de Montreal). A maioria (57%) apresentava comportamento não estenosante, não penetrante e 28% tinham doença perianal. 42% dos pacientes apresentavam uma ou mais manifestações extraintestinais (Tabela 2).

Tabela 2. Dados gerais dos pacientes.

	n	%
Cirurgias Não Relacionadas a DII	2 (pacientes)	28
• Cesariana	• 1	• 14
• Hernioplastia inguinal	• 1	• 14
Cirurgias Relacionadas a DII	3 (pacientes)	42
• Drenagem de abscesso abdominal	• 1	• 14
• Fistulotomias	• 2	• 28
Doenças associadas	4 (pacientes)	57
• Depressão	• 1	• 14
• Discinesia broncociliar	• 1	• 14
• HAS	• 1	• 14
• Síndrome Dispéptica	• 1	• 14
Medicamentos de uso no último mês (não associados à DC)	5 (pacientes)	71,42
• Hidroclorotiazida	• 3	• 42
• Omeprazol	• 1	• 14
• Prednisona	• 1	• 14
• Ramipril	• 1	• 14
• Venlafaxina	• 1	• 14
Sexo masculino	4	57
Média ±DP		
Idade	34,71 (14,67)	
Dados antropométricos durante a seleção:		
• IMC	• 21 ± 5,75	
• Peso	• 59,14 ± 18,94	
• Diferença peso usual peso atual	• -14,14 ± 10,55	
Tempo de diagnóstico até terapia biológica (anos)	1,42 ± 0,97	
Tempo de sintomas até o diagnóstico (anos)	2,57 ± 0,97	

6.2 Exposições Ambientais

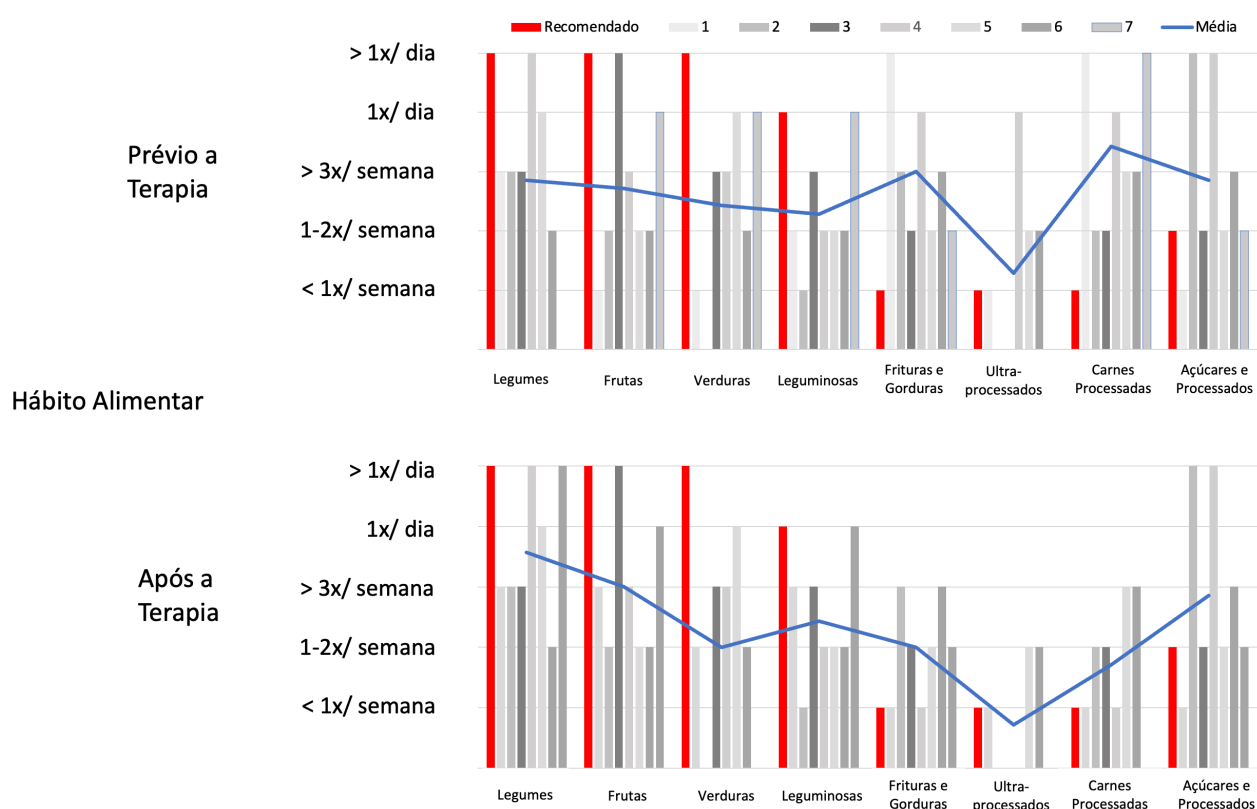
Tabela 3. Dados sociais e exposições ambientais dos pacientes.

	n= 7	%
Água tratada	7	100%
Animais de estimação	4	57%
Atividade física	4	57%
Escolaridade (paciente)		
• Até o 1º grau	1	14%
• Até o 2º grau completo	5	71%
• Até o 3º grau completo	1	14%
Escolaridade (pai)		
• Até o 1º grau	4	57%
• Até o 2º grau completo	2	28%
• Até o 3º grau completo	1	14%
Escolaridade (mãe)		
• Até o 1º grau	7	100%
• Até o 2º grau completo	0	-
• Até o 3º grau completo	0	-
Estado de Nascimento		
• Minas Gerais	1	14%
• São Paulo	6	85%
Estado de Moradia		
• São Paulo	7	100%
Familiar com DII	1	14%
Tabagismo atual	0	-
Tabagismo prévio	2	28%
	Média ±DP	Mediana (IQR)
Tempo sem tabagismo (anos)	20 ±14	20 (15 – 25, IQR= 10)
Horas de Sono (horas)	6,14 ±2,26	6 (4,5 – 8, IQR= 3,5)

A investigação do ambiente em que o paciente era exposto apontou que somente um paciente (14%) tinha algum familiar portador de DII. Nenhum paciente era tabagista ativo ou tabagista nos dois anos que antecederam o surgimento dos sintomas, embora 28% da coorte referia tabagismo prévio. Pouco mais da metade dos pacientes (57%) tinham um ou mais animal de estimação

em casa durante pelo menos metade dos anos de vida. Todos os pacientes viviam em casas com saneamento básico e água tratada. A maior parte dos pacientes (57%) estudaram até o segundo grau completo enquanto, resultado semelhante à escolaridade dos pais, enquanto todas as mães tinham escolaridade até ou menor que o primeiro grau. A mediana de horas de sono dos pacientes foi de 6 (4,5 – 8; IQR= 3,5). Os dados de exposição ambiental estão na tabela 3.

O hábito alimentar está detalhado nos Gráficos 1 e 2 e na tabela 4. Considerando-se a média do consumo alimentar dos pacientes, foi observada mudança significativa da frequência de consumo de frutas, legumes/tubérculos e doces entre o início do seguimento e após quatro meses de terapia. Apesar disso, notamos grande variação individual na frequência alimentar e não observamos significância estatística quando o grupo foi avaliado por teste não paramétrico.



Gráficos 1 e 2. Hábito alimentar dos pacientes. A barra vermelha representa a recomendação semanal de cada um dos grupos alimentares^{91,103}. A linha azul representa a média de consumo de cada grupo alimentar pela coorte estudada. As barras de 1 a 7 representam cada um dos pacientes.

Tabela 4. Avaliação do hábito alimentar. Frequência alimentar prévia e após quatro meses de terapia biológica.

Porções semanais	Terapia Biológica		p*
	Pré	Pós	
	Média ± DP		
Frutas	3,85 ±5,04	4,28 ±4,78	<0,001
Leguminosas	4,43 ±4,75	6,57 ±5,31	0,295
Legumes e Tubérculos	2,00 ±2,38	2,28 ±2,36	0,001
Verduras	3,00 ±3	2,28 ±2,42	0,276
Carnes Processadas	6,14 ±5,72	1,14 ±1,34	0,129
Doces Processados	4,85 ±6,30	3,57 ±4,89	0,017
Ultraprocessados	1,28 ±2,56	0,28 ±0,48	0,871
Frituras	4,28 ±4,78	1,28 ±1,25	0,266

Valores apresentados em média e desvio padrão. Teste paramétrico – T-Student.

Na avaliação do consumo de proteínas de origem animal podemos observar que após o início da terapia biológica os pacientes reduziram de forma significativa o consumo de carne bovina (46% da fonte proteica prévia e 27% da fonte proteica na segunda avaliação, $p= 0,043$) com maior escolha de proteínas como peixes ($p= 0,042$) e ovo ($p= 0,137$).

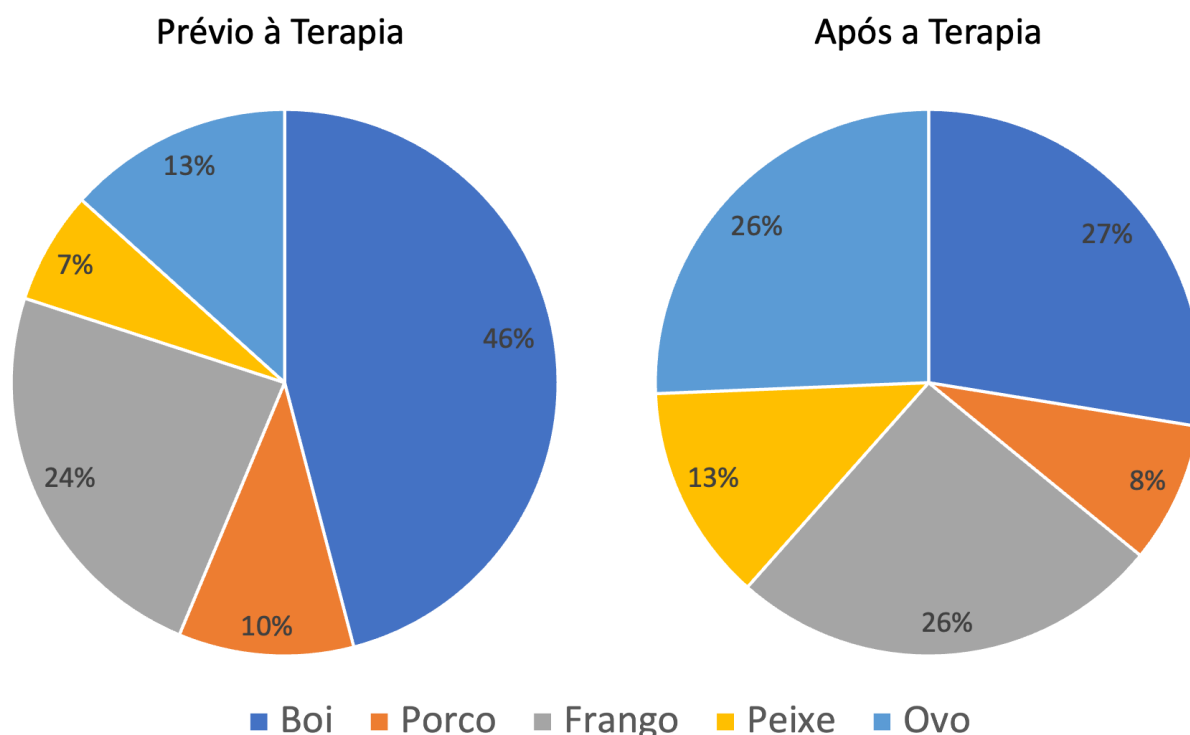
O consumo de leite e derivados apresentou redução numérica da primeira para a segunda avaliação. A Tabela 5 aponta a média e a mediana de porções semanais de cada tipo de alimento de origem animal e os Gráficos 3 e 4 demonstram o percentual de consumo de cada fonte de proteína animal (carnes) antes e após a terapia biológica.

Tabela 5. Frequência de consumo de fontes de proteínas por semana.

Porções semanais	Terapia Biológica		p
	Pré	Pós	
	Média ±DP		
Boi	8,85 ±3,67	6,14 ±1,21	0,043
Frango	4,57 ±1,81	5,71 ±1,60	0,084
Ovo	2,57 ±1,81	5,71 ±3,94	0,137
Peixe	1,28 ±2,12	2,85 ±2,03	0,042
Porco	2 ±1,41	1,85 ±1,06	0,689
Leite	3 ±3,26	2,28 ±3,09	0,094
Queijos	3,28 ±2,56	2,71 ±3,14	0,457

Valores apresentados em média e desvio padrão. Teste paramétrico – T-Student.

Frequência de Ingestão Proteica: subtipos de proteínas por semana



Gráficos 3 e 4. Escolhas de tipos de fontes de proteína animal pelos pacientes. A frequência é referida em percentual de cada subtipo de fonte proteica animal ingerida durante uma semana.

O emagrecimento ocorreu de forma significativa aos pacientes no período entre início dos sintomas e o diagnóstico (Tabela 5) com uma variação negativa de 19% do peso corporal usual e apresentando um IMC médio ao diagnóstico de 21kg/m² enquanto o valor usual corresponde a 26kg/m² (p= 0,005). A avaliação do peso após quatro meses de terapia não foi avaliada pois não estava contemplada como desfecho no projeto.

Tabela 5. Alterações do peso e IMC dos pacientes durante a indicação da terapia biológica.

	Usual	À avaliação	p*
	Média ±DP		
Peso	73,28 ±26,08	59,14 ±18,94	0,012
Δ Peso (%)	-19,00 ±9,40		-
IMC	26,72 ±7,94	21,63 ±5,75	0,005

Valores apresentados em média e desvio padrão. Teste paramétrico – T-Student.

6.3 Resultados Terapêuticos

Utilizamos o IADC para avaliação inicial da resposta terapêutica onde somente um paciente apresentou ausência primária de resposta clínica ao tratamento com Infliximabe (redução do IADC <100 pontos), sendo prescrito Adalimumabe após 20 semanas (5 doses) de terapia. Dois pacientes (28%) já haviam realizado cirurgias decorrentes da DC (fistulotomias em região perianal) e um paciente (14%) apresentou abdome agudo perfurativo antes do início da terapia biológica, sendo submetido à colectomia direita, drenagem de abscesso pélvico e realização de ileostomia.

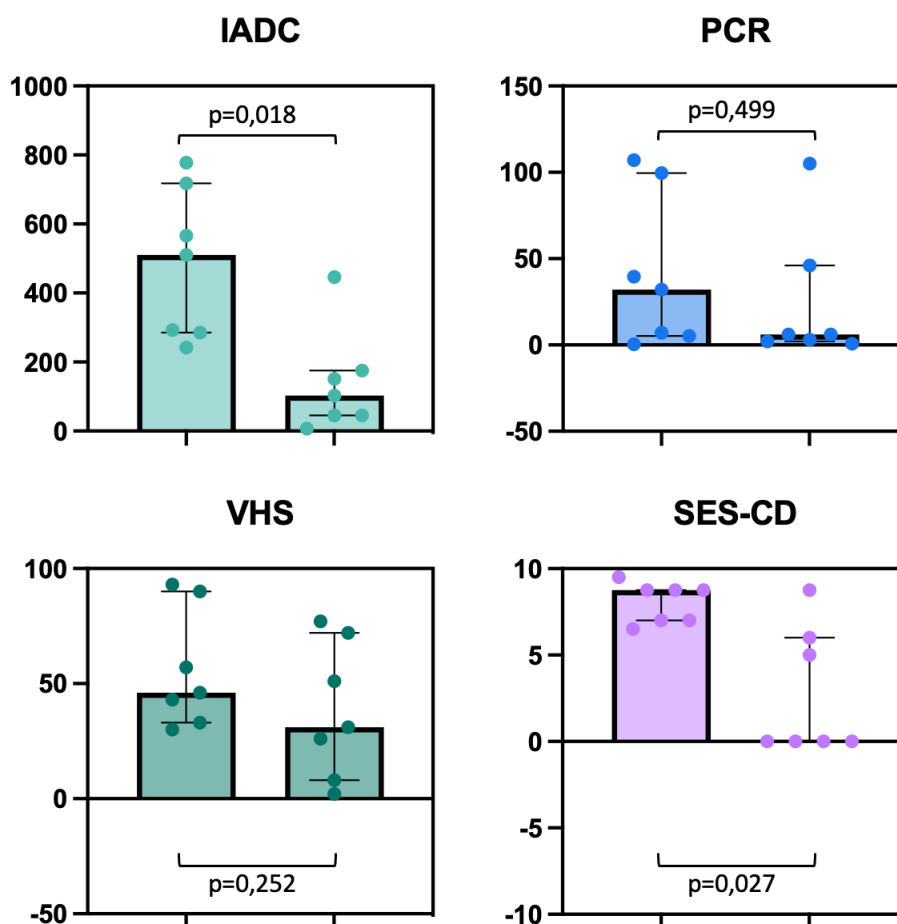
A terapia se mostrou efetiva apresentando significativa melhora na avaliação pelos escores clínico e endoscópico. Foi também observada redução numérica das provas de atividade inflamatória PCR e VHS. Todos estes valores estão exibidos na Tabela 6 e representados nos gráficos 5, 6, 7 e 8.

Tabela 6. Marcadores de atividade inflamatória: clínico, laboratoriais e endoscópico.

	Terapia Biológica		p
	Pré	Pós	
	Mediana (IQR)		
IADC	510 (289-642 IQR= 353)	103 (45-163 IQR= 118)	0,018
PCR	32 (6,1-69,55 IQR= 63,45)	6 (2,5-26 IQR= 23,5)	0,499
VHS	46 (38-73,6 IQR= 35,5)	31 (17-61,5 IQR= 44,5)	0,252
SES-CD	8,75 (7-8,75 IQR= 1,75)	0 (0-5,5 IQR= 5,5)	0,027

Valores apresentados em mediana e intervalo interquartil. Teste não paramétrico - Wilcoxon Signed Ranks Test.

Marcadores laboratoriais relacionados a absorção e/ou nutrição foram avaliados prévia e posteriormente à terapia e estão apresentados na Tabela 7. Observamos aumento significativo nos valores de Albumina ($p=0,022$) e Hemoglobina ($p= 0,024$). Os pacientes tiveram média e mediana elevadas na dosagem da Vitamina B12, porém é preciso ressaltar que 5 pacientes (71%) receberam doses intramusculares de cobalamina previamente ao tratamento, reduzindo a confiabilidade da real quantificação desta vitamina.



Gráficos 5 (variação do IADC), 6 (Variação da PCR), 7 (Variação da VHS) e 8 (Variação do SES-CD). Valores apresentados em mediana e intervalo interquartil. Teste não paramétrico - Wilcoxon Signed Ranks Test.

Tabela 7. Marcadores laboratoriais relacionados a nutrição do portador de Doença de Crohn.

	Terapia Biológica		p
	Pré	Pós	
	Média ±DP		
Ácido Fólico	10,73 ±5,01	9,90 ±6,52	0,778
Albumina	3 ±0,66	3,98 ±0,75	0,022
Pré-albumina	22,28 ±9,39	23 ±11,10	0,917
Colesterol Total	145 ±46,89	132,14 ±31,88	0,404
HDL Colesterol	39,42 ±17,01	45,14 ±11,89	0,463
Ferritina	352,28 ±335,32	432,14 ±675,61	0,627
Ferro	27,71 ±20,94	69,28 ±46,66	0,064
Glicemia	84 ±13,02	78,85 ±8,45	0,207
Hemoglobina	10,78 ±2,53	12,98 ±2,53	0,024
Triglicérides	100,5 ±42,58	83,85 ±27,43	0,126
Vitamina B12	401,57 ±135,02	646,14 ±360,42	0,058

Valores apresentados em média e desvio padrão. Teste paramétrico – T-Student.

6.4 Avaliação da Composição Microbiana

A avaliação da composição microbiana foi realizada com mecanismos de detecção de dois domínios, Arqueas e Bactérias, porém somente o domínio Bactéria será contemplado neste estudo. A descrição dos achados da composição bacteriana será subdivida em resultados por filos, ordens e famílias, gênero e espécies.

Quadro 5. Filos detectados através do sequenciamento 16S rRNA das amostras fecais. Descrição e exemplificação de espécies e funções de cada filo^{76,104–108}.

Filos	Descrição	Exemplos de gêneros:	Exemplo de funções:
Bacteroidetes	Gram (-) degradadores típicos de glicanos. Habitualmente correspondem cerca de 50% das sequências de 16S rRNA detectadas na microbiota intestinal.	<i>Bacteroides</i> <i>Parabacteroides</i> <i>Prevotella</i>	Sinalização imune: • Produção de citocinas. • Sinalização no NF-kappa B. • Carcinogênese (B. Fragilis). • Ativação de linfócitos Th17. Metabolismo: - Degradação de polissacarídeos. - Síntese de polímeros. - Interação com adoçantes sintéticos*.
Firmicutes (ou Bacillota)	Gram (+) de paredes rígidas ou semirrígidas contendo peptideoglicanos. Junto aos Bacteroides, correspondem a 90% da população bacteriana intestinal.	<i>Blautia</i> <i>Clostridium</i> <i>Eubacterium</i> <i>Faecalibacterium</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Roseburia</i> <i>Ruminococcus</i>	Redução da abundância na obesidade. Produção de ácido láctico e ácido butírico na metabolização da lactose, butirato e biodegradação dos amido resistentes (FOS, GOS e XOS). Metabolismo da glicose e lipídeos
Proteobacteria	Gram (-), contendo lipopolissacarídeos nas paredes, anaeróbios facultativos. Maior filo do reino bactérias.	<i>Enterobacter</i> <i>Escherichia</i> <i>Klebsiella</i> <i>Prevotella</i>	Associado à obesidade, doença metabólica hepática, DM2. Ativação de linfócitos B e células dendríticas. Reconhecimento NOD2 e ativação NF-KB

Actinobacteria	Gram (+), múltiplos bastonetes ramificados, imóveis, não formadores de esporos e na maioria anaeróbios.	<i>Bifidobacterias</i> <i>Corynebacteria</i> <i>Propionibacteria</i> <i>Streptomyces</i>	Fortalecimento da barreira intestinal. Produção de acetato e lactato. Biodegradação dos amido resistentes (FOS, GOS, inulina e arabinosilano). Regulação Imunológica: - <i>Down-regulation</i> inflamatório pela produção de IL-4 e IL-13. - Regulação da resposta Th2.
Fusobacteria	Gram (-), bacilos anaeróbios não formadores de esporos.	<i>Fusobacteria nucleatum</i>	Relacionado ao câncer colorretal.
Verrucomicrobia	Gram (-) recentemente adicionados ao domínio Bacteria Anaeróbios, ovais, imóveis.	<i>Akkermansia</i> <i>Verrucomicrobiaceae</i> ** <i>Opitutaceae</i> **	Redução da abundância associada à obesidade, DM2, distúrbios psiquiátricos e DII. Reduzem expressão de mRNA envolvidos na diferenciação de adipócitos e oxidação de lipídeos. Produção de acetato, butirato e propionato pela degradação de mucina. Aumentam a camada de muco e fortalecem as junções intercelulares. Estimula a liberação de peptídeos intestinais (GLP-1 e GLP2).
Cyanobacteria	Organismos mais antigos da terra Alta capacidade de adaptação: morfológica e metabólica.	<i>Caenarcaniphilales</i> ** <i>Gastranaerophilales</i> ** <i>Vampirovibrionales</i> ** <i>Obscuribacterales</i> **	Pouco compreendido.

Saccharibacteria	Também chamado de TM7x Coco muito pequeno (200-300nm), epibionte obrigatório tendo ainda uma fase parasitária.	<i>Saccharibacteria</i>	Desconhecido Aumento da abundância nas DII (mais comum em cavidade oral).
Synergistetes	Gran (-), anaeróbios, bastonetes/ vibrióides. A presença de lipopolissacarídeos na parede celular não foi relatada, mas observam-se várias proteínas envolvidas na biossíntese de lipopolissacarídeos.	<i>Fretibacterium</i> <i>Jonquetella</i> <i>Pyramidobacter</i>	Desconhecido.

Filos descritos em ordem de abundância observada na primeira análise. * Interação parcialmente compreendida, porém relacionada a metabolização dos adoçantes sintéticos e consequente inibição de proliferação, causando redução da abundância e consequente redução do muco intestinal. ** Apresentado em famílias. DM2: Diabetes Melitus do tipo 2. FOS: fruto-oligossacarídeos. GLP: Glucacon-like peptide. GOS: galacto-oligossacarídeo. mRNA: micro RNA. rRNA: RNA ribossomal. NOD2: Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2. XOS: xilo-oligossacarídeos.

6.4.1 Resultados por Filos

A avaliação das espécies agrupadas por filos identificou 9 filos com predominância de cinco deles (Quadro 5). Na primeira avaliação, predominavam respectivamente Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobactérias, Actinobacterias e Fusobacterias. Após 4 meses de terapia biológica, observou-se aumento numérico da população de Actinobacterias e Firmicutes, redução numérica da população de Bacteroidetes e Fusobacterias e redução significativa da população de Proteobacterias. O predomínio final dos filos obteve a seguinte sequência: Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacterias, Actinobacterias e Fusobacterias. Os dados estão evidenciados na Tabela 8 em percentual da média e mediana, mas considerando a grande variância de valores o cálculo estatístico utilizado nesta análise considera somente a mediana. O gráfico 9 demonstra o predomínio de cada filo de acordo com a etapa da avaliação. Os nove filos identificados estão apresentados em ordem alfabética no quadro 5 acompanhados de uma descrição de cada grupo.

Tabela 8. Composição microbiana por filos mais prevalentes. Avaliação da composição prévia e após quatro meses de terapia biológica.

Terapia Biológica			
	Pré	Pós	
(%)	Mediana (IQR)	Mediana (IQR)	p**
Actinobacteria	0,02 (0,009 – 0,26 IQR 0,25)	0,25 (0,07 – 0,86 IQR 0,79)	0,237
Bacteroidetes	53,77 (22,86 – 69,82 IQR 46,96)	47,48 (30,85 – 66,70 IQR 25,85)	0,612
Firmicutes	20,74 (11,40 – 44,61 IQR 43,21)	50,29 (32,06 – 61,34 IQR 29,28)	0,063
Fusobacterias	0,009 (0,00 – 15,97 IQR 15,97)	0,00 (0,00 – 0,43 IQR 0,43)	0,104
Proteobacterias	2,87 (1,52 – 43,45 IQR 41,93)	1,97 (0,84 – 2,19 IQR 1,35)	0,028

Valores apresentados em mediana e intervalo interquartil. Teste não paramétrico - Wilcoxon Signed Ranks Test.

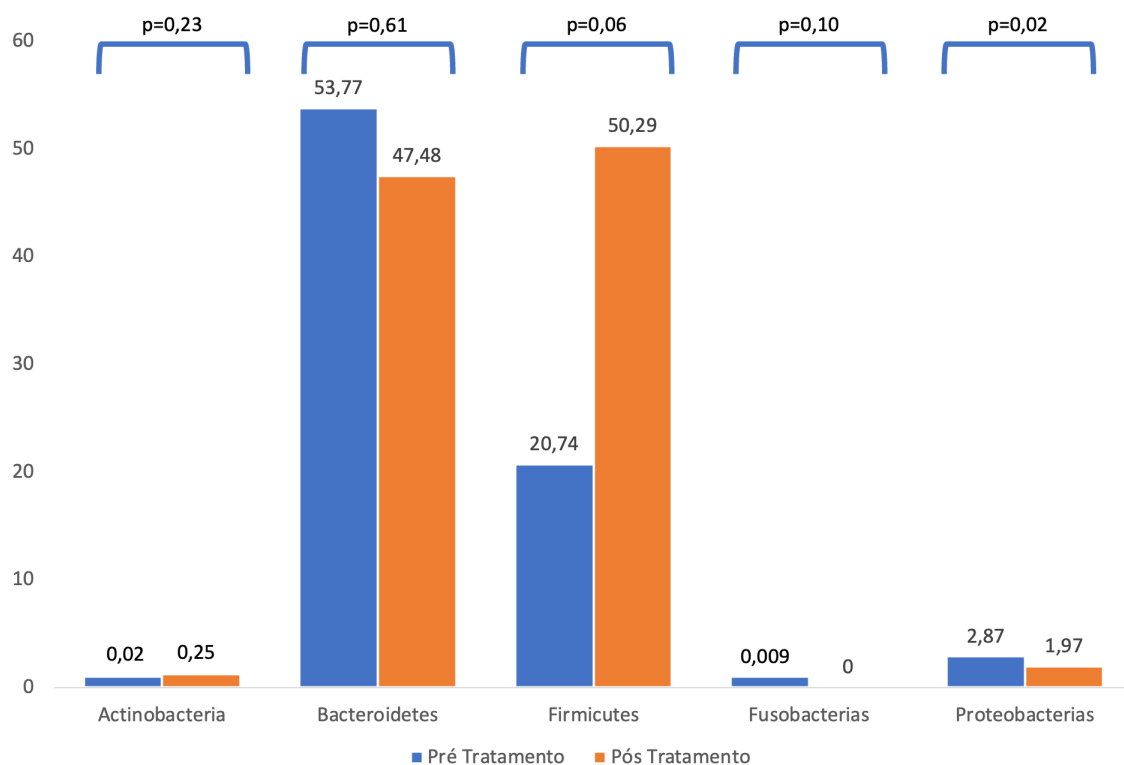


Gráfico 9. Variação da composição microbiana dividida por Filos. Wilcoxon Signed Ranks Test.

Foi notada diferença na abundância do filo Fusobacteria entre os pacientes que praticavam atividade física e aqueles sedentários tanto na avaliação prévia ao tratamento ($p = 0,04$) quanto na avaliação subsequente ($p = 0,03$). Não foram observadas diferenças significantes entre a composição dos filos, seja na amostra anterior ao tratamento ou na amostra após quatro meses de terapia, entre os demais grupos com diferenças nas exposições ambientais como os ex-

fumantes e não fumantes, pacientes com ou sem convívio com animais de estimação ou na avaliação conforme horas de sono (Tabela 9). O grupo foi homogêneo em relação ao local de nascimento, saneamento básico das residências, nível de escolaridade do paciente e dos pais, não permitindo comparações.

Tabela 9. Resultado do p-valor da comparação da composição dos Filos entre grupos com diferentes exposições ambientais.

P valor	Tratamento	Actinobactéria	Bacteroidete	Firmicutes	Fusobactéria	Proteobactéria
Ex-fumantes	Pré	0,237	1,000	0,121	0,688	0,439
	Pós	0,699	1,000	0,699	0,200	0,053
Atividade física	Pré	0,844	1,000	0,245	0,044	0,439
	Pós	0,699	0,121	0,245	0,033	0,053
Animais de estimação	Pré	0,368	0,724	0,724	0,714	0,724
	Pós	0,724	0,724	0,480	0,329	0,289
≥6h de sono /dia	Pré	0,589	0,724	0,289	0,463	0,724
	Pós	0,724	1,000	1,000	0,558	0,289

Valores de p-valor calculados pelo Teste U de Mann-Whitney.

Quanto aos pacientes que atingiram remissão ou permaneceram em atividade endoscópica não encontramos diferenças significantes na composição por filos. A mediana (IQR) de cada grupo está demonstrada na Tabela 10.

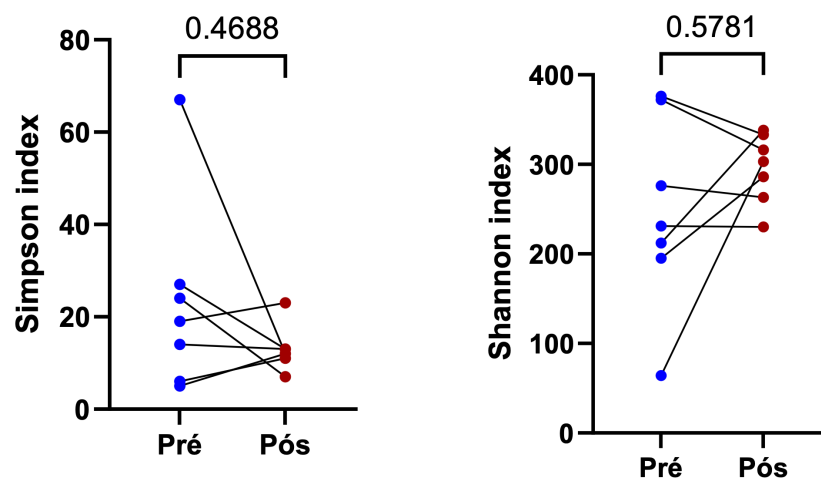
Tabela 10. Comparação da composição bacteriana entre pacientes em remissão e atividade endoscópica após quatro meses de terapia biológica.

<i>Em percentual (%)</i>	Remissão Endoscópica	Atividade Endoscópica	p
	Mediana (IQR)	Mediana (IQR)	
Actinobacteria	0,01 (0,00-23,90 IQR 23,90)	0,72 (0,05-0,39 IQR 0,32)	0,36
Bacteroidetes	56,87 (12,19-67,91 IQR 55,72)	51,3 (43,38-63,34 IQR 19,95)	0,72
Firmicutes	17,93 (4,99-43,14 IQR 38,15)	45,69 (34,6-51,03 IQR 16,43)	0,72
Fusobacterias	0,48 (0,00-12,22 IQR 12,22)	0,00	0,71
Proteobacterias	6,12 (1,83-51,29 IQR 49,46)	2,00 (1,52-2,09 IQR 0,56)	0,72

Valores apresentados em mediana e intervalo interquartil. O grupo em atividade endoscópica não atingiu o quartil 75.
Teste não paramétrico - Kruskal Wallis Test.

Quando avaliamos a diferença da riqueza de espécies (alfa diversidade) entre os dois momentos do estudo, observamos que não ocorreu alteração,

como demonstrado nos gráficos 10 e 11. Para entendermos melhor a ausência de variação da alfa diversidade, precisamos avaliar os resultados das espécies.



Gráficos 10 e 11. Avaliação da variação da alfa diversidade. Cálculos realizados pelo índice de Simpson e pelo Índice de Shannon.

6.4.2 Resultados por Ordem e Famílias

Foram encontradas 63 Ordens ou Famílias de bactérias que estão demonstradas no Anexo 3.

A família *Bacteroidacea* do filo Bacteroidetes foi detectada em abundância tanto no grupo virgem de tratamento, quanto após o tratamento, com aumento numérico de sua prevalência nas amostras coletadas. Neste mesmo filo, observou-se baixa abundância da família *Odoribacteraceae*, *Porphyromonadaceae*, *Prevotellaceae*, *Rikenellaceae* no período prévio à terapia, tendo tido aumento da abundância após o quarto mês de tratamento, porém não atingindo significância estatística.

Após quatro meses de tratamento, ocorreu um aumento numérico das famílias *Acidaminococcaceae*, *Lachnospiraceae*, *Mogibacterium*, *Ruminococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Veillonellaceae*, do filo Firmicutes. No mesmo filo observamos também a redução ou baixa abundância das famílias como *Erysipelotrichaceae*, *Lactobacillaceae*.

Quanto as famílias pertencentes às Proteobacterias, observamos constância na abundância das famílias *Enterobacteriaceae* e *Pasteurellaceae* tanto no período inicial quanto após o tratamento.

Observamos baixa abundância das famílias do filo Actinobacterias, como a família *Bifidobacteriaceae*, embora tenha ocorrido aumento numérico de suas concentrações após a terapia.

Embora tenha ocorrido aumento numérico da família *Fusobacteriaceae* do filo Fusobacterias, observamos uma evidente redução da abundância desta família em indivíduos onde ocorria maior prevalência, enquanto ocorreu também a detecção desta família naqueles indivíduos que não tiveram a leitura dela na primeira amostra.

6.4.3 Resultado por Gêneros e Espécies

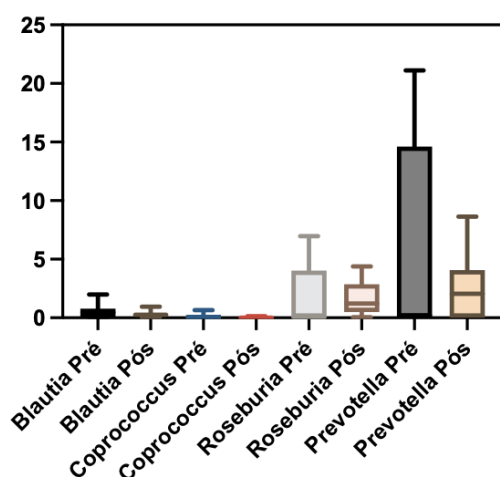
Foram encontrados 321 Gêneros ou Espécies bacterianas que estão exibidos junto a suas médias (DP) e medianas (IQR) tanto na primeira quanto na segunda análise no Anexo 4. Muitos gêneros ou espécies não obtiveram medianas detectáveis na primeira amostra com aumento da abundância e consequentemente do percentual na segunda amostra. A grande maioria das espécies ou gêneros não atingiram medianas maiores ou iguais a 0,0001% das famílias pertencentes e não serão relatadas neste capítulo, porém estão contemplados no Anexo 4. O quadro 7 exhibe os gêneros ou espécies bacterianas observados pela leitura do 16s rRNA subdivididos em 4 colunas: (I) as bactérias não detectadas na primeira amostra e detectadas na segunda amostra; (II) as bactérias que aumentaram a abundância em valor maior ou igual ao primeiro intervalo interquartil, (III) as bactérias que reduziram a abundância em valor maior ou igual ao primeiro intervalo interquartil e (IV) as bactérias com medianas detectáveis em ambas as amostras e que se mantiveram estáveis (alternância menor que o valor do primeiro intervalo interquartil) no período entre a indicação da terapia biológica até o quarto mês de terapia.

Quadro 7. Gêneros e espécies bacterianas de acordo com variância após 4 meses de terapia (em ordem alfabética).

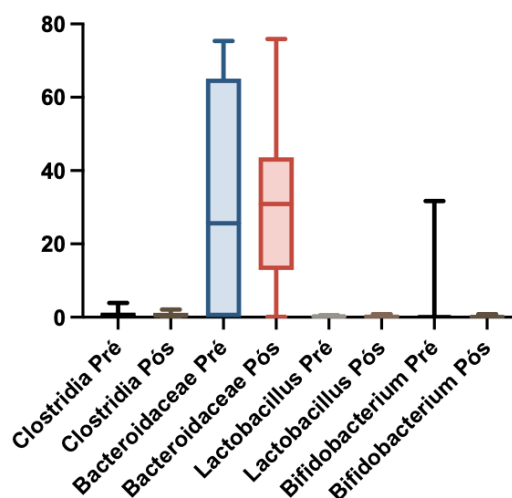
I- Detecção 2ª amostra	II- Aumento	III - Estáveis	IV – Redução
<i>Agathobacter rectalis</i>	<i>Alistipes putredinis</i>	<i>Agathobaculum butyr-</i>	<i>Anaerostipes hadrus</i>
<i>Akkermansia muciniphila</i>	<i>Bacteroides dorei</i>	<i>iciproducens</i>	<i>Bacteroides vulgatus</i>
<i>Alistipes indistinctus</i>	<i>Bacteroides finegoldii</i>	<i>Bacteroides ovatus</i>	<i>Bacteroides xylanisol-</i>
<i>Alistipes shahii</i>	<i>Blautia obeum</i>	<i>Blautia luti</i>	<i>vens</i>
<i>Anaerotignum lactatifer-</i>	<i>Flavonifractor plautii</i>	<i>Blautia wexlerae</i>	<i>Clostridium clostridio-</i>
<i>mentans</i>	<i>Roseburia cecicola</i>	<i>Clostridium asparagi-</i>	<i>forme</i>
<i>Bacteroides faecichin-</i>	<i>Roseburia intestinalis</i>	<i>forme</i>	<i>Clostridium ramosum</i>
<i>chillae</i>	<i>Roseburia inulinivorans</i>	<i>Dorea longicatena</i>	<i>CP007496_s</i>
<i>Bacteroides faecis</i>	<i>Ruminococcus faecis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacter</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Ruminococcus gnavus</i>	<i>Prevotella</i>	<i>Hungatella hathewayi</i>
<i>Bacteroides thetaiotao-</i>	<i>Ruminococcus torques</i>	<i>Streptococcus parasan-</i>	
<i>micron</i>	<i>Streptococcus pneumo-</i>	<i>guinis</i>	
<i>Bacteroides uniformis</i>	<i>niae</i>		
<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Streptococcus sinensis</i>		
<i>Blautia faecis</i>			
<i>CCMM_s</i>			
<i>Clostridium aldenense</i>			
<i>Clostridium cadaveris</i>			
<i>Clostridium symbiosum</i>			
<i>Clostridium_g24</i>			
<i>Coprococcus comes</i>			
<i>Dialister invisus</i>			
<i>Eubacterium eligens</i>			
<i>Eubacterium hallii</i>			
<i>Eubacterium ramulus</i>			
<i>Eubacterium ventriosum</i>			
<i>Faecalibacterium praus-</i>			
<i>nitzii</i>			
<i>FCEY_s</i>			
<i>Fusicatenibacter sac-</i>			
<i>charivorans</i>			
<i>Gemmiger formicilis</i>			
<i>Haemophilus parahae-</i>			
<i>molyticus</i>			
<i>Ruthenibacterium lactati-</i>			
<i>formans</i>			
<i>Streptococcus peroris</i>			
<i>Streptococcus salivarius</i>			
<i>Veillonella dispar</i>			
<i>Veillonella parvula</i>			

Quando subdividimos os gêneros ou espécies bacterianas de acordo com sua função metabólica em metabolizadores de Propionato, Butirato, Indol ou de Amido Resistentes (principais metabólitos na homeostase cólon-microbiota) não observamos diferenças significantes entre os dois momentos do estudo. As medianas da abundância dessas espécies estão apresentadas na Tabela 11 e seus valores também representados nos gráficos 10, 11 e 12.

Principais Metabolizadores de Propionato



Principais Metabolizadores de Indol



Principais Metabolizadores de Butirato

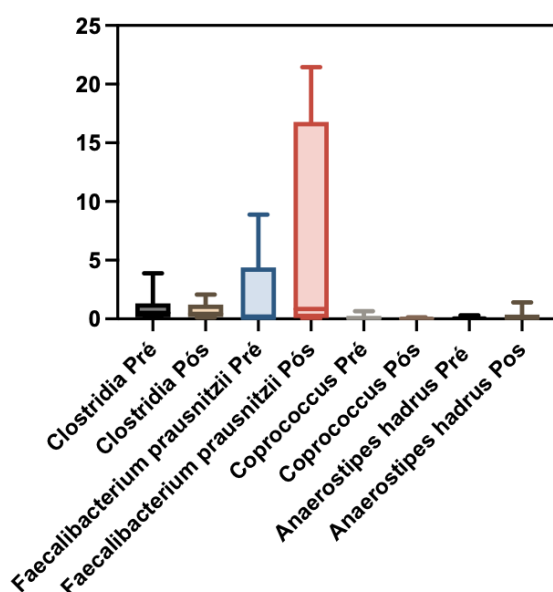


Gráfico 10: Principais espécies metabolizadoras de propionato. Gráfico 11: Principais espécies metabolizadoras de Butirato. Gráfico 12: Principais espécies metabolizadoras de Indol. Gráficos em Diagramas de Caixas (*Boxplot*), a linha central representa a mediana, seguidas do quartil 75 e limite superior (acima) e quartil 25 e limite inferior (abaixo).

Tabela 11. Avaliação da oscilação dos principais metabolizadores de Ácidos Graxos de Cadeia Curta e Indol e das principais redutoras de FOS e GOS.

%		Mediana		
		Pré-tratamento	Pós-tratamento	p
Butirato	Clostridia	0,50 (0,20-0,97 IQR=0,76)	0,42 (0,24-1,20 IQR= 0,93)	0,966
	F. prausnitzii	0 (0-2,69 IQR= 2,69)	0,84 (0,44-10,45 IQR= 10)	0,465
	Coprococcus	0 (0-0,16 IQR= 0,16)	0 (0-0,09 IQR= 0,09)	0,461
	Anaerostipes hadrus	0,02 (0-0,10 IQR= 0,1)	0 (0-0,23 IQR= 0,22)	0,553
Propionato	Blautia	0,46 (0,08-0,67 IQR= 0,59)	0,24 (0,14-0,28 IQR= 0,13)	0,735
	Coprococcus	0 (0-0,16 IQR= 0,16)	0 (0-0,09 IQR= 0,09)	0,461
	Roseburia	0,04 (0-2,63 IQR= 2,63)	1,27 (0,79-2,47 IQR= 1,68)	0,735
	Prevotella	0,19 (0-7,88 IQR= 7,87)	2,04 (0-3,51 IQR= 3,51)	0,462
Indol	Clostridia	0,50 (0,20-0,97 IQR=0,76)	0,42 (0,24-1,20 IQR= 0,93)	0,966
FOS, GOS	Bacteroidaceae	25,63 (1,84-57,24 IQR= 55,4)	30,89 (14,25-40,10 IQR= 25,85)	1,000
	Lactobacillus*	0,20 (0-0,38 IQR= 0,38)	0 (0-0,59 IQR=0,59)	0,893
	Bifidobacterium*	0 (0-0,06 IQR= 0,06)	0,03 (0,01-0,37 IQR= 0,36)	0,611

Resultados emitidos em percentual relacionado ao grupo taxonômico superior. Valores evidenciados em mediana e intervalo interquartil (IQR). FOS: frutooligossacarídeos. GOS: galactooligossacarídeos. *Metabolizadores de FOS e GOS. Wilcoxon Signed Ranks Test.

Em resumo, observou-se uma alteração na composição dos filos bacterianos, caracterizada por um aumento na população de Firmicutes e uma redução significativa na população de Proteobacterias. Na segunda avaliação, foram identificadas maiores abundâncias dos filos menos representativos, como Actinobacterias e Verrucomicrobia. Ao analisarmos as espécies bacterianas, não foi detectada alteração significativa na riqueza de espécies da comunidade bacteriana ileocolônica. Estes resultados estão detalhados na Figura 7.

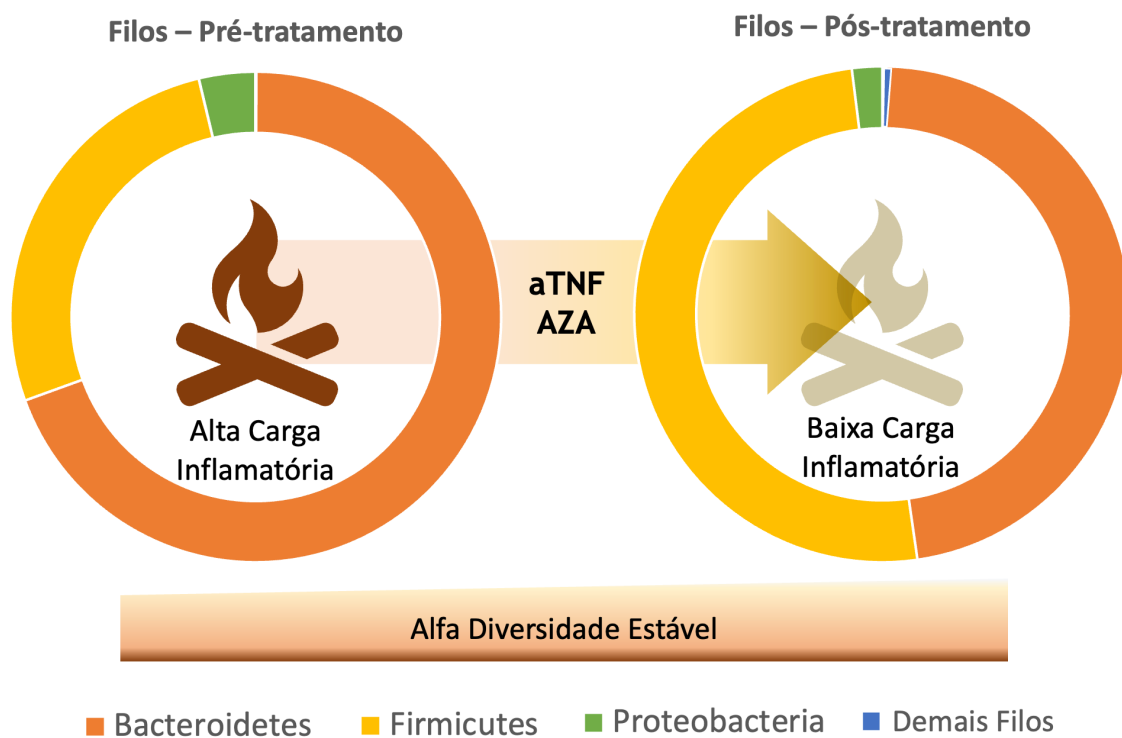


Figura 7. Representação da variação entre os filos no período prévio e após o tratamento e da baixa variação da α diversidade.

7. Discussão

O estudo foi finalizado com somente sete pacientes sendo que o maior impacto sobre a captação de pacientes foi a declaração da pandemia do SARS-COV-2 pela Organização Mundial de Saúde e pelo Governo Brasileiro que manteve o ambulatório de Doenças Inflamatórias Intestinais da disciplina de coloproctologia fechado completamente ou parcialmente durante os anos de 2020 e 2021, reduzindo o número dos pacientes que preencheriam os critérios de inclusão segundo o projeto apresentado e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa^{109,110}. Muitos pacientes deixaram de comparecer com as amostras de fezes nas datas necessárias ou abandonaram a terapia, sendo necessário a exclusão destes pacientes do estudo.

Alguns pacientes completaram todas as etapas do estudo, porém as amostras fecais não continham material genético suficiente para a leitura do 16s rRNA. Provavelmente a baixa concentração de muco e fezes nas amostras e a grande quantidade de água e produtos de inflamação dificultaram a extração do ácido nucleico. Em condições normais e seguindo técnicas para evitar a contaminação e proporcionar um adequado transporte e armazenamento, as fezes são as amostras animais de maior facilidade em extrair o ácido nucleico devido a grande biomassa microbiana, diferentemente de outras amostras, como a pele¹¹¹.

Embora o conceito de biossimililaridade entre drogas antagonistas do TNF- α originadoras e as demais drogas produzidas de forma similar por outras companhias farmacêuticas esteja estabelecido e ocorra a tendência de que as instituições e órgãos de especialidades médicas reconheçam a intercambiabilidade entre as medicações (já reconhecida por organizações externas como a Organização Europeia de Crohn e Colite¹¹² porém ainda sem publicação oficial da Federação Brasileira de Gastroenterologia ou da Organização Brasileira para a Doença de Crohn e Colite), não existem estudos que validem superioridade de uma droga sobre a outra (os estudos apresentados aos órgãos reguladores são de não inferioridade) e optamos por não incluir os pacientes que tiveram seu tratamento alterado durante o estudo ou que não utilizaram o produto Infliximabe-Bio-Mmanguinhos^{®113,114}.

7.1 Epidemiologia e Fenótipo da DC

Um recente estudo epidemiológico brasileiro que avaliou o banco de dados do DATASUS entre 2012 e 2020 evidenciou que enquanto ocorre maior incidência das DII na segunda e terceira década de vida, já existe maior prevalência da doença em maiores de 40 anos. Em relação ao sexo, existe uma prevalência semelhante somente até os primeiros 15 anos de vida e, a partir de então, o sexo feminino prevalece em todas as demais faixas etárias¹⁰. Neste estudo tivemos semelhança em relação ao sexo e maior predomínio de pacientes que tiveram o diagnóstico entre 17 e 39 anos de vida. Este predomínio pode ser justificado por termos selecionados pacientes com DC moderada a grave virgens de terapia biológica e com curto tempo de diagnóstico. Estes dados condizem com o referido estudo epidemiológico brasileiro que aponta o grupo A2 e A3 de Montreal, respectivamente com as maiores incidências de DC no país.

O íleo terminal, o cólon e o reto são as regiões com maior população microbiana e existe correlação entre maior atividade inflamatória da DC nos locais de maior população microbiana ou maior estase (íleo terminal e reto)¹⁴. Baseado nestas informações todos os pacientes selecionados tinham o íleo terminal e o ceco acometidos como condição para a inclusão no estudo podendo ter ou não o cólon ou o reto acometido. Os estudos sobre a microbiota do intestino delgado proximal são escassos e a avaliação da microbiota local deve ser realizada com metodologia distinta devido a colonização fisiológica diferir da composição microbiana colônica além de ser menos populosa, necessitando técnica de amostragem que permita a coleta de resíduos que ainda não alcançaram o íleo terminal ou cólon. De forma a exemplificar, a colonização habitual do duodeno e jejuno atinge cerca de 10^3 e 10^4 UFC/ml enquanto o íleo terminal atinge 10^7 a 10^9 UFC/ml e o cólon 10^{10} e 10^{12} UFC/ml⁴⁵.

Os pacientes portadores de DC perianal tiveram necessidade de intervenção cirúrgica além da terapia medicamentosa. Este procedimento é preconizado precedido por adequado exame de imagem e exame sob anestesia para um diagnóstico e avaliação de coleções associadas. A passagem de sedenho pela luz da fístula é recomendada para a prevenção da recorrência ou da sepse de origem pélvica¹¹⁵.

O comportamento não estenosante, não penetrante prevaleceu, concordante com os dados epidemiológicos mundiais que apontam esta prevalência entre os fenótipos, especialmente nos primeiros anos de diagnóstico¹³. Diferentemente dos relatos epidemiológicos tivemos uma prevalência numericamente (e não significativamente) superior de pacientes com doença penetrante do que estenosante. De forma geral, a doença estenosante é mais comum, atingindo cerca de 24% dos pacientes ao diagnóstico, e até 50% dos pacientes em até 10 anos de doença enquanto a doença penetrante (com exclusão das fístulas perianais) ocorrerão em cerca de 8% dos pacientes¹¹⁶. É importante ressaltar que existem variações da prevalência fenotípica da DC em populações mais segregadas, o que não poderia ser vinculado a miscigenada população brasileira¹¹⁷.

Até 60% dos portadores de DII podem apresentar manifestações extraintestinais (MEI) de caráter passageiro (como as Artralgias) ou permanentes (como doenças associadas, por exemplo as Espondiloartropatias Axiais). A maior parte dos pacientes desenvolverá a MEI ao longo dos anos após o diagnóstico da DII podendo estar relacionada à atividade da doença intestinal (por exemplo o Eritema Nodoso) ou não (por exemplo a Colangite Biliar Primária)¹¹⁸. Quase metade da coorte apresentava uma ou mais MEI sendo as manifestações a artralgia e úlceras orais. Estas manifestações estão relacionadas à atividade da Doença de Crohn e tendem a desaparecer com o controle da doença de base¹¹⁹. Neste estudo, somente um caso não apresentou regressão da MEI sendo que o mesmo paciente não apresentou remissão da DC até o final do período de seguimento pelo estudo.

7.2 Resposta Terapêutica

O estudo incluiu pacientes com indicação de tratamento com Infliximabe e Azatioprina pois são terapias disponibilizadas pelo Sistema Único de Saúde e com grande número de indicações terapêuticas na Doença de Crohn, como no comprometimento perianal ou na associação com algumas manifestações extra-intestinais, como as Espondiloartropatias Axiais^{20,27}. Foram observadas altas taxas de resposta clínica e remissão endoscópica à terapia com Infliximabe e Azatioprina, com taxa de efetividade terapêutica superior tanto aos dados originais

de Infiximabe (em monoterapia) quanto do estudo de avaliação da associação entre Infiximabe e Azatioprina^{25,32}. Este fato pode ser explicado pois os pacientes tinham doença de diagnóstico recente²⁰. Estudos demonstram que a terapia biológica iniciada precocemente aumenta a taxa de resposta terapêutica^{120,121}. Especialmente na DC, o aumento do intervalo entre o diagnóstico e o início da terapia reduz significativamente a chance de resposta terapêutica para todas as terapias biológicas, sendo considerado o período ideal máximo de 18 a 24 meses entre o diagnóstico e o início da terapia¹²². As diretrizes nacionais recomendam o início da terapia efetiva em induzir remissão em até dois anos após o diagnóstico²⁰. Desta forma, o estudo selecionou propositalmente pacientes com pouco tempo de diagnóstico de forma a manter o grupo homogêneo e elevar as chances de remissão clínica e endoscópica para uma comparação da composição microbiana entre seu status prévio e após a terapia.

Apesar da PCR e da VHS serem marcadores de atividade inflamatória amplamente utilizados para avaliação da resposta terapêutica através dosagens séricas, observamos redução nominal destes marcadores, porém sem significância estatística, o que pode ter sido afetado pelo pequeno número de indivíduos associados à ampla variação dos resultados^{123,124}. O estudo não avaliou níveis fecais de calprotectina, o que poderia trazer maior sensibilidade à avaliação de resposta terapêutica através de marcadores laboratoriais¹²⁵. Observou-se significativa melhora dos níveis de albumina e hemoglobina, que embora sejam utilizados principalmente como marcadores de déficits nutricionais, também são considerados marcadores de resposta terapêutica^{124,126}.

7.3 Fatores Familiares

Diversos fatores ambientais são capazes de interferir na composição microbiana alterando tanto a alfa quanto a beta diversidade¹²⁷. A alfa e a beta diversidade são termos utilizados em ecologia para descrever a diversidade de espécies em diferentes contextos ou escalas. A alfa diversidade refere-se à diversidade de espécies dentro de um determinado habitat (uma medida de quão rica e variada é a comunidade biológica em um único local). A beta diversidade

descreve a variação da diversidade de espécies entre diferentes habitats (comparação entre diversidade de espécies de dois ou mais locais e pode refletir a taxa de substituição de espécies)^{128,129}. Ao longo da vida, os fatores ambientais modificam nossa microbiota onde a colonização na primeira infância e a adoção de hábitos permanentes formam uma espécie de “assinatura” da microbiota, enquanto alterações de hábitos passageiras, como uma viagem ou a necessidade de utilização de antibióticos por curto período modificam a alfa e beta diversidade, porém tendem a regredir após a interrupção daquela exposição¹²⁸.

Somente um paciente apresentava história familiar de Doença Inflamatória Intestinal e embora este valor, equivalente a 14% da amostra seja baixo, corrobora com alguns dados literários que relatam (com grande variação, especialmente de acordo com o local da pesquisa) um histórico familiar positivo entre 1,5 e 28% na DC¹³⁰⁻¹³². A herdabilidade é mais relevante da DC que na RCU, onde o risco parentes de primeiro grau de portadores de DC desenvolverem a doença é de oito vezes mais que a população geral, enquanto na RCU é quatro vezes¹³³. Interessantemente, os dados do biobanco do Reino Unido demonstram que, referente aos pacientes que iniciam a DII na idade adulta, o risco de seus familiares desenvolverem a doença podem ser reduzidos pela metade caso ocorra a redução de fatores expositores de risco e adesão de um estilo de vida saudável¹³⁴.

7.4 Fatores Ambientais

Dentre os fatores ambientais que interferem na composição microbiana mais estudados estão: tabagismo, atividade física, idade, dieta, medicamentos, etnia, estresse e distúrbios do sono¹³⁵.

O tabagismo atua de forma ambígua nas DII, sendo um fator de piora clínica e de complicações pós-operatórias na Doença de Crohn enquanto parece ter efeito redutor da atividade inflamatória na RCU¹³⁶. Nenhum paciente era tabagista ativo e aqueles que já haviam fumado tinham mais de 10 anos de interrupção até a data de diagnóstico da DC. Não observamos diferença entre os grupos que nunca fumaram e de ex-fumantes em relação as mudanças da composição dos filos nos dois momentos de avaliação. O tabagismo promove alte-

rações microbianas e metabólicas e estudos demonstram que após a interrupção do consumo de cigarros parece ocorrer uma transição da composição microbiana para uma redução do filo Bacteroidetes e aumento dos filos Firmicutes e Actinobacterias. Esta alteração também ocorre em pacientes com tendência e recorrência de obesidade e foi associada a ex-fumantes que apresentaram flutuações de peso após a cessação do tabaco. Não existem trabalhos de longo período de avaliação que relatem alterações permanentes da microbiota de ex-fumantes⁸⁷.

Em relação à atividade física, notamos um aumento significativo na população do filo Fusobacteria em praticantes de atividade física quando comparados aos indivíduos sedentários. Esta correlação contrasta com as descrições literárias. Este é um filo pouco conhecido, que por muito tempo foi considerado uma ramificação da família Bacteroidaceae (do filo Bacteroidetes), consistindo em uma única classe (Fusobacteria), única ordem (Fusobacteriales) com duas famílias: *Fusobacteriaceae* e *Leptotrichiaceae*. É um filo com maior abundância na cavidade oral e na microbiota vaginal e a sua pequena representatividade simbiótica na microbiota intestinal está relacionada a capacidade de metabolizar ácidos graxos de cadeia curta. O gênero *Fusobacteria* sofre alterações fenotípicas de acordo com as condições de seu meio e a espécie *F. nucleatum* possui uma bioquímica de parede celular com várias enzimas produtoras de sulfeto de hidrogênio^{105,137}. Esta substância, em baixos níveis, tem ação protetora neutralizando moléculas reativas, regulando positivamente o sistema antioxidante e promovendo ação anti-inflamatória, porém em níveis acumulados, são tóxicos pela inibição do citocromo C oxidase e reduzindo a produção celular de ATP. O sulfeto de hidrogênio prejudica ainda a oxidação do butirato pelos colonócitos e estes fatores são relacionados com carcinogênese e as DII^{138,139}.

A atividade física vem sendo relacionada a maior diversidade bacteriana, com maior expressão de genes capazes de realizar biossíntese de carboidratos e aminoácidos aumentando o fornecimento de energia¹⁴⁰. Embora não existam evidências para afirmar que a atividade física seja suficiente para reduzir a abundância do filo Fusobacteria, especialmente da espécie *Fusobacterium nucleatum* (frequentemente descrita como associada ao câncer colorretal), não existem relatos de associação com o aumento e, pelo contrário, a atividade física é relacionada com aumento da abundância de espécies relacionadas à proteção contra

o câncer colorretal como a *Akkermansia muciniphila* e as espécies *Faecalibacterium*¹⁴¹. Devido à pequena casuística deste estudo é improvável que exista correção entre o aumento do filo Fusobacteria e a atividade física, porém mais estudos são necessários para afirmar que se trata de uma coincidência estatística.

Não observamos diferenças entre filos dos pacientes que tinham contato ou não com animais de estimação. A exposição a animais está associada ao aumento da diversidade microbiana. Com a urbanização, o contato com animais de estimação vem ocupando o lugar do contato selvagem e as avaliações entre os tipos de exposição são escassas. De acordo com a organização *Growth from Knowledge*, a população brasileira se destaca na criação de animais de estimação, somos o terceiro país do mundo com mais famílias com cachorros, correspondendo a 58% dos lares brasileiros comparados com 33% dos lares no mundo. No Brasil e no mundo, os cachorros são os principais animais de estimação, seguidos de gatos, peixes e aves¹⁴². Os estudos envolvendo comparações da microbiota intestinal e animais de estimação demonstram maior impacto da exposição nos primeiros anos de vida, onde a presença do contato com estes animais parece amadurecer de forma mais rápida a microbiota humana^{44,143}. O contato com animais de estimação (domesticados) ainda levanta o debate sobre a microbiota do próprio animal, onde estudos demonstram que a microbiota animal tende a se alterar de acordo com os hábitos de seus donos, ao fornecer hábitos e alimentos inadequados¹⁴⁴.

O ciclo circadiano é o ciclo sono-vigília endógeno, responsivo ao claro e ao escuro, que ocorre em todos os organismos vivos. Por muito tempo, este ciclo foi considerado próprio da linhagem eucariota até que um estudo com a espécie *Synechococcus* (do filo Cyanobacteria) descreveu um ciclo circadiano controlando a fixação de nitrogênio e a absorção de aminoácidos¹⁴⁵. Os micróbios em simbiose influenciam os ciclos diários do hospedeiro. O sistema de relógio circadiano dos mamíferos é controlado principalmente pelos núcleos supraquiasmáticos do hipotálamo (SCN) que recebem informações da entrada de raios de luz pela retina através do sistema retino-hipotalâmico, transmitindo informações para outras regiões do cérebro e outros órgãos. Especificamente sobre a microbiota intestinal, o ciclo parece atuar em duas frentes, a primeira através de hor-

mônios e alteração do metabolismo e a segunda através de oscilações da imunidade inata e adaptativa. Logo, existe oscilação entre a microbiota intestinal e seus metabólitos, de acordo com o horário da avaliação¹⁴⁶.

A média de horas de sono da coorte foi de 6,14 horas, abaixo do recomendado de acordo com a Academia Americana de Medicina do Sono, em que orienta de período maior ou igual a sete horas de sono enquanto a Fundação Nacional do Sono recomenda entre sete e nove horas para indivíduos com até 65 anos de idade e entre sete e oito horas aos maiores de 65 anos^{147,148}. Avaliemos a composição de filos bacterianos em indivíduos com tempo menor ou igual a seis horas de sono ao dia versus o grupo que dormia mais de 6 horas ao dia e não observamos diferenças significantes.

O emagrecimento é um sintoma comum e sinal de alerta para o diagnóstico da Doença de Crohn¹⁴⁹. Apesar do amplo reconhecimento do índice de massa corporal, a avaliação isolada deste índice pode não representar o real status nutricional do paciente^{150,151}. Neste estudo, a média do IMC ao diagnóstico foi 21,6kg/m² considerado um valor adequado pela classificação, porém quando comparado ao peso usual (antes do início dos sintomas da DC), havia uma redução de 19% do peso corporal, com um IMC inicial médio de 26,7kg/m² (p=0,005). Portanto, o IMC, de forma isolada, não tem boa correlação com o estado nutricional, sendo mais sensível aos pacientes com DII em seus valores extremos. Já a variância de seu valor nos últimos seis meses ou um valor de IMC < 18,5Kg/m² são meios mais fidedignos de apontar a má nutrição do portador de DII, especialmente quando associados a níveis de albumina menores que 3g/dL¹⁵⁰.

7.5 O hábito alimentar

O estímulo ou a inibição do crescimento de determinada espécie ou comunidade microbiana pode ser promovido por alimentos, dentre outros fatores. A dieta do hospedeiro afeta a abundância das bactérias intestinais e a cinética do seu crescimento. Nos humanos, uma dieta rica em produtos de origem animal aumenta a população de bactérias tolerantes a bile (ex: espécies do filo Bacte-

roidetes) e a redução de espécies do filo Firmicutes, que metabolizam polissacarídeos vegetais^{128,152}. Para o equilíbrio entre a formação e a degradação do muco, destacam-se os carboidratos indigeríveis que são denominados polissacarídeos (ou glicanos), sendo os alimentos vegetais a principal fonte destas substâncias, que podem também ser encontradas em algumas fontes animais, fúngicas e de algas

Os pacientes foram avaliados em dois momentos em relação a ingestão de determinados grupos alimentares sem que ocorresse nenhum tipo de intervenção dietética profissional. Tanto previamente ao tratamento quanto após a terapia biológica, ocorreu baixa ingestão de fontes vegetais quando comparados com as recomendações ideais de ingestão¹⁰³. Apesar da ausência de intervenção nutricional profissional o padrão alimentar dos pacientes apresentou mudanças, especialmente em relação as frutas, legumes e tubérculos, doces e fontes proteínas. Essa mudança pode ser atribuída, pelo menos em parte, ao amplo acesso da população à informações nutricionais através de grupos de apoio online aos pacientes, mídias sociais e canais oficiais de órgãos saúde ou de estudo das DII¹⁵³⁻¹⁵⁵. Tais alterações serão detalhadas a seguir.

7.5.1 Leguminosas

As leguminosas, grupo representado especialmente pelos feijões, ervilhas, grão de bico e lentilha, foram as principais fontes alimentares provenientes dos vegetais, provavelmente pelo hábito alimentar brasileiro que, semelhante aos países não desenvolvidos e em desenvolvimento, inclui o feijão (e outras leguminosas) como base das principais refeições¹⁵⁶. Apesar disso, o consumo da coorte se mostrou abaixo da metade do recomendado¹⁰³. As leguminosas tem alto teor de fibras e proteínas, com efeitos na saúde humana como no fornecimento de fitoquímicos (especialmente ferro e proteínas) e outros efeitos diretamente ligados a saúde intestinal¹⁵⁶. Ingerir regularmente leguminosas é uma solução prática para alcançar níveis adequados de consumo de fibras. Além disso o amido é o principal carboidrato das leguminosas (em média, 50% do total), e alguns amidos estão na forma de fibra alimentar, denominados Amido Resistentes (AR), um ingrediente prebiótico¹⁵⁷. Ao chegarem no cólon e serem utilizados

como fonte energética pela microbiota, ocorre liberação de metabólitos que, dentre outras funções, aumenta a saciedade, reduzem o colesterol e a gordura visceral além de permitir o maior espessamento da camada de muco¹⁵⁸.

Algumas bactérias utilizam dos AR ou seus produtos metabólicos. Os degradadores primários, ou seja, aqueles capazes de degradar a estrutura intacta dos grânulos, liberam como produtos secundários os oligossacarídeos, acetato e lactato. Dentre os principais degradadores primários estão: *Bifidobacterium adolescentes* e *Ruminococcus bromii*⁵⁰.

Os degradadores secundários podem degradar o amido normal, mas utilizam principalmente os subprodutos dos degradadores primários. Os principais representantes deste grupo são: *Eubacterium rectale*, *Roseburia*, *Butyrivibrio*, *Bacteroides thetaiotaomicron* e *Bifidobacteria*. Dentre as principais ações benéficas está a produção do butirato como subproduto dos AR⁵⁰.

O grupo estudado demonstrou níveis baixos (mediana inferior a 0,001%) ou não detectaram as bactérias *Bifidobacterium adolescentes*, *Ruminococcus bromii*, *Eubacterium rectale* e *Butyrivibrio* em ambos os períodos de estudo. Já os gêneros *Roseburia* e *Bifidobacteria* e a espécie *Bacteroides thetaiotaomicron* demonstraram aumento nominal entre os tempos de estudo.

7.5.2 Frutas

As frutas contêm bioativos que regulam significativamente a estrutura e a composição da microbiota intestinal. O consumo regular de frutas está associado ao menor risco de disbiose. Dentre as substâncias bioativas destacam-se os polissacarídeos, oligossacarídeos e os compostos flavanoides. Elas agem de forma direta sobre a microbiota, como uma espécie de aprimoramento imune através da ativação de lisozimas controlando espécies patogênicas como espécies de *Escherichia coli* e *Salmonella* e enriquecendo a população microbiana com *Lactobacillus* e *Bifidobacterias*¹⁵⁹. A principal ação das frutas sobre a estrutura microbiana se dará pelos seus metabólitos, especialmente pela liberação de AGCG (especialmente ácido acético, ácido propiônico e butirato), que promovem estabilidade da interação intestino-barreira-microbiota, além de fornecer energia e outros metabólitos com ação sistêmica^{160,161}.

A recomendação média de porções de frutas por semana chega a 21, quase sete vezes mais que a média apresentada pelo grupo antes de iniciar o tratamento e que, apesar do significativo aumento do consumo, se manteve aproximadamente quatro vezes menor que as recomendações. O estudo não avaliou qual o tipo de fruta consumida embora exista diferenças no estímulo microbiológico conforme o subtipo de fruta ingerida¹⁵⁹.

O Brasil tem um vasto cardápio de frutas nativas, embora tenha adicionado outras frutas como a banana, o mamão e a laranja à rotina alimentar nacional. Dentre as frutas nativas mais consumidas variam conforme a regionalização sendo as principais: acerola, açaí, baru, buriti, goiaba, jabuticaba, juçara e maracujá. Todas elas são ricas em substâncias bioativas capazes de modular a composição e a atividade metabólica da microbiota intestinal¹⁶². Existe grande interesse no estudo das brasileiras e de outras frutas silvestres (comumente chamadas de “*berries*” e representadas pela uva, mirtilo, morango, framboesa, groselha, dentre outras) por conterem grande quantidade de polifenóis. Devido ao seu grande tamanho, os flavanoides (derivados dos polifenóis) são pouco absorvidos no intestino delgado (<10%). No íleo e cólon, estas substâncias interagem com o microbioma resultando em uma extensa quantidade de metabólitos fenólicos absorvíveis¹⁶³. Embora estas substâncias sejam mais estudadas devido a capacidade de neuromodulação e estar associada a redução de doenças neurodegenerativas, a nível intestinal, seus metabólitos parecem promover aumento da espécie *Akkermansia muciniphila* (associada ao aumento da integridade da barreira intestinal e à redução da inflamação intestinal), redução de níveis de IL-4 e IL-5, e ao bloqueio da via de ativação NF- κ B^{163–166}.

O consumo regular de frutas parece se correlacionar com o aumento do filo Bacteroidete, das famílias *Ruminococcaceae*, *Lactobacillaceae*, dos gêneros *Bifidobacteria*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Roseburia* e da espécie *Akkermansia muciniphila*¹⁵⁹. O grupo estudado apresentou aumento numérico da família *Ruminococcaceae* e redução não significativa da família *Lactobacillaceae*. Não observamos oscilações significantes entre os gêneros acima citados e notamos uma baixa abundância da espécie *Akkermansia muciniphila*, indetectável na primeira avaliação com aumento nominal na avaliação final.

7.5.3 Verduras (folhosos)

Dentre os alimentos de origem vegetal, as verduras foram o único grupo com redução de consumo entre o habitual e o quarto mês de terapia biológica. Embora não tenha sido uma redução significativa, é importante considerar que mesmo antes dos sintomas das DII, o consumo de folhosos já se apresentava muito abaixo do recomendado. Provavelmente, por ser um grupo alimentar rico em fibras insolúveis, capazes de acelerar o trânsito intestinal, e que são frequentemente associadas a sintomas de dor e distensão abdominal, ocorreu a redução do consumo pela autopercepção da relação sintomas *versus* ingestão de folhosos pelos pacientes^{167,168}.

A celulose é o principal componente estrutural das paredes celulares vegetais. Embora as fibras insolúveis tenham menor importância na produção metabólica, alguns microrganismos como *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fibrobacter* e *Ruminococcus*, metabolizam succinato e alguns AGCC, predominantemente o acetato^{167,169}. Especialmente nas DII, o succinato está relacionado à inflamação da mucosa, podendo explicar mais um motivo da piora sintomática dos pacientes ao consumir esta fonte de fibra¹⁶⁷. A espécie *Fibrobacter* não foi identificada nas amostras. Os gêneros *Bacteroides*, *Clostridium* e *Ruminococcus* mantiveram-se estáveis nas avaliações.

7.5.4 Legumes

Os legumes e tubérculos foram a fonte alimentar vegetal de menor consumo. Interessantemente são fontes de fibras de baixa associação com sintomas como aceleração do trânsito intestinal ou sintomas suboclusivos¹⁶⁸. Isto ocorre por muitas representantes terem alto teor de fibras solúveis e baixo teor de fibras insolúveis, especialmente a celulose¹⁶⁹. Legumes e tubérculos correspondem a vários grupos alimentares como frutos (ex: abóbora, beringela, chuchu), raízes (ex: beterraba, cenoura, mandioca) e tubérculos (batatas)^{170,171}.

Este grande grupo alimentar compõe a maior parte da Dieta Mediterrânea, junto a derivados do leite, proteína do peixe, azeite de oliva e vinho tinto seco. O

consumo regular deste grupo alimentar aumenta a abundância de *Faecalibacterium prausnitzii* e *Roseburia* e reduz a presença de *Ruminococcus gnavus*, *Collinsella aerofaciens* e *Ruminococcus torques*¹⁷².

No relação entre as DII e a dieta Mediterrânea já podemos ter afirmações em três situações: (I) a capacidade de prevenir as DII reduzindo a calprotectina fecal (CPF), aumentando a diversidade microbiota e a produção de AGCC em parentes de primeiro grau de portadores de DII; (II) o impacto positivo sobre as DII reduzindo a atividade de doença e os marcadores de atividade inflamatória e mantendo baixos níveis de CPF na DII quiescente; (III) benefícios sistêmicos ao portador de DII como aumento da qualidade de vida, redução da gordura visceral, aumento do HDL colesterol, da diversidade microbiana e consequentemente do fornecimento energético e de metabólitos ativos protetores oriundos dos AGCC¹⁷². Recentemente, a Associação Americana de Gastroenterologia publicou uma série de recomendações sobre nutrição e DII e de forma geral, a dieta Mediterrânea foi a única identificada, na metodologia da revisão, como capaz de exercer benefícios aos portadores de DII, salvo em situações especiais como múltiplas estenoses, amplas ressecções intestinais, dentre outras¹⁶⁸.

O consumo médio de legumes aumentou de forma significativa na segunda avaliação mas apesar do aumento, permaneceu sete vezes abaixo das recomendações de consumo semanal para este grupo alimentar¹⁰³. Quanto as principais bactérias que respondem ao consumo destes alimentos notamos um aumento numérico nas medianas de *Faecalibacterium prausnitzii* e *Roseburia*, o que coincide com os achados literários, mas também notamos aumento não significativo das espécies *Ruminococcus gnavus* e *Ruminococcus torques*. Estas espécies estão correlacionadas a doenças autoimunes, imunomediadas e transtornos psíquicos como a tireoidite de Hashimoto, as DII e o autismo, respectivamente^{173,174}.

7.5.5 Carnes processadas

Não existe recomendação para o consumo de carnes processadas, devendo seu consumo ser recreativo e menor que uma porção semanal⁹¹. Durante a primeira avaliação, o consumo médio deste grupo alimentar era de seis por-

ções semanais, e embora não tenha se mostrado significativo, ocorreu importante redução do consumo após os primeiros quatro meses de avaliação, atingindo a média de uma porção semanal. As carnes processadas são ricas em compostos nitrosos utilizados principalmente como conservantes e estas substâncias são sabidamente cancerígenas¹⁷⁵. Apesar dos efeitos nocivos deste grupo alimentar, ainda não existem evidências que corroborem que o consumo de carnes processadas modifica a microbiota intestinal diferentemente de carnes *in natura*¹⁷⁶. Alguns estudos experimentais em ratos apontam que a adição de substâncias probióticas à carne processada podem aumentar a abundância de bactérias fermentadoras de AGCC porém não reduzem a elevação da abundância de bactérias relacionadas ao consumo de proteínas (que serão abordadas separadamente)^{177,178}.

7.5.6 Doces (açúcares e doces processados)

Açúcares oriundos de doces devem ser consumidos esporadicamente, não sendo uma necessidade fisiológica. O açúcar tem 5-10 vezes mais calorias por grama que a maioria das frutas⁹¹. A média do consumo de doces da coorte foi de 4,8 porções semanais com redução significativa na segunda avaliação para 3,5 porções semanais, porém esta análise se prejudicou devido a grande variação de consumo entre os integrantes da pesquisa. A mediana de consumo para ambas as avaliações foi igual.

Poucos estudos em humanos avaliaram o alto consumo de açúcares e doces processados enquanto pesquisas experimentais, especialmente em ratos, apontam que existe uma espécie de ciclo entre consumo de açúcares, estímulo microbiano e estímulo ao consumo destes carboidratos simples. Tais estudos apontam para este ciclo uma das causas da obesidade, mas o mecanismo metabólico deste eixo intestino-cérebro ainda não é bem compreendido¹⁷⁹. A escassez de estudos sobre açúcares e microbiota intestinal se dá pelo fato de que quase todos os açúcares serão absorvidos no intestino delgado, com pouca ou nenhuma participação destes alimentos na metabolização da microbiota colônica, com exceção de situações como as intolerâncias às dissacaridases por exemplo¹⁸⁰. A maior concentração de estudos envolvendo microbiota e açúcares

se refere à alta ingestão de frutose, especialmente via sucos de frutas, que está associada a síndrome metabólica (com destaque para obesidade central e esteatose hepática)¹⁸¹. Este estudo não forneceu dados que permitissem a avaliação segmentada dos principais açúcares: glicose, frutose e lactose.

7.5.7 Ultraprocessados

Com a produção alimentar em larga escala, a subdivisão dos alimentos de acordo com o perfil nutricional passou a ser acompanhada por uma segunda classificação, referente ao grau de processamento. Dentre várias classificações, a NOVA é a mais citada que subdivide os alimentos em quatro categorias: alimentos não processados ou minimamente processados, ingredientes culinários processados, alimentos processados e alimentos ultraprocessados (AUP). Os alimentos com alto grau de processamento, independente da nomenclatura (ultraprocessados, super processados etc.) podem ser prejudiciais à saúde¹⁸²⁻¹⁸⁴. Os ultraprocessados já correspondem a metade dos alimentos consumidos pelas famílias de países desenvolvidos e, no Brasil e outros países latinos, correspondem a 1/5 - 1/3 das refeições¹⁸². Esta afirmação coincide com os achados deste estudo que apontam uma frequência baixa (e ideal) de consumo de AUP, porém é preciso considerar que foi definido ao paciente como AUP aqueles enlatados, empacotados ou encaixotados prontos para o consumo, permitindo que alimentos como adoçantes, temperos e formulações não fossem avaliados.

Dentre o conteúdo dos alimentos ultraprocessados estão os adoçantes artificiais. Uma recente pesquisa realizada na população norte americana com DII apontou que os pacientes com hábitos alimentares mais saudáveis consumiam adoçantes artificiais ao invés de açúcar, sugerindo que os pacientes consideravam os adoçantes artificiais saudáveis ou tinham preferências por sabores e produtos adoçados artificialmente¹⁸⁵.

Os alimentos ultraprocessados são formulações com grande parte de ingredientes uso industrial. Vários processos seguirão até o produto (daí “ultraprocessados”). Citaremos alguns processos de preparação¹⁸²:

- i. Fracionamento de alimentos integrais em substâncias que incluem açúcares, óleos e gorduras, proteínas, amidos e fibras, frequentemente obtidas a partir de alimentos vegetais de alto rendimento ou da trituração ou moagem de carcaças de animais.
- ii. Algumas substâncias são submetidas hidrólise, hidrogenação, ou outras modificações químicas.
- iii. Montagem do alimento: técnicas industriais como extrusão, moldagem e pré-fritura.
- iv. Cores, aromatizantes, emulsionantes e outros aditivos são frequentemente adicionados para tornar o produto palatável ou hiperpalatável.
- v. Aditivos que prolongam a duração do produto, protegem as propriedades originais e evitam a proliferação de microrganismos podem ser utilizados tanto em alimentos processados como ultraprocesados.
- vi. Substâncias alimentares de nenhum ou raro uso culinário incluem açúcares (frutose, xarope de milho rico em frutose, concentrados de suco de frutas, maltodextrina, dextrose, lactose), óleos modificados (óleos hidrogenados ou esterificados), fontes de proteínas (proteínas hidrolisadas, proteína isolada de soja, glúten, caseína, proteína de soro de leite), aromatizantes, intensificadores de sabor, corantes, emulsificantes, adoçantes, espessantes e agentes anti-espumantes, agentes espumantes, gelificantes etc.

Aditivos alimentares demonstram interferir diretamente sobre a camada de muco, essencial para a homeostase intestinal. A maltodextrina (polissacárido utilizado como espessante) vem demonstrando ser capaz de interferir na capacidade de produção de muco pelas células caliciformes, especialmente da proteína mucina-2 (uma barreira química que impede a adesão bacteriana), reduzindo a capacidade da camada de muco de isolar os colonócitos do contato direto com a microbiota¹⁸⁶.

As nanopartículas de prata e titânio utilizadas amplamente como corantes e antimicrobianos são capazes de alterar a composição microbiana além de reduzir a produção de mucinas neutras e ácidas desde o íleo terminal até o reto¹⁰⁰.

Emulsificantes e espessantes como a Carragena, a Carboximetilcelulose e o Polissorbato-80 interagem diretamente com a microbiota e são capazes de reduzir a produção de ACGC em 24 horas após o consumo. Ocorre a alteração da composição microbiana com maior abundância de bactérias pró-inflamatórias. Um foco de atenção das investigações sobre os danos dos aditivos alimentares é a permeabilidade da mucosa. Tais substâncias parecem alterar tanto a permeabilidade transcelular quanto às junções intercelulares¹⁸⁷.

Como ocorre um mecanismo de substituição de dietas com produtos pouco ou não processados para alimentos ultraprocessados, ocorre uma alteração da composição microbiana, reduzindo bactérias metabolizadoras especialmente de AGCC (que possuem as fibras como principal fonte energética, por exemplo as classes *Bifidobacterium*, *Clostridium* (com destaque para *Roseburia* e *Eubacterium rectale*) e *Akkermansia muciniphila* e aumento da abundância de germes não comensais como a *Salmonella* e a *Escherichia coli*. O filo Bacteroidetes tende a reduzir sua abundância perante o Firmicutes, por não ser capaz de adaptar-se a uma dieta com baixo teor de fibras^{188,189}. De forma contrária, a coorte estudada apresentava maior abundância de Bacteroidetes que Firmicutes na primeira avaliação, sendo equiparadas após o tratamento. Como os pacientes não tinham o hábito de consumir alimentos ultraprocessados, este hábito pode justificar a discrepância das alterações encontradas em outras populações, onde a maioria dos estudos são de países com maior consumo de alimentos ultraprocessados que o Brasil.

7.5.8 Gorduras animais e vegetais

Os ácidos graxos são divididos em saturados (AGS), monoinsaturados e poli-insaturados. Existe associação entre o aumento do consumo de AGS com mediadores inflamatórios, podendo seus produtos metabólicos desencadear liberação de interleucinas, interferon, TNF e aumentar os níveis de lipopolissacarídeos séricos. A maioria das fontes de AGC provém de origem animal, como banha de porco, embutidos, gordura da carne e do leite. Existem fontes vegetais deste alimento, como o óleo de coco^{190,191}. O aumento do consumo de AGS está

associado ao aumento expressivo do filo Proteobacterias além de maior observação de bactérias que povoam a pele e a cavidade oral na microbiota intestinal¹⁹². São exemplos de bactérias que aumentam com o consumo de AGS: *Tyzzellerella*, *Negativibacillus*, *Butyricimonas*, *Fusobacterium*, *Bifidobacterium*, *Intestinibacter* e *Veillonella*¹⁹³.

Ainda que com um consumo de gordura subestimado pelo mecanismo da pergunta (que não considerou o tipo de gordura das fontes proteicas) assim como não subdividiu as fontes de gordura animal e vegetal, observamos uma alta frequência de consumo de alimentos gordurosos, quatro vezes acima do recomendado, porém com redução do consumo após o início da terapia. A coorte apresentou grande abundância das Proteobacterias no início do estudo com significativa redução após os quatro meses de terapia. Não se observou alteração entre a abundância de *Butyricimonas*, *Fusobacterium*, *Bifidobacterium*, *Intestinibacter* e *Veillonella* nos dois tempo de estudo.

7.5.9 Fontes proteicas

A carne vermelha (bovina e suína) foi a maior fonte de proteína animal variando entre alimentos preparados com carne *in natura* (este com maioria), e alimentos com carne processada. A Organização Mundial de Saúde recomenda contra o alto consumo de carnes, especialmente a carne vermelha pois o seu aquecimento para preparo resulta em compostos químicos nocivos. A Agência Internacional de Investigação sobre o Câncer qualifica a carne vermelha como provavelmente cancerígena para humanos (Grupo 2A) enquanto classifica as carnes processadas como cancerígenas aos seres humanos (Grupo 1)¹⁹⁴. Apesar disso a carne é uma fonte de proteína de alta qualidade com grande quantidade de nutrientes essenciais como ferro, zinco e vitamina B12. Seu consumo em moderada quantidade parece afetar positivamente a microbiota intestinal, elevando por exemplo a abundância do gênero *Lactobacillus*¹⁷⁶.

Há uma tênue separação (ainda não completamente esclarecida) entre a quantidade ideal de consumo de carne vermelha e a quantidade promotora de efeitos deletérios. Tais efeitos ocorrem pelos metabólitos bacterianos, porém não

pela sua presença (que é essencial) mas pela quantidade. A maioria das proteínas dietéticas em nossas refeições são hidrolisadas em aminoácidos ou peptídeos pelas proteases e peptidases. Existe metabolização bacteriana destas substâncias desde o intestino delgado, mas com maior concentração no cólon, especialmente em suas porções distais. Como produtos da metabolização estão principalmente os AGCC, amônia, indol, fenol, poliamina e sulfeto de hidrogênio¹⁹⁵. Em condições elevadas, fenóis e indóis são considerados carcinogênicos e as poliaminas, utilizadas no crescimento e proliferação de bactérias no cólon, passam a ser utilizadas por células cancerígenas para manter sua mitose contínua¹⁹⁶⁻¹⁹⁸.

O alto consumo de carnes está associado ao aumento da abundância dos gêneros *Bifidobacterium*, *Clostridia*, *Bacteroides* e *Lactobacillus*¹⁹⁶. Notamos uma redução significativa da média de consumo de carne bovina. Em relação a carne suína, o consumo se manteve estável. Observamos aumento não significativo da abundância do gênero *Bifidobacterium* e da família *Bacteroidaceae*, estabilidade no gênero *Clostridia* e redução do Gênero *Lactobacillus*.

Sem que ocorresse nenhum tipo de recomendação formal por parte da equipe de atendimento, ocorreu maior consumo de fontes proteicas de baixo teor de gordura como peixe (com aumento significativo) e ovo. Estas proteínas são associadas a maior facilidade de digestão e melhor tolerância durante surtos de diarreia. Em relação ao consumo de peixes, são fontes de ácidos graxos poli-insaturados, que estão correlacionados ao aumento da abundância de *Bifidobacteria*, *Lactobacillus*, *Clostridia coccoides*, *Enterobacteriaceae* e *Bacillus*. Observamos um aumento nominal das Bifidobactérias e estabilidade na família *Enterobacteriaceae*. As demais bactérias não foram encontradas nesta avaliação.

No Brasil o leite de vaca é um alimento culturalmente adicionado ao café da manhã e utilizado como ingrediente no preparo de alimentos. Por ser uma ótima fonte de proteínas, sais minerais e vitaminas, tem sido recomendado o consumo de 7-14 porções semanais de fontes não ou minimamente processadas⁹¹. A média do consumo de porções semanais de leite e tipos de queijo no início do estudo era de três porções cada um, reduzindo para 2,3 e 2,7 porções, respectivamente, ao final do estudo. O consumo de leite e derivados está dire-

tamente relacionado à abundância de espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterias* e a baixa ingestão destes nutrientes pode explicar a baixa abundância dos gêneros nas amostras¹⁹⁹.

7.6 Avaliação da microbiota

Vários pacientes que finalizaram o estudo não foram incluídos por dificuldade na extração do ácido nucleico em suas amostras fecais. As dificuldades técnicas neste tipo metodologia é uma ocorrência frequente relatada em investigações semelhantes^{200–203}. No cenário das DII, a grande quantidade de água ou de produto consequente da inflamação misturado às fezes pode ter aumentado as taxas de insucesso da avaliação. Futuramente, em um segundo protocolo para pesquisa, poderia ser comparado a avaliação da microbiota de pacientes com diarreia e uma nova avaliação dos mesmos pacientes, porém com maior concentração das fezes ocasionada pela inibição da secreção de água com o uso concomitante de racecadodril, ou pelo aumento do tempo de trânsito colônico com o uso de loperamida por exemplo^{204,205}.

Não foi avaliada a composição microbiana através de biópsias e isto pode ter subestimado a abundância especialmente do filo Proteobacteria, que tem maior capacidade de adesão à mucosa^{206–208}. Apesar deste conhecimento ser estabelecido, não existe uma metodologia validada para a avaliação em conjunto dos dois tipos de amostras²⁰⁰.

Quanto à comparação da microbiota da população do estudo, a composição bacteriana prévia à terapia foi o comparador da avaliação microbiana posterior à indução terapêutica. Não existe um comparador ideal, tampouco um valor de referência. A comparação precisa da microbiota entre diferentes populações ou indivíduos apresenta desafios metodológicos e conceituais. A busca por um "comparador ideal" permanece elusiva, exigindo abordagens inovadoras e a compreensão das limitações inerentes a cada método. Ainda que a comparação entre indivíduos que residem juntos ou compartilhem hábitos seja questionada, cada indivíduo possui uma microbiota única, moldada por fatores genéticos e ambientais ao longo da vida^{209–215}. Na ausência de um comparador ideal, a com-

paração da microbiota intestinal de populações estudadas com populações saudáveis se torna uma alternativa pragmática. Essa abordagem permite identificar diferenças entre grupos e explorar possíveis associações com fatores de saúde e doença^{38,133,216,217}.

7.6.1 Avaliação da microbiota: Filos

A maioria dos estudos que apontam as oscilações da abundância dos filos da DII provém de outras populações. Diferentemente da literatura, que aponta maior abundância do filo Firmicutes em relação as Bacteroidetes, este estudo demonstrou maior abundância das Bacteroidetes na primeira avaliação e corrobora com dados de avaliação da composição bacteriana na população brasileira²¹⁷. Após quatro meses, considerando que a maioria dos pacientes já se encontravam em remissão clínica e endoscópica da DC, ocorreu um aumento do filo Firmicutes, atingindo níveis semelhantes ao apontado como comum na população mundial e brasileira²¹⁷. Um hábito diferencial que poderia justificar a discordância entre a população brasileira e outros estudos é que a redução das Bacteroidetes é sempre associada a ausência ou muito baixa ingestão de fontes metabólicas para este filo (como as fibras, GOS, FOS, leite e seus derivados). Embora o consumo destes alimentos ainda não tenha sido adequado, a maioria dos pacientes consumia-os todas as semanas e os estudos apontam que há uma diferença alimentar entre os países socioeconomicamente evoluídos e aqueles em evolução, ao qual se enquadra o Brasil^{189–191}. O tamanho amostral reduzido pode ter refletido na relevância estatística do notável incremento da população de Firmicutes durante a segunda avaliação da composição microbiana.

A abundância elevada das Proteobacterias se mostrou preocupante e concordante com os dados literários que demonstrou ocorrer um aumento da população deste filo tanto relacionado a atividade inflamatória quanto relacionado às complicações^{206–208,221}. Após o período de 4 meses observou-se a redução significativa da abundância deste filo sem que tivesse ocorrido nenhuma intervenção nutricional ou adequação dos componentes alimentares dentro das recomendações^{91,103}. Como a maioria dos pacientes apresentou resposta tera-

pêutica adequada, podemos sugerir que a redução da atividade inflamatória intestinal foi inversamente relacionada à abundância da colonização pelo filo Proteobacterias, e que apesar das espécies deste filo aumentarem o contato com a mucosa e retroalimentarem o processo inflamatório, este não parece ser um mecanismo independente, necessitando de um processo inflamatório prévio²⁰⁷. O aumento de Proteobacterias na microbiota intestinal reflete uma instabilidade da comunidade bacteriana local, modificação do status simbiótico deste filo e maior interação e ação do sistema imune sobre a mucosa, tanto na ausência de doenças quanto nas doenças inflamatórias intestinais e desordens metabólicas²²¹.

7.6.2 Avaliação da microbiota: Famílias e Espécies

Apesar de termos avaliados pouco mais de 300 espécies bacterianas e observamos um aumento nominal do número de espécies da avaliação dos pacientes tratados em comparação ao período prévio ao tratamento, este aumento não foi significativo, mantendo a alfa diversidade estável. É válido destacar que temos conhecimento de cerca de 1000 espécies colonizadoras do tubo digestivo que podem ser identificadas nas análises fecais, desta forma observamos a pequena diversidade da comunidade bacteriana da coorte e constatamos a pobreza de espécies^{40,43,74,97}. Podemos observar que apesar da aparente regressão dos filos a quantidades equiparáveis à população saudável, não observamos aumento significativo nas principais espécies metabolizadoras de AGCC ou metabolizadoras de FOS e GOS. Mais importante, não observamos alteração na alfa diversidade, apontando que apesar da redução de inflamação e da alteração da composição dos filos, os pacientes mantiveram pobreza na diversidade das espécies naquele ecossistema. A figura 7 representa a modificação ampla da composição microbiana entre os períodos de avaliação (representadas pelos filos) e a manutenção da baixa diversidade de espécies apesar da redução da atividade inflamatória (representada pela alfa diversidade).

Diversos mecanismos podem contribuir para a redução da alfa diversidade da população bacteriana intestinal na DC. Os próprios mecanismos inflamatórios da doença, especialmente pela ativação descontrolada da resposta

imune adaptativa (como o aumento da população de células T efetoras que secretam citocinas como o Interferon Gama e a Interleucina 17, e a redução das células T reguladoras)^{222,223}, e também pela ação imune inata (como a ativação excessiva dos receptores Toll-like, que são proteínas de reconhecimento de padrões moleculares que reconhecem antígenos bacterianos, e a disfunção de células dendríticas que apresentam antígenos bacterianos de forma aberrante aos linfócitos) proporcionam significativas mudanças da microbiota comensal^{223,224}.

Um mecanismo chave na deflagração do processo inflamatório é a redução da camada de muco e do fornecimento de ácidos graxos de cadeia curta às células do epitélio intestinal⁵⁸. Não realizamos a avaliação metabolômica, que poderia apresentar respostas sobre a correlação entre a baixa produção destes metabólitos e a atividade inflamatória ou composição bacteriana²⁰¹. A mucosa intestinal atua como barreira física e imunológica, protegendo o organismo de patógenos e toxinas e, conseqüentemente, protegendo a comunidade microbiana de uma resposta inflamatória²²⁵. Um processo de disbiose inicial, por exemplo, ocasionado pela redução do consumo de fibras, poderia induzir o aumento de espécies que sobreviveriam através da utilização do muco como carboidratos, como é o caso do Filo Proteobacterias, proporcionando um aumento da beta-diversidade e redução da alfa-diversidade^{58,186}. Outros fatores como a dieta rica em açúcares e gorduras, o tabagismo e o estresse também são relatados como capazes de induzir a redução da diversidade microbiana^{147,226}.

A restauração da diversidade microbiana em portadores de Doença de Crohn ainda é um desafio¹³⁶. A modificação de exposições ambientais associada à redução do processo inflamatório desempenham papéis cruciais neste processo^{128,222,225,226}. Dentre os expositores ambientais destaca-se a dieta capaz de fornecer probióticos que induzem a colonização por uma microbiota comensal atuante no homeostasia intestinal^{44,55}. O consumo regular de probióticos ou simbióticos (formulações com pré e probióticos) vem sendo estudado porém com poucas evidências de ocasionar benefícios seja na atividade da Doença de Crohn, seja na composição microbiana intestinal²²⁴.

8. Fragilidades do estudo

Embora existam classificações validadas sobre o tipo de dieta e as doenças inflamatórias, este estudo optou pela avaliação do hábito alimentar por relato dos pacientes em relação aos grandes grupos alimentares. Apesar da existência de validação de dietas inflamatórias, ainda não existe um padrão ideal de dieta para portadores de DII, sendo a Dieta Mediterrânea a mais comumente indicada¹⁶⁸. Não conseguimos avaliar a quantidade de gordura em alimentos, o tipo de óleo utilizado nem a quantidade de outras fontes de açúcar (leite e frutas)²²⁷.

Uma avaliação metabólica poderia fornecer melhores informações da relação entre a dieta e o microbioma.

Foram coletadas somente amostras de fezes para a avaliação da composição da microbiota. Sabe-se que os achados da composição de cada amostra são diferentes, a exemplo do filo *Protobacterias* que estão em maior abundância nas amostras histológicas (biópsias da mucosa intestinal) que nas análises fecais²²¹.

O estudo não realizou avaliações de indivíduos saudáveis que vivem no mesmo lar dos participantes, impossibilitando a realização de comparações com saudáveis, pois não há valores de referência para a composição microbiana. Apesar disso existe consenso que a composição do microbioma em indivíduos saudáveis tende a ser semelhante entre populações de hábitos semelhantes. Comparações com bancos preexistentes podem reduzir os custos das análises e proporcionar investimento em outras áreas da pesquisa, como a avaliação metabólica.

9. Conclusões

A terapia com Infliximabe e Azatioprina alterou a composição dos filos, mas não a alfa diversidade.

Não se observou diferenças na composição microbiana com relação a resposta clínica, resposta endoscópica e diferenças nos hábitos de vida.

Conclui-se um estudo piloto com técnica realizada na Universidade Estadual de Campinas para a avaliação da composição bacteriana em adultos portadores de Doença de Crohn. Estabeleceu-se o protocolo para a análise da composição das bactérias intestinais em portadores de Doenças Inflamatórias Intestinais.

10. Referências Bibliográficas

- (1) Fiocchi, C. Inflammatory Bowel Disease Pathogenesis: Therapeutic Implications. *Chin. J. Dig. Dis.* **2005**, 6 (1), 6–9. <https://doi.org/10.1111/j.1443-9573.2005.00191.x>.
- (2) Magro, F.; Gionchetti, P.; Eliakim, R.; Ardizzone, S.; Armuzzi, A.; Barreiro-de Acosta, M.; Burisch, J.; Gecse, K. B.; Hart, A. L.; Hindryckx, P.; Langner, C.; Limdi, J. K.; Pellino, G.; Zagórowicz, E.; Raine, T.; Harbord, M.; Rieder, F.; for the European Crohn's and Colitis Organisation [ECCO]. Third European Evidence-Based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 1: Definitions, Diagnosis, Extra-Intestinal Manifestations, Pregnancy, Cancer Surveillance, Surgery, and Ileo-Anal Pouch Disorders. *J. Crohns Colitis* **2017**, 11 (6), 649–670. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjx008>.
- (3) Gomollón, F.; Dignass, A.; Annese, V.; Tilg, H.; Van Assche, G.; Lindsay, J. O.; Peyrin-Biroulet, L.; Cullen, G. J.; Daperno, M.; Kucharzik, T.; Rieder, F.; Almer, S.; Armuzzi, A.; Harbord, M.; Langhorst, J.; Sans, M.; Chowers, Y.; Fiorino, G.; Juillerat, P.; Mantzaris, G. J.; Rizzello, F.; Vavricka, S.; Gionchetti, P.; on behalf of ECCO. 3rd European Evidence-Based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management. *J. Crohns Colitis* **2017**, 11 (1), 3–25. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjw168>.
- (4) Loftus, E. V. Clinical Epidemiology of Inflammatory Bowel Disease: Incidence, Prevalence, and Environmental Influences. *Gastroenterology* **2004**, 126 (6), 1504–1517. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.01.063>.
- (5) New Insights into the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease: Microbiota, Epigenetics and Common Signalling Pathways. *Swiss Med. Wkly.* **2018**, 148 (1112). <https://doi.org/10.4414/smw.2018.14599>.
- (6) Gearry, R. B. IBD and Environment: Are There Differences between East and West. *Dig. Dis.* **2016**, 34 (1–2), 84–89. <https://doi.org/10.1159/000442933>.
- (7) IBGE, I. B. de G. e E. Sinopse Do Censo Demográfico Brasileiro 2010.
- (8) Parente, J. M. L. Inflammatory Bowel Disease in an Underdeveloped Region of Northeastern Brazil. *World J. Gastroenterol.* **2015**, 21 (4), 1197. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i4.1197>.
- (9) Machado, M. B.; Vieira, A.; Steinwurz, F.; de Vasconcelos, M. I. L. Jornada

Do Paciente Com Doença Inflamatória Intestinal, 2017.

(10) Quaresma, A. B.; Damiao, A. O. M. C.; Coy, C. S. R.; Magro, D. O.; Hino, A. A. F.; Valverde, D. A.; Panaccione, R.; Coward, S. B.; Ng, S. C.; Kaplan, G. G.; Kotze, P. G. Temporal Trends in the Epidemiology of Inflammatory Bowel Diseases in the Public Healthcare System in Brazil: A Large Population-Based Study. *Lancet Reg. Health - Am.* **2022**, *13*, 100298. <https://doi.org/10.1016/j.lana.2022.100298>.

(11) Poli, D. D. Impacto da raça e ancestralidade na apresentação e evolução da doença de Crohn no Brasil. Mestrado em Gastroenterologia Clínica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. <https://doi.org/10.11606/D.5.2007.tde-01082007-164457>.

(12) Torres, J.; Mehandru, S.; Colombel, J.-F.; Peyrin-Biroulet, L. Crohn's Disease. *The Lancet* **2017**, *389* (10080), 1741–1755. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31711-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31711-1).

(13) Satsangi, J. The Montreal Classification of Inflammatory Bowel Disease: Controversies, Consensus, and Implications. *Gut* **2006**, *55* (6), 749–753. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.082909>.

(14) Glassner, K. L.; Abraham, B. P.; Quigley, E. M. M. The Microbiome and Inflammatory Bowel Disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2020**, *145* (1), 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.11.003>.

(15) Singh, S.; Proctor, D.; Scott, F. I.; Falck-Ytter, Y.; Feuerstein, J. D. AGA Technical Review on the Medical Management of Moderate to Severe Luminal and Perianal Fistulizing Crohn's Disease. *Gastroenterology* **2021**, *160* (7), 2512–2556.e9. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.04.023>.

(16) Pogacnik, J. S.; Salgado, G. Perianal Crohn's Disease. *Clin. Colon Rectal Surg.* **2019**, *32* (05), 377–385. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1687834>.

(17) Gasche, C.; Scholmerich, J.; Brynskov, J.; D'Haens, G.; Hanauer, S. B.; Irvine, J. E.; Jewell, D. P.; Rachmilewitz, D.; Sachar, D. B.; Sandborn, W. J.; Sutherland, L. R. A Simple Classification of Crohn's Disease: Report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998: *Inflamm. Bowel Dis.* **2000**, *6* (1), 8–15. <https://doi.org/10.1097/00054725-200002000-00002>.

(18) Levine, A.; Griffiths, A.; Markowitz, J.; Wilson, D. C.; Turner, D.; Russell, R. K.; Fell, J.; Ruemmele, F. M.; Walters, T.; Sherlock, M.; Dubinsky, M.; Hyams,

J. S. Pediatric Modification of the Montreal Classification for Inflammatory Bowel Disease: The Paris Classification. *Inflamm. Bowel Dis.* **2011**, *17* (6), 1314–1321. <https://doi.org/10.1002/ibd.21493>.

(19) Torres, J.; Bonovas, S.; Doherty, G.; Kucharzik, T.; Gisbert, J. P.; Raine, T.; Adamina, M.; Armuzzi, A.; Bachmann, O.; Bager, P.; Biancone, L.; Bokemeyer, B.; Bossuyt, P.; Burisch, J.; Collins, P.; El-Hussuna, A.; Ellul, P.; Frei-Lanter, C.; Furfaro, F.; Gingert, C.; Gionchetti, P.; Gomollon, F.; González-Lorenzo, M.; Gordon, H.; Hlavaty, T.; Juillerat, P.; Katsanos, K.; Kopylov, U.; Krustins, E.; Lytras, T.; Maaser, C.; Magro, F.; Kenneth Marshall, J.; Myrelid, P.; Pellino, G.; Rosa, I.; Sabino, J.; Savarino, E.; Spinelli, A.; Stassen, L.; Uzzan, M.; Vavricka, S.; Verstockt, B.; Warusavitarne, J.; Zmora, O.; Fiorino, G. ECCO Guidelines on Therapeutics in Crohn's Disease: Medical Treatment. *J. Crohns Colitis* **2020**, *14* (1), 4–22. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjz180>.

(20) Imbrizi, M.; Baima, J. P.; Azevedo, M. F. C.; Ribas, A.; Freitas, N. S.; Andrade, L.; Costa, M.; Yukie, L.; Serafim, R.; Botelho, A.; Cintra, A. O. M.; Garcia, E.; Marussi, E.; de Assis, F.; Filho, G. Second Brazilian Consensus on the Management of Crohn's Disease in Adults: A Consensus of the Brazilian Organization for Crohn's Disease and Colitis (GEDIIB). *Second Braz. Consens. Manag. Crohn's Dis. Adults* **2022**, No. Supplement. <https://doi.org/doi.org/10.1590/S0004-2803.2022005S1-02>.

(21) Dubois-Camacho, K.; Ottum, P. A.; Franco-Muñoz, D.; De la Fuente, M.; Torres-Riquelme, A.; Díaz-Jiménez, D.; Olivares-Morales, M.; Astudillo, G.; Quera, R.; Hermoso, M. A. Glucocorticosteroid Therapy in Inflammatory Bowel Diseases: From Clinical Practice to Molecular Biology. *World J. Gastroenterol.* **2017**, *23* (36), 6628–6638. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i36.6628>.

(22) Actis, G. C.; Pellicano, R.; Fagoonee, S.; Ribaldone, D. G. History of Inflammatory Bowel Diseases. *J. Clin. Med.* **2019**, *8* (11), 1970. <https://doi.org/10.3390/jcm8111970>.

(23) Grevenitis, P.; Thomas, A.; Lodhia, N. Medical Therapy for Inflammatory Bowel Disease. *Surg. Clin. North Am.* **2015**, *95* (6), 1159–1182. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2015.08.004>.

(24) Imbrizi, M.; Magro, F.; Coy, C. S. R. Pharmacological Therapy in Inflammatory Bowel Diseases: A Narrative Review of the Past 90 Years. *Pharmaceuticals* **2023**, *16* (9), 1272. <https://doi.org/10.3390/ph16091272>.

- (25) Colombel, J. F.; Mantzaris, G. J.; Rachmilewitz, D.; Diamond, R. H. Infliximab, Azathioprine, or Combination Therapy for Crohn's Disease. *N. Engl. J. Med.* **2010**.
- (26) Panaccione, R.; Ghosh, S.; Middleton, S.; Márquez, J. R.; Scott, B. B.; Flint, L.; Van Hoogstraten, H. J. F.; Chen, A. C.; Zheng, H.; Danese, S.; Rutgeerts, P. Combination Therapy With Infliximab and Azathioprine Is Superior to Monotherapy With Either Agent in Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* **2014**, *146* (2), 392-400.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.10.052>.
- (27) Feuerstein, J. D.; Ho, E. Y.; Shmidt, E.; Singh, H.; Falck-Ytter, Y.; Sultan, S.; Terdiman, J. P.; Sultan, S.; Cohen, B. L.; Chachu, K.; Day, L.; Davitkov, P.; Lebwohl, B.; Levin, T. R.; Patel, A.; Peery, A. F.; Shah, R.; Singh, H.; Singh, S.; Spechler, S. J.; Staller, K.; Thrift, A. P.; Weiss, J. M. AGA Clinical Practice Guidelines on the Medical Management of Moderate to Severe Luminal and Perianal Fistulizing Crohn's Disease. *Gastroenterology* **2021**, *160* (7), 2496–2508. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.04.022>.
- (28) Parigi, T. L.; D'Amico, F.; Abreu, M. T.; Dignass, A.; Dotan, I.; Magro, F.; Griffiths, A. M.; Jairath, V.; Iacucci, M.; Mantzaris, G. J.; O'Morain, C.; Reinisch, W.; Sachar, D. B.; Turner, D.; Yamamoto, T.; Rubin, D. T.; Peyrin-Biroulet, L.; Ghosh, S.; Danese, S. Difficult-to-Treat Inflammatory Bowel Disease: Results from an International Consensus Meeting. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **2023**, *8* (9), 853–859. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(23\)00154-1](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(23)00154-1).
- (29) van Deventer, S. J. Tumour Necrosis Factor and Crohn's Disease. *Tumour Necrosis Factor Crohns Dis.* **1997**, *40* (4), 443–448. <https://doi.org/10.1136/gut.40.4.443>.
- (30) Papadakis, K. A.; Targan, S. R. Role of Cytokines in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Annu. Rev. Med.* **2000**, *51* (1), 289–298. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.51.1.289>.
- (31) Neurath, M. F. Cytokines in Inflammatory Bowel Disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2014**, *14* (5), 329–342. <https://doi.org/10.1038/nri3661>.
- (32) Hanauer, S. B.; Feagan, B. G.; Lichtenstein, G. R.; Mayer, L. F.; Schreiber, S.; Colombel, J. F.; Rachmilewitz, D.; Wolf, D. C.; Olson, A.; Bao, W.; Rutgeerts, P. Maintenance Infliximab for Crohn's Disease: The ACCENT I Randomised Trial. *The Lancet* **2002**, *359* (9317), 1541–1549. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)08512-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)08512-4).

- (33) Sands, B. E.; Anderson, F. H.; Bernstein, C. N.; Chey, W. Y.; Feagan, B. G.; Fedorak, R. N.; Kamm, M. A.; Korzenik, J. R.; Lashner, B. A.; Onken, J. E.; Rachmilewitz, D.; Rutgeerts, P.; Wild, G.; Wolf, D. C.; Marsters, P. A.; Travers, S. B.; Blank, M. A.; van Deventer, S. J. Infliximab Maintenance Therapy for Fistulizing Crohn's Disease. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *350* (9), 876–885. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030815>.
- (34) Dominguez-Bello, M. G.; Godoy-Vitorino, F.; Knight, R.; Blaser, M. J. Role of the Microbiome in Human Development. *Gut* **2019**, *68* (6), 1108–1114. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317503>.
- (35) Hug, L. A.; Baker, B. J.; Anantharaman, K.; Brown, C. T.; Probst, A. J.; Castelle, C. J.; Butterfield, C. N.; Hernsdorf, A. W.; Amano, Y.; Ise, K.; Suzuki, Y.; Dudek, N.; Relman, D. A.; Finstad, K. M.; Amundson, R.; Thomas, B. C.; Banfield, J. F. A New View of the Tree of Life. *Nat. Microbiol.* **2016**, *1* (5), 16048. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.48>.
- (36) Woese, C. R. Towards Anatural System of Organisms: Proposal for the Domains Archaea, Bacteria, and Eucarya.
- (37) Parker, E. A.; Roy, T.; D'Adamo, C. R.; Wieland, L. S. Probiotics and Gastrointestinal Conditions: An Overview of Evidence from the Cochrane Collaboration. *Nutrition* **2018**, *45*, 125–134.e11. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2017.06.024>.
- (38) Turnbaugh, P. J.; Ley, R. E.; Hamady, M.; Fraser-Liggett, C. M.; Knight, R.; Gordon, J. I. The Human Microbiome Project. *Nature* **2007**, *449* (7164), 804–810. <https://doi.org/10.1038/nature06244>.
- (39) Manos, J. The Human Microbiome in Disease and Pathology. *APMIS* **2022**, *130* (12), 690–705. <https://doi.org/10.1111/apm.13225>.
- (40) Sankar, S. A.; Lagier, J.-C.; Pontarotti, P.; Raoult, D.; Fournier, P.-E. The Human Gut Microbiome, a Taxonomic Conundrum. *Syst. Appl. Microbiol.* **2015**, *38* (4), 276–286. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.03.004>.
- (41) Cho, I.; Blaser, M. J. The Human Microbiome: At the Interface of Health and Disease. *Nat. Rev. Genet.* **2012**, *13* (4), 260–270. <https://doi.org/10.1038/nrg3182>.
- (42) Ottman, N.; Smidt, H.; De Vos, W. M.; Belzer, C. The Function of Our Microbiota: Who Is out There and What Do They Do? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2012**, *2*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00104>.
- (43) Gomaa, E. Z. Human Gut Microbiota/Microbiome in Health and Diseases:

A Review. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2020**, *113* (12), 2019–2040. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01474-7>.

(44) Laursen, M. F. Gut Microbiota Development: Influence of Diet from Infancy to Toddlerhood. *Ann. Nutr. Metab.* **2021**, *77* (Suppl. 3), 21–34. <https://doi.org/10.1159/000517912>.

(45) Adak, A.; Khan, M. R. An Insight into Gut Microbiota and Its Functionalities. *Cell. Mol. Life Sci.* **2019**, *76* (3), 473–493. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2943-4>.

(46) Wang, Q.; Guo, H.; Mao, W.; Qian, X.; Liu, Y. The Oral Delivery System of Modified GLP-1 by Probiotics for T2DM. *Pharmaceutics* **2023**, *15* (4), 1202. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15041202>.

(47) Rocha-Ramírez, L. M.; Hernández-Chiñas, U.; Moreno-Guerrero, S. S.; Ramírez-Pacheco, A.; Eslava, C. A. In Vitro Effect of the Cell-Free Supernatant of the *Lactobacillus Casei* Strain IMAU60214 against the Different Pathogenic Properties of Diarrheagenic *Escherichia Coli*. *Microorganisms* **2023**, *11* (5), 1324. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051324>.

(48) Pazhoohan, M.; Sadeghi, F.; Moghadami, M.; Soltanmoradi, H.; Davood-abadi, A. Antimicrobial and Antiadhesive Effects of *Lactobacillus* Isolates of Healthy Human Gut Origin on Enterotoxigenic *Escherichia Coli* (ETEC) and Enteraggregative *Escherichia Coli* (EAEC). *Microb. Pathog.* **2020**, *148*, 104271. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104271>.

(49) Bindels, L. B.; Porporato, P.; Dewulf, E. M.; Verrax, J.; Neyrinck, A. M.; Martin, J. C.; Scott, K. P.; Buc Calderon, P.; Feron, O.; Muccioli, G. G.; Sonveaux, P.; Cani, P. D.; Delzenne, N. M. Gut Microbiota-Derived Propionate Reduces Cancer Cell Proliferation in the Liver. *Br. J. Cancer* **2012**, *107* (8), 1337–1344. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.409>.

(50) Kadyan, S.; Sharma, A.; Arjmandi, B. H.; Singh, P.; Nagpal, R. Prebiotic Potential of Dietary Beans and Pulses and Their Resistant Starch for Aging-Associated Gut and Metabolic Health. *Nutrients* **2022**, *14* (9), 1726. <https://doi.org/10.3390/nu14091726>.

(51) Maftai, N.-M.; Raileanu, C. R.; Balta, A. A.; Ambrose, L.; Boev, M.; Marin, D. B.; Lisa, E. L. The Potential Impact of Probiotics on Human Health: An Update on Their Health-Promoting Properties. *Microorganisms* **2024**, *12* (2), 234. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12020234>.

- (52) Zhou, P.; Chen, C.; Patil, S.; Dong, S. Unveiling the Therapeutic Symphony of Probiotics, Prebiotics, and Postbiotics in Gut-Immune Harmony. *Front. Nutr.* **2024**, *11*, 1355542. <https://doi.org/10.3389/fnut.2024.1355542>.
- (53) Bedford, M. R.; Svihus, B.; Cowieson, A. J. Dietary Fibre Effects and the Interplay with Exogenous Carbohydrases in Poultry Nutrition. *Anim. Nutr.* **2024**, *16*, 231–240. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2023.09.007>.
- (54) Deehan, E. C.; Mocanu, V.; Madsen, K. L. Effects of Dietary Fibre on Metabolic Health and Obesity. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2024**. <https://doi.org/10.1038/s41575-023-00891-z>.
- (55) Dasriya, V. L.; Samtiya, M.; Ranveer, S.; Dhillon, H. S.; Devi, N.; Sharma, V.; Nikam, P.; Puniya, M.; Chaudhary, P.; Chaudhary, V.; Behare, P. V.; Dhewa, T.; Vemuri, R.; Raposo, A.; Puniya, D. V.; Khedkar, G. D.; Vishweswaraiah, R. H.; Vij, S.; Alarifi, S. N.; Han, H.; Puniya, A. K. Modulation of Gut-microbiota through Probiotics and Dietary Interventions to Improve Host Health. *J. Sci. Food Agric.* **2024**, jsfa.13370. <https://doi.org/10.1002/jsfa.13370>.
- (56) Portune, K. J.; Beaumont, M.; Davila, A.-M.; Tomé, D.; Blachier, F.; Sanz, Y. Gut Microbiota Role in Dietary Protein Metabolism and Health-Related Outcomes: The Two Sides of the Coin. *Trends Food Sci. Technol.* **2016**, *57*, 213–232. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.08.011>.
- (57) Huang, E. Y.; Leone, V. A.; Devkota, S.; Wang, Y.; Brady, M. J.; Chang, E. B. Composition of Dietary Fat Source Shapes Gut Microbiota Architecture and Alters Host Inflammatory Mediators in Mouse Adipose Tissue. *J. Parenter. Enter. Nutr.* **2013**, *37* (6), 746–754. <https://doi.org/10.1177/0148607113486931>.
- (58) Desai, M. S.; Seekatz, A. M.; Koropatkin, N. M.; Kamada, N.; Hickey, C. A.; Wolter, M.; Pudlo, N. A.; Kitamoto, S.; Terrapon, N.; Muller, A.; Young, V. B.; Henrissat, B.; Wilmes, P.; Stappenbeck, T. S.; Núñez, G.; Martens, E. C. A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. *Cell* **2016**, *167* (5), 1339–1353.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.043>.
- (59) Li, S.; Chen, M.; Wang, Z.; Abudourexiti, W.; Zhang, L.; Ding, C.; Ding, L.; Gong, J. Ant May Well Destroy a Whole Dam: Glycans of Colonic Mucus Barrier Disintegrated by Gut Bacteria. *Microbiol. Res.* **2024**, *281*, 127599. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127599>.
- (60) Johansson, M. E. V.; Gustafsson, J. K.; Holmén-Larsson, J.; Jabbar, K. S.;

- Xia, L.; Xu, H.; Ghishan, F. K.; Carvalho, F. A.; Gewirtz, A. T.; Sjövall, H.; Hansson, G. C. Bacteria Penetrate the Normally Impenetrable Inner Colon Mucus Layer in Both Murine Colitis Models and Patients with Ulcerative Colitis. *Gut* **2014**, *63* (2), 281–291. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303207>.
- (61) Bergstrom, K.; Shan, X.; Casero, D.; Batushansky, A.; Lagishetty, V.; Jacobs, J. P.; Hoover, C.; Kondo, Y.; Shao, B.; Gao, L.; Zandberg, W.; Noyovitz, B.; McDaniel, J. M.; Gibson, D. L.; Pakpour, S.; Kazemian, N.; McGee, S.; Houchen, C. W.; Rao, C. V.; Griffin, T. M.; Sonnenburg, J. L.; McEver, R. P.; Braun, J.; Xia, L. Proximal Colon-Derived O-Glycosylated Mucus Encapsulates and Modulates the Microbiota. *Science* **2020**, *370* (6515), 467–472. <https://doi.org/10.1126/science.aay7367>.
- (62) Hancock, A. M.; Witonsky, D. B.; Ehler, E.; Alkorta-Aranburu, G.; Beall, C.; Gebremedhin, A.; Sukernik, R.; Utermann, G.; Pritchard, J.; Coop, G.; Di Rienzo, A. Human Adaptations to Diet, Subsistence, and Ecoregion Are Due to Subtle Shifts in Allele Frequency. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107* (supplement_2), 8924–8930. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914625107>.
- (63) Zhang, Y.; Peng, Y.; Xia, X. Autoimmune Diseases and Gut Microbiota: A Bibliometric and Visual Analysis from 2004 to 2022. *Clin. Exp. Med.* **2023**, *23* (6), 2813–2827. <https://doi.org/10.1007/s10238-023-01028-x>.
- (64) Khanna, S.; Raffals, L. E. The Microbiome in Crohn's Disease. *Gastroenterol. Clin. North Am.* **2017**, *46* (3), 481–492. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2017.05.004>.
- (65) Gao, X.; Sun, R.; Jiao, N.; Liang, X.; Li, G.; Gao, H.; Wu, X.; Yang, M.; Chen, C.; Sun, X.; Chen, L.; Wu, W.; Cong, Y.; Zhu, R.; Guo, T.; Liu, Z. Integrative Multi-Omics Deciphers the Spatial Characteristics of Host-Gut Microbiota Interactions in Crohn's Disease. *Cell Rep. Med.* **2023**, *4* (6), 101050. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2023.101050>.
- (66) Peyrin-Biroulet, L.; Chamallard, M.; Gonzalez, F.; Beclin, E.; Decourcelle, C.; Antunes, L.; Gay, J.; Neut, C.; Colombel, J.-F.; Desreumaux, P. Mesenteric Fat in Crohn's Disease: A Pathogenetic Hallmark or an Innocent Bystander? *Gut* **2007**, *56* (4), 577–583. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.082925>.
- (67) Rivera, E. D.; Coffey, J. C.; Walsh, D.; Ehrenpreis, E. D. The Mesentery, Systemic Inflammation, and Crohn's Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **2019**, *25* (2), 226–234. <https://doi.org/10.1093/ibd/izy201>.

- (68) Yousaf, H.; Khan, M. I. U.; Ali, I.; Munir, M. U.; Lee, K. Y. Emerging Role of Macrophages in Non-Infectious Diseases: An Update. *Biomed. Pharmacother.* **2023**, *161*, 114426. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114426>.
- (69) Ha, C. W. Y.; Martin, A.; Sepich-Poore, G. D.; Shi, B.; Wang, Y.; Gouin, K.; Humphrey, G.; Sanders, K.; Ratnayake, Y.; Chan, K. S. L.; Hendrick, G.; Caldera, J. R.; Arias, C.; Moskowitz, J. E.; Ho Sui, S. J.; Yang, S.; Underhill, D.; Brady, M. J.; Knott, S.; Kaihara, K.; Steinbaugh, M. J.; Li, H.; McGovern, D. P. B.; Knight, R.; Fleshner, P.; Devkota, S. Translocation of Viable Gut Microbiota to Mesenteric Adipose Drives Formation of Creeping Fat in Humans. *Cell* **2020**, *183* (3), 666-683.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.009>.
- (70) Wauters, L.; Tito, R. Y.; Ceulemans, M.; Outtier, A.; Rymenans, L.; Verspecht, C.; Sabino, J.; Ferrante, M.; Vermeire, S.; Vanuytsel, T.; Raes, J. Microbiome Variance of the Small Bowel in Crohn's Disease. *Gut* **2023**, *72* (8), 1626.1-1628. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2022-327313>.
- (71) Torres, J.; Bao, X.; Goel, A.; Colombel, J.-F.; Pekow, J.; Jabri, B.; Williams, K. M.; Castillo, A.; Odin, J. A.; Meckel, K.; Fasihuddin, F.; Peter, I.; Itzkowitz, S.; Hu, J. The Features of Mucosa-Associated Microbiota in Primary Sclerosing Cholangitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2016**, *43* (7), 790–801. <https://doi.org/10.1111/apt.13552>.
- (72) Schirmer, M.; Garner, A.; Vlamakis, H.; Xavier, R. J. Microbial Genes and Pathways in Inflammatory Bowel Disease. *Nat. Rev. Microbiol.* **2019**, *17* (8), 497–511. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0213-6>.
- (73) Zhu, C.; Song, K.; Shen, Z.; Quan, Y.; Tan, B.; Luo, W.; Wu, S.; Tang, K.; Yang, Z.; Wang, X. Roseburia Intestinalis Inhibits Interleukin-17 Excretion and Promotes Regulatory T Cells Differentiation in Colitis. *Mol. Med. Rep.* **2018**. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8833>.
- (74) Raygoza Garay, J. A.; Turpin, W.; Lee, S.-H.; Smith, M. I.; Goethel, A.; Griffiths, A. M.; Moayyedi, P.; Espin-Garcia, O.; Abreu, M.; Aumais, G. L.; Bernstein, C. N.; Biron, I. A.; Cino, M.; Deslandres, C.; Dotan, I.; El-Matary, W.; Feagan, B.; Guttman, D. S.; Huynh, H.; Dieleman, L. A.; Hyams, J. S.; Jacobson, K.; Mack, D.; Marshall, J. K.; Otley, A.; Panaccione, R.; Ropeleski, M.; Silverberg, M. S.; Steinhart, A. H.; Turner, D.; Yerushalmi, B.; Paterson, A. D.; Xu, W.; Croitoru, K.; Abreu, M.; Beck, P.; Bernstein, C.; Croitoru, K.; Dieleman, L. A.; Feagan, B.; Griffiths, A.; Guttman, D.; Jacobson, K.; Kaplan, G.; Krause, D. O.; Madsen,

K.; Marshall, J.; Moayyedi, P.; Ropeleski, M.; Seidman, E.; Silverberg, M.; Snapper, S.; Stadnyk, A.; Steinhart, H.; Surette, M.; Turner, D.; Walters, T.; Vallance, B.; Aumais, G.; Bitton, A.; Cino, M.; Critch, J.; Denson, L.; Deslandres, C.; El-Matary, W.; Herfarth, H.; Higgins, P.; Huynh, H.; Hyams, J. S.; Mack, D.; McGrath, J.; Otley, A.; Panancionne, R. Gut Microbiome Composition Is Associated With Future Onset of Crohn's Disease in Healthy First-Degree Relatives. *Gastroenterology* **2023**, S0016508523008053. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2023.05.032>.

(75) Lopetuso, L. R.; Deleu, S.; Godny, L.; Petito, V.; Puca, P.; Facciotti, F.; Sokol, H.; Ianiro, G.; Masucci, L.; Abreu, M.; Dotan, I.; Costello, S. P.; Hart, A.; Iqbal, T. H.; Paramsothy, S.; Sanguinetti, M.; Danese, S.; Tilg, H.; Cominelli, F.; Pizarro, T. T.; Armuzzi, A.; Cammarota, G.; Gasbarrini, A.; Vermeire, S.; Scaldaferri, F. The First International Rome Consensus Conference on Gut Microbiota and Faecal Microbiota Transplantation in Inflammatory Bowel Disease. *Gut* **2023**, gutjnl-2023-329948. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2023-329948>.

(76) Gibiino, G.; Lopetuso, L. R.; Scaldaferri, F.; Rizzatti, G.; Binda, C.; Gasbarrini, A. Exploring Bacteroidetes: Metabolic Key Points and Immunological Tricks of Our Gut Commensals. *Dig. Liver Dis.* **2018**, 50 (7), 635–639. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2018.03.016>.

(77) Ó Cuív, P.; De Wouters, T.; Giri, R.; Mondot, S.; Smith, W. J.; Blottière, H. M.; Begun, J.; Morrison, M. The Gut Bacterium and Pathobiont *Bacteroides Vulgatus* Activates NF- κ B in a Human Gut Epithelial Cell Line in a Strain and Growth Phase Dependent Manner. *Anaerobe* **2017**, 47, 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.06.002>.

(78) The International IBD Genetics Consortium (IIBDGC); International Genetics of Ankylosing Spondylitis Consortium (IGAS); International PSC Study Group (IPSCSG); Genetic Analysis of Psoriasis Consortium (GAPC); Psoriasis Association Genetics Extension (PAGE); Ellinghaus, D.; Jostins, L.; Spain, S. L.; Cortes, A.; Bethune, J.; Han, B.; Park, Y. R.; Raychaudhuri, S.; Pouget, J. G.; Hübenthal, M.; Folseraas, T.; Wang, Y.; Esko, T.; Metspalu, A.; Westra, H.-J.; Franke, L.; Pers, T. H.; Weersma, R. K.; Collij, V.; D'Amato, M.; Halfvarson, J.; Jensen, A. B.; Lieb, W.; Degenhardt, F.; Forstner, A. J.; Hofmann, A.; Schreiber, S.; Mrowietz, U.; Juran, B. D.; Lazaridis, K. N.; Brunak, S.; Dale, A. M.; Trembath, R. C.; Weidinger, S.; Weichenthal, M.; Ellinghaus, E.; Elder, J. T.; Barker, J. N. W.

- N.; Andreassen, O. A.; McGovern, D. P.; Karlsen, T. H.; Barrett, J. C.; Parkes, M.; Brown, M. A.; Franke, A. Analysis of Five Chronic Inflammatory Diseases Identifies 27 New Associations and Highlights Disease-Specific Patterns at Shared Loci. *Nat. Genet.* **2016**, *48* (5), 510–518. <https://doi.org/10.1038/ng.3528>.
- (79) Mu, C.; Zhao, Q.; Zhao, Q.; Yang, L.; Pang, X.; Liu, T.; Li, X.; Wang, B.; Fung, S.-Y.; Cao, H. Multi-Omics in Crohn's Disease: New Insights from Inside. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2023**, *21*, 3054–3072. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2023.05.010>.
- (80) Agrawal, M.; Allin, K. H.; Petralia, F.; Colombel, J.-F.; Jess, T. Multiomics to Elucidate Inflammatory Bowel Disease Risk Factors and Pathways. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2022**, *19* (6), 399–409. <https://doi.org/10.1038/s41575-022-00593-y>.
- (81) González-Dominici, L. I.; Peral-Aranega, E.; Díez-Méndez, A.; Marcos-García, M.; Menéndez, E.; García-Fraile, P.; Saati-Santamaría, Z. A Guide for the Analysis of Plant Microbial Communities through High-Throughput Sequencing Methods. In *Microbial Technology for Agro-Ecosystems*; Elsevier, 2024; pp 3–19. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-18446-8.00010-3>.
- (82) Deal, C.; De Wannemaeker, L.; De Mey, M. Towards a Rational Approach to Promoter Engineering: Understanding the Complexity of Transcription Initiation in Prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **2024**, *48* (2), fuae004. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuae004>.
- (83) Church, D. L.; Cerutti, L.; Gürtler, A.; Griener, T.; Zelazny, A.; Emler, S. Performance and Application of 16S rRNA Gene Cycle Sequencing for Routine Identification of Bacteria in the Clinical Microbiology Laboratory. *Clin. Microbiol. Rev.* **2020**, *33* (4), e00053-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00053-19>.
- (84) Caporaso, J. G.; Lauber, C. L.; Walters, W. A.; Berg-Lyons, D.; Huntley, J.; Fierer, N.; Owens, S. M.; Betley, J.; Fraser, L.; Bauer, M.; Gormley, N.; Gilbert, J. A.; Smith, G.; Knight, R. Ultra-High-Throughput Microbial Community Analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq Platforms. *ISME J.* **2012**, *6* (8), 1621–1624. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8>.
- (85) Pérez-Cobas, A. E.; Gomez-Valero, L.; Buchrieser, C. Metagenomic Approaches in Microbial Ecology: An Update on Whole-Genome and Marker Gene Sequencing Analyses. *Microb. Genomics* **2020**, *6* (8). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000409>.

- (86) Loman, N. J.; Quick, J.; Simpson, J. T. A Complete Bacterial Genome Assembled de Novo Using Only Nanopore Sequencing Data. *Nat. Methods* **2015**, *12* (8), 733–735. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3444>.
- (87) Biedermann, L.; Zeitz, J.; Mwinyi, J.; Sutter-Minder, E.; Rehman, A.; Ott, S. J.; Steurer-Stey, C.; Frei, A.; Frei, P.; Scharl, M.; Loessner, M. J.; Vavricka, S. R.; Fried, M.; Schreiber, S.; Schuppler, M.; Rogler, G. Smoking Cessation Induces Profound Changes in the Composition of the Intestinal Microbiota in Humans. *PLoS ONE* **2013**, *8* (3), e59260. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059260>.
- (88) Cheon, J. H.; Nah, S.; Kang, H. W.; Lim, Y. J.; Lee, S.-H.; Lee, S. J.; Kim, S. H.; Jung, N. H.; Park, J. E.; Lee, Y. J.; Jeon, D. B.; Lee, Y. M.; Kim, J. M.; Park, S.-H. Infliximab Biosimilar CT-P13 Observational Studies for Rheumatoid Arthritis, Inflammatory Bowel Diseases, and Ankylosing Spondylitis: Pooled Analysis of Long-Term Safety and Effectiveness. *Adv. Ther.* **2021**, *38* (8), 4366–4387. <https://doi.org/10.1007/s12325-021-01834-3>.
- (89) Vermeire, S.; Schreiber, S.; Sandborn, W. J.; Dubois, C.; Rutgeerts, P. Correlation Between the Crohn's Disease Activity and Harvey–Bradshaw Indices in Assessing Crohn's Disease Severity. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2010**, *8* (4), 357–363. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2010.01.001>.
- (90) Daperno, M.; D'Haens, G.; Van Assche, G.; Baert, F.; Bulois, P.; Maunoury, V.; Sostegni, R.; Rocca, R.; Pera, A.; Gevers, A. Development and Validation of a New, Simplified Endoscopic Activity Score for Crohn's Disease: The SES-CD. *Gastrointest. Endosc.* **2004**, *60* (4), 505–512. [https://doi.org/10.1016/S0016-5107\(04\)01878-4](https://doi.org/10.1016/S0016-5107(04)01878-4).
- (91) Saúde, M. da S.-S. de A. à. *Guia alimentar para população brasileira*; Articulação Interfederativa; Ms, 2014.
- (92) *WHO Guidelines on Physical Activity and Sedentary Behaviour*; World Health Organization: Geneva, 2020.
- (93) Linhares, F. S. Qualidade de Vida de Indivíduos Tabagistas, Ex-Tabagistas e Não Tabagistas de um Município do Sudeste Brasileiro, Universidade Federal de Juiz de Fora, 2018.
- (94) Nuttall, F. Q. Body Mass Index: Obesity, BMI, and Health A Critical Review. *Nutr. Today* **2015**, *50* (3), 117–128. <https://doi.org/10.1097/NT.0000000000000092>.

- (95) Kolodziej, K.; Nikolov, I.; Schulz, H. K.; Theissinger, K.; Schulz, R. Evaluation of Fecal Storage and DNA Extraction Methods in Wild Boar (*Sus Scrofa*). *Biochem. Genet.* **2013**, *51* (5–6), 406–412. <https://doi.org/10.1007/s10528-013-9573-1>.
- (96) Illumina, I. Illumina 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Illumina Technical Note 15044223)., 2013. https://support.illumina.com/downloads/16s_metagenomic_sequencing_library_preparation.html.
- (97) Yatsunenkov, T.; Rey, F. E.; Manary, M. J.; Trehan, I.; Dominguez-Bello, M. G.; Contreras, M.; Magris, M.; Hidalgo, G.; Baldassano, R. N.; Anokhin, A. P.; Heath, A. C.; Warner, B.; Reeder, J.; Kuczynski, J.; Caporaso, J. G.; Lozupone, C. A.; Lauber, C.; Clemente, J. C.; Knights, D.; Knight, R.; Gordon, J. I. Human Gut Microbiome Viewed across Age and Geography. *Nature* **2012**, *486* (7402), 222–227. <https://doi.org/10.1038/nature11053>.
- (98) Illumina, I. Illumina 16S Metagenomics Sequencing Workflow, 2017. <https://support.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/other/16s-metagenomics-faq-1270-2014-003.pdf>.
- (99) Alishum, A.; Greenfield, P.; Seersholm, F.; Christophersen. DADA2 Formatted 16S rRNA Gene Sequences for Both Bacteria & Archaea, 2019.
- (100) Yoon, S.-H.; Ha, S.-M.; Kwon, S.; Lim, J.; Kim, Y.; Seo, H.; Chun, J. Introducing EzBioCloud: A Taxonomically United Database of 16S rRNA Gene Sequences and Whole-Genome Assemblies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2017**, *67* (5), 1613–1617. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>.
- (101) Saúde, M. da S.-S. de A. à. *Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas: volume 3*; Técnica Navegador SUS; Ms, 2014.
- (102) SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE, C. D. A. F. Nota Técnica CAF Nº 12, de 05 de Julho de 2022.
- (103) Magro, D. O.; Rossoni, C.; Saad-Hossne, R.; Santos, A. INTERACTION BETWEEN FOOD PYRAMID AND GUT MICROBIOTA. A NEW NUTRITIONAL APPROACH. *Arq. Gastroenterol.* **2023**, *60* (1), 132–136. <https://doi.org/10.1590/s0004-2803.202301000-15>.
- (104) Han, Y.; Wang, B.; Gao, H.; He, C.; Hua, R.; Liang, C.; Xin, S.; Wang, Y.; Xu, J. Insight into the Relationship between Oral Microbiota and the Inflammatory Bowel Disease. *Microorganisms* **2022**, *10* (9), 1868. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091868>.

- (105) Bennett, K. W.; Eley, A. Fusobacteria: New Taxonomy and Related Diseases. *J. Med. Microbiol.* **1993**, *39* (4), 246–254. <https://doi.org/10.1099/00222615-39-4-246>.
- (106) Binda, C.; Lopetuso, L. R.; Rizzatti, G.; Gibiino, G.; Cennamo, V.; Gasbarini, A. Actinobacteria: A Relevant Minority for the Maintenance of Gut Homeostasis. *Dig. Liver Dis.* **2018**, *50* (5), 421–428. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2018.02.012>.
- (107) Seong, C. N.; Kang, J. W.; Lee, J. H.; Seo, S. Y.; Woo, J. J.; Park, C.; Bae, K. S.; Kim, M. S. Taxonomic Hierarchy of the Phylum Firmicutes and Novel Firmicutes Species Originated from Various Environments in Korea. *J. Microbiol.* **2018**, *56* (1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-7318-x>.
- (108) Hu, C.; Rzymiski, P. Non-Photosynthetic Melainabacteria (Cyanobacteria) in Human Gut: Characteristics and Association with Health. *Life* **2022**, *12* (4), 476. <https://doi.org/10.3390/life12040476>.
- (109) WHO, W. H. O. COVID-19 Can Be Characterized as a Pandemic., 2023. <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>.
- (110) Senado Federal. Artigo 65 Da Lei Complementar No 101, 2020.
- (111) Freitas, G. L. D. Análise sistemática dos métodos de extração de DNA e dos agentes de preservação de amostras fecais em estudos genéticos com primatas não humanos. Mestrado em Psicologia Experimental, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022. <https://doi.org/10.11606/D.47.2022.tde-29032022-110813>.
- (112) D'Amico, F.; Solitano, V.; Magro, F.; Olivera, P. A.; Halfvarson, J.; Rubin, D.; Dignass, A.; Al Awadhi, S.; Kobayashi, T.; Queiroz, N. S. F.; Calvo, M.; Kotze, P. G.; Ghosh, S.; Peyrin-Biroulet, L.; Danese, S. Practical Management of Bio-similar Use in Inflammatory Bowel Disease (IBD): A Global Survey and an International Delphi Consensus. *J. Clin. Med.* **2023**, *12* (19), 6350. <https://doi.org/10.3390/jcm12196350>.
- (113) Ye, B. D.; Pesegova, M.; Alexeeva, O.; Osipenko, M.; Lahat, A.; Dorofeyev, A.; Fishman, S.; Levchenko, O.; Cheon, J. H.; Scribano, M. L.; Mateescu, R.-B.; Lee, K.-M.; Eun, C. S.; Lee, S. J.; Lee, S. Y.; Kim, H.; Schreiber, S.; Fowler, H.; Cheung, R.; Kim, Y.-H. Efficacy and Safety of Biosimilar CT-P13 Compared with Originator Infliximab in Patients with Active Crohn's Disease: An

International, Randomised, Double-Blind, Phase 3 Non-Inferiority Study. *The Lancet* **2019**, 393 (10182), 1699–1707. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32196-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32196-2).

(114) Park, W.; Lee, S. J.; Yun, J.; Yoo, D. H. Comparison of the Pharmacokinetics and Safety of Three Formulations of Infliximab (CT-P13, EU-Approved Reference Infliximab and the US-Licensed Reference Infliximab) in Healthy Subjects: A Randomized, Double-Blind, Three-Arm, Parallel-Group, Single-Dose, Phase I Study. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **2015**, 11 (sup1), 25–31. <https://doi.org/10.1586/1744666X.2015.1090311>.

(115) Hospital Moinhos de Vento e Coloprocto Clínica do Aparelho Digestivo; Zabet, G. P.; Cassol, O. S.; Hospital de Clínicas de Passo Fundo; Quaresma, A. B.; Universidade do Oeste de Santa Catarina; Gonçalves Filho, F. D. A.; Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; Baima, J. P.; Universidade Nove de Julho; Imbrizi, M.; Universidade Estadual de Campinas; Rolim, A. D. S.; Hospital Santa Marcelina; Carmo, A. M. D.; Instituto de Clínicas e Endoscopia; Alves Junior, A. J. T.; Pontifícia Universidade Católica de Campinas; Santos, C. H. M. D.; Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian; Sobrado Junior, C. W.; Universidade de São Paulo; Miranda, E. F.; Pontifícia Universidade Católica do Paraná; Albuquerque, I. C. D.; Hospital Heliópolis, Serviço de Coloproctologia; Souza, M. M. D.; Hospital Universitário Júlio Müller; Kaiser Junior, R. L.; Kaiser Clínica, São José do Rio Preto; Parra, R. S.; Universidade de São Paulo; Kotze, P. G.; Pontifícia Universidade Católica do Paraná; Saad-Hossne, R.; Universidade Estadual Paulista. SURGICAL MANAGEMENT OF ADULT CROHN'S DISEASE AND ULCERATIVE COLITIS PATIENTS: A CONSENSUS FROM THE BRAZILIAN ORGANIZATION OF CROHN'S DISEASE AND COLITIS (GEDIIB). *Arq. Gastroenterol.* **2023**. <https://doi.org/10.1590/S0004-2803.2022005S1-01>.

(116) McGregor, C. G. C.; Tandon, R.; Simmons, A. Pathogenesis of Fistulating Crohn's Disease: A Review. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **2023**, 15 (1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2022.09.011>.

(117) Elford, A. T.; Ardalán, Z.; Simkin, P.; Christensen, B. Comprehensive Review and Update of Stricturing Crohn's Disease. *Indian J. Gastroenterol.* **2024**. <https://doi.org/10.1007/s12664-023-01508-8>.

(118) Rogler, G.; Singh, A.; Kavanaugh, A.; Rubin, D. T. Extraintestinal Manifestations of Crohn's Disease: A Review. *Am. J. Gastroenterol.* **2019**, 114 (1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s12664-023-01508-8>.

tations of Inflammatory Bowel Disease: Current Concepts, Treatment, and Implications for Disease Management. *Gastroenterology* **2021**, *161* (4), 1118–1132. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.07.042>.

(119) Gordon, H.; Burisch, J.; Ellul, P.; Karmiris, K.; Katsanos, K.; Allocca, M.; Bamias, G.; Barreiro-de Acosta, M.; Braithwaite, T.; Greuter, T.; Harwood, C.; Juillerat, P.; Lobaton, T.; Müller-Ladner, U.; Noor, N.; Pellino, G.; Savarino, E.; Schramm, C.; Soriano, A.; Michael Stein, J.; Uzzan, M.; Van Rheenen, P. F.; Vavricka, S. R.; Vecchi, M.; Zuily, S.; Kucharzik, T. ECCO Guidelines on Extraintestinal Manifestations in Inflammatory Bowel Disease. *J. Crohns Colitis* **2024**, *18* (1), 1–37. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjad108>.

(120) Noor, N. M.; Lee, J. C.; Bond, S.; Dowling, F.; Brezina, B.; Patel, K. V.; Ahmad, T.; Banim, P. J.; Berrill, J. W.; Cooney, R.; De La Revilla Negro, J.; De Silva, S.; Din, S.; Durai, D.; Gordon, J. N.; Irving, P. M.; Johnson, M.; Kent, A. J.; Kok, K. B.; Moran, G. W.; Mowat, C.; Patel, P.; Probert, C. S.; Raine, T.; Saich, R.; Seward, A.; Sharpstone, D.; Smith, M. A.; Subramanian, S.; Upponi, S. S.; Wiles, A.; Williams, H. R. T.; Van Den Brink, G. R.; Vermeire, S.; Jairath, V.; D'Haens, G. R.; McKinney, E. F.; Lyons, P. A.; Lindsay, J. O.; Kennedy, N. A.; Smith, K. G. C.; Parkes, M. A Biomarker-Stratified Comparison of Top-down versus Accelerated Step-up Treatment Strategies for Patients with Newly Diagnosed Crohn's Disease (PROFILE): A Multicentre, Open-Label Randomised Controlled Trial. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **2024**, S2468125324000347. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(24\)00034-7](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(24)00034-7).

(121) Berg, D. R.; Colombel, J.-F.; Ungaro, R. The Role of Early Biologic Therapy in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **2019**, *25* (12), 1896–1905. <https://doi.org/10.1093/ibd/izz059>.

(122) Ben-Horin, S.; Novack, L.; Mao, R.; Guo, J.; Zhao, Y.; Sergienko, R.; Zhang, J.; Kobayashi, T.; Hibi, T.; Chowers, Y.; Peyrin-Biroulet, L.; Colombel, J. F.; Kaplan, G. G.; Chen, M. Efficacy of Biologic Drugs in Short-Duration Versus Long-Duration Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and an Individual-Patient Data Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Gastroenterology* **2022**, *162* (2), 482–494. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.10.037>.

(123) Shiga, H.; Abe, I.; Onodera, M.; Moroi, R.; Kuroha, M.; Kanazawa, Y.; Kakuta, Y.; Endo, K.; Kinouchi, Y.; Masamune, A. Serum C-Reactive Protein and

Albumin Are Useful Biomarkers for Tight Control Management of Crohn's Disease in Japan. *Sci. Rep.* **2020**, *10* (1), 511. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57508-7>.

(124) Chen, P.; Zhou, G.; Lin, J.; Li, L.; Zeng, Z.; Chen, M.; Zhang, S. Serum Biomarkers for Inflammatory Bowel Disease. *Front. Med.* **2020**, *7*, 123. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00123>.

(125) Jones, J.; Loftus, E. V.; Panaccione, R.; Chen, L.; Peterson, S.; McConnell, J.; Baudhuin, L.; Hanson, K.; Feagan, B. G.; Harmsen, S. W.; Zinsmeister, A. R.; Helou, E.; Sandborn, W. J. Relationships Between Disease Activity and Serum and Fecal Biomarkers in Patients With Crohn's Disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2008**, *6* (11), 1218–1224. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2008.06.010>.

(126) Godala, M.; Gaszyńska, E.; Walczak, K.; Małecka-Wojcieszko, E. Evaluation of Albumin, Transferrin and Transthyretin in Inflammatory Bowel Disease Patients as Disease Activity and Nutritional Status Biomarkers. *Nutrients* **2023**, *15* (15), 3479. <https://doi.org/10.3390/nu15153479>.

(127) Ventura, M. Microbial Diversity in the Human Intestine and Novel Insights from Metagenomics. *Front. Biosci.* **2009**, *Volume* (14), 3214. <https://doi.org/10.2741/3445>.

(128) Zmora, N.; Suez, J.; Elinav, E. You Are What You Eat: Diet, Health and the Gut Microbiota. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2019**, *16* (1), 35–56. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0061-2>.

(129) Lebeaux, R. M.; Karalis, D. B.; Lee, J.; Whitehouse, H. C.; Madan, J. C.; Karagas, M. R.; Hoen, A. G. The Association between Early Life Antibiotic Exposure and the Gut Resistome of Young Children: A Systematic Review. *Gut Microbes* **2022**, *14* (1), 2120743. <https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2120743>.

(130) El Hadad, J.; Schreiner, P.; Vavricka, S. R.; Greuter, T. The Genetics of Inflammatory Bowel Disease. *Mol. Diagn. Ther.* **2024**, *28* (1), 27–35. <https://doi.org/10.1007/s40291-023-00678-7>.

(131) Halme, L. Family and Twin Studies in Inflammatory Bowel Disease. *World J. Gastroenterol.* **2006**, *12* (23), 3668. <https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i23.3668>.

(132) De Lange, K. M.; Moutsianas, L.; Lee, J. C.; Lamb, C. A.; Luo, Y.; Kennedy, N. A.; Jostins, L.; Rice, D. L.; Gutierrez-Achury, J.; Ji, S.-G.; Heap, G.; Nimmo, E. R.; Edwards, C.; Henderson, P.; Mowat, C.; Sanderson, J.; Satsangi, J.; Simmons, A.; Wilson, D. C.; Tremelling, M.; Hart, A.; Mathew, C. G.; Newman,

W. G.; Parkes, M.; Lees, C. W.; Uhlig, H.; Hawkey, C.; Prescott, N. J.; Ahmad, T.; Mansfield, J. C.; Anderson, C. A.; Barrett, J. C. Genome-Wide Association Study Implicates Immune Activation of Multiple Integrin Genes in Inflammatory Bowel Disease. *Nat. Genet.* **2017**, *49* (2), 256–261. <https://doi.org/10.1038/ng.3760>.

(133) Møller, F. T.; Andersen, V.; Wohlfahrt, J.; Jess, T. Familial Risk of Inflammatory Bowel Disease: A Population-Based Cohort Study 1977–2011. *Am. J. Gastroenterol.* **2015**, *110* (4), 564–571. <https://doi.org/10.1038/ajg.2015.50>.

(134) Sun, Y.; Yuan, S.; Chen, X.; Sun, J.; Kalla, R.; Yu, L.; Wang, L.; Zhou, X.; Kong, X.; Hesketh, T.; Ho, G.; Ding, K.; Dunlop, M.; Larsson, S. C.; Satsangi, J.; Chen, J.; Wang, X.; Li, X.; Theodoratou, E.; Giovannucci, E. L. The Contribution of Genetic Risk and Lifestyle Factors in the Development of Adult-Onset Inflammatory Bowel Disease: A Prospective Cohort Study. *Am. J. Gastroenterol.* **2023**, *118* (3), 511–522. <https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000002180>.

(135) Ferenc, K.; Sokal-Dembowska, A.; Helma, K.; Motyka, E.; Jarmakiewicz-Czaja, S.; Filip, R. Modulation of the Gut Microbiota by Nutrition and Its Relationship to Epigenetics. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25* (2), 1228. <https://doi.org/10.3390/ijms25021228>.

(136) Ananthakrishnan, A. N.; Kaplan, G. G.; Bernstein, C. N.; Burke, K. E.; Lochhead, P. J.; Sasson, A. N.; Agrawal, M.; Tjong, J. H. T.; Steinberg, J.; Kruis, W.; Steinwurz, F.; Ahuja, V.; Ng, S. C.; Rubin, D. T.; Colombel, J.-F.; Gearry, R.; Abreu, M.; Ahuja, V.; Allez, M.; Ananthakrishnan, A.; Bemelman, W.; Bernstein, C.; Braun, J.; Chowers, Y.; Colombel, J.-F.; Danese, S.; D’Haens, G.; D’Hoore, A.; Dignass, A.; Dotan, I.; Dubinsky, M.; Ekbom, A.; Fleshner, P.; Gasche, C.; Gassull, M.; Gearry, R.; Ghosh, S.; Gibson, P.; Griffiths, A.; Halfvarson, J.; Hanauer, S.; Harpaz, N.; Hart, A.; Hibi, T.; Kamm, M.; Kaplan, G.; Kaser, A.; Korelitz, B.; Kotze, P.; Koutroubakis, I.; Kruis, W.; Lakatos, P.; Lewis, J.; Lindsay, J.; Loftus, E.; Louis, E.; Lukas, M.; Magro, F.; Mahadevan, U.; Mantzaris, G.; Mary, J.-Y.; McGovern, D.; Moum, B.; Munkholm, P.; Neurath, M.; Ng, S.; O’Morain, C.; Oresland, T.; Panaccione, R.; Panes, J.; Panis, Y.; Pemberton, J.; Peyrin-Biroulet, L.; Prantera, C.; Rachmilewitz, D.; Ran, Z.; Reinisch, W.; Remzi, F.; Rhodes, J.; Riddell, R.; Rogler, G.; Rubin, D.; Sachar, D.; Sandborn, W.; Sands, B.; Sartor, B.; Schoelmerich, J.; Schreiber, S.; Siegel, C.; Siegmund, B.; Silverberg, M.; Söderholm, J.; Sood, A.; Spinelli, A.; Stange, E.; Steinwurz, F.; Targan, S.; Travis,

S.; Turner, D.; Tysk, C.; Vatn, M.; Vermeire, S.; Watanabe, M.; Yamamoto, T.; Yamamoto-Furusho, J. Lifestyle, Behaviour, and Environmental Modification for the Management of Patients with Inflammatory Bowel Diseases: An International Organization for Study of Inflammatory Bowel Diseases Consensus. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **2022**, *7* (7), 666–678. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(22\)00021-8](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(22)00021-8).

(137) Robinson, A.; Wilde, J.; Allen-Vercoe, E. Fusobacteria: Physiology, Form, and Function. In *Colorectal Neoplasia and the Colorectal Microbiome*; Elsevier, 2020; pp 95–134. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819672-4.00006-4>.

(138) Fukugaiti, M. H.; Ignacio, A.; Fernandes, M. R.; Ribeiro Júnior, U.; Nakano, V.; Avila-Campos, M. J. High Occurrence of Fusobacterium Nucleatum and Clostridium Difficile in the Intestinal Microbiota of Colorectal Carcinoma Patients. *Braz. J. Microbiol.* **2015**, *46* (4), 1135–1140. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246420140665>.

(139) Yoshida, Y.; Ito, S.; Kamo, M.; Kezuka, Y.; Tamura, H.; Kunimatsu, K.; Kato, H. Production of Hydrogen Sulfide by Two Enzymes Associated with Biosynthesis of Homocysteine and Lanthionine in Fusobacterium Nucleatum Subsp. Nucleatum ATCC 25586. *Microbiology* **2010**, *156* (7), 2260–2269. <https://doi.org/10.1099/mic.0.039180-0>.

(140) Ramos, C.; Gibson, G. R.; Walton, G. E.; Magistro, D.; Kinnear, W.; Hunter, K. Systematic Review of the Effects of Exercise and Physical Activity on the Gut Microbiome of Older Adults. *Nutrients* **2022**, *14* (3), 674. <https://doi.org/10.3390/nu14030674>.

(141) Boytar, A. N.; Nitert, M. D.; Morrisson, M.; Skinner, T. L.; Jenkins, D. G. Exercise-induced Changes to the Human Gut Microbiota and Implications for Colorectal Cancer: A Narrative Review. *J. Physiol.* **2022**, *600* (24), 5189–5201. <https://doi.org/10.1113/JP283702>.

(142) GfK, G. from K. *Man's best friend: global pet ownership and feeding trends*. Growth from Knowledge. <https://www.gfk.com/insights/mans-best-friend-global-pet-ownership-and-feeding-trends> (accessed 2024-03-02).

(143) Stewart, C. J.; Ajami, N. J.; O'Brien, J. L.; Hutchinson, D. S.; Smith, D. P.; Wong, M. C.; Ross, M. C.; Lloyd, R. E.; Doddapaneni, H.; Metcalf, G. A.; Muzny, D.; Gibbs, R. A.; Vatanen, T.; Huttenhower, C.; Xavier, R. J.; Rewers, M.; Hagopian, W.; Toppari, J.; Ziegler, A.-G.; She, J.-X.; Akolkar, B.; Lernmark, A.;

- Hyoty, H.; Vehik, K.; Krischer, J. P.; Petrosino, J. F. Temporal Development of the Gut Microbiome in Early Childhood from the TEDDY Study. *Nature* **2018**, 562 (7728), 583–588. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0617-x>.
- (144) Hernandez, J.; Rhimi, S.; Kriaa, A.; Mariaule, V.; Boudaya, H.; Drut, A.; Jablaoui, A.; Mkaouar, H.; Saidi, A.; Biourge, V.; Borgi, M. A.; Rhimi, M.; Maguin, E. Domestic Environment and Gut Microbiota: Lessons from Pet Dogs. *Microorganisms* **2022**, 10 (5), 949. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10050949>.
- (145) Cohen, S. E.; Golden, S. S. Circadian Rhythms in Cyanobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2015**, 79 (4), 373–385. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00036-15>.
- (146) Wollmuth, E. M.; Angert, E. R. Microbial Circadian Clocks: Host-Microbe Interplay in Diel Cycles. *BMC Microbiol.* **2023**, 23 (1), 124. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02839-4>.
- (147) Dos Santos, A.; Galiè, S. The Microbiota–Gut–Brain Axis in Metabolic Syndrome and Sleep Disorders: A Systematic Review. *Nutrients* **2024**, 16 (3), 390. <https://doi.org/10.3390/nu16030390>.
- (148) Roth, T. Insomnia: Definition, Prevalence, Etiology, and Consequences. *J. Clin. Sleep Med.* **2007**, 3 (5 suppl). <https://doi.org/10.5664/jcsm.26929>.
- (149) Cantoro, L.; Monterubbianesi, R.; Falasco, G.; Camastra, C.; Pantanella, P.; Allocca, M.; Cosentino, R.; Faggiani, R.; Danese, S.; Fiorino, G. The Earlier You Find, the Better You Treat: Red Flags for Early Diagnosis of Inflammatory Bowel Disease. *Diagnostics* **2023**, 13 (20), 3183. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13203183>.
- (150) Jabłońska, B.; Mrowiec, S. Nutritional Status and Its Detection in Patients with Inflammatory Bowel Diseases. *Nutrients* **2023**, 15 (8), 1991. <https://doi.org/10.3390/nu15081991>.
- (151) Kuriyan, R. Body Composition Techniques. *Indian J. Med. Res.* **2018**, 148 (5), 648. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1777_18.
- (152) David, L. A.; Maurice, C. F.; Carmody, R. N.; Gootenberg, D. B.; Button, J. E.; Wolfe, B. E.; Ling, A. V.; Devlin, A. S.; Varma, Y.; Fischbach, M. A.; Biddinger, S. B.; Dutton, R. J.; Turnbaugh, P. J. Diet Rapidly and Reproducibly Alters the Human Gut Microbiome. *Nature* **2014**, 505 (7484), 559–563. <https://doi.org/10.1038/nature12820>.
- (153) Nath, S.; Bhattacharya, S.; Golla, V. B.; Kumar, R. Effect of Social Media

- on Diet, Lifestyle, and Performance of Athletes: A Review of Current Evidence. *Curr. Nutr. Rep.* **2024**. <https://doi.org/10.1007/s13668-024-00526-y>.
- (154) Powell, J.; Pring, T. The Impact of Social Media Influencers on Health Outcomes: Systematic Review. *Soc. Sci. Med.* **2024**, *340*, 116472. <https://doi.org/10.1016/j.socscimed.2023.116472>.
- (155) Miglioretto, C.; Beck, E.; Lambert, K. A Scoping Review of the Dietary Information Needs of People with Inflammatory Bowel Disease. *Nutr. Diet.* **2024**, *81* (1), 79–93. <https://doi.org/10.1111/1747-0080.12843>.
- (156) Thompson, H. J. Dietary Bean Consumption and Human Health. *Nutrients* **2019**, *11* (12), 3074. <https://doi.org/10.3390/nu11123074>.
- (157) Hoover, R.; Rorke, S. C.; Martin, A. M. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF LIMA BEAN (PHASEOLUS LUNATUS) STARCH. *J. Food Biochem.* **1991**, *15* (2), 117–136. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.1991.tb00149.x>.
- (158) Vieira, N. M.; Peghinelli, V. V.; Monte, M. G.; Costa, N. A.; Pereira, A. G.; Seki, M. M.; Azevedo, P. S.; Polegato, B. F.; De Paiva, S. A. R.; Zornoff, L. A. M.; Minicucci, M. F. Beans Consumption Can Contribute to the Prevention of Cardiovascular Disease. *Clin. Nutr. ESPEN* **2023**, *54*, 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2023.01.007>.
- (159) Jin, Y.; Chen, L.; Yu, Y.; Hussain, M.; Zhong, H. Bioactive Components in Fruit Interact with Gut Microbes. *Biology* **2023**, *12* (10), 1333. <https://doi.org/10.3390/biology12101333>.
- (160) Rakoff-Nahoum, S.; Coyne, M. J.; Comstock, L. E. An Ecological Network of Polysaccharide Utilization among Human Intestinal Symbionts. *Curr. Biol.* **2014**, *24* (1), 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.10.077>.
- (161) Borgonovi, T. F.; Virgolin, L. B.; Janzantti, N. S.; Casarotti, S. N.; Penna, A. L. B. Fruit Bioactive Compounds: Effect on Lactic Acid Bacteria and on Intestinal Microbiota. *Food Res. Int.* **2022**, *161*, 111809. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111809>.
- (162) Lima, M. D. C.; Do Nascimento, H. M. A.; Da Silva, J. Y. P.; De Brito Alves, J. L.; De Souza, E. L. Evidence for the Beneficial Effects of Brazilian Native Fruits and Their By-Products on Human Intestinal Microbiota and Repercussions on Non-Communicable Chronic Diseases—A Review. *Foods* **2023**, *12* (18), 3491. <https://doi.org/10.3390/foods12183491>.
- (163) Ross, F. C.; Mayer, D. E.; Horn, J.; Cryan, J. F.; Del Rio, D.; Randolph, E.;

- Gill, C. I. R.; Gupta, A.; Ross, R. P.; Stanton, C.; Mayer, E. A. Potential of Dietary Polyphenols for Protection from Age-Related Decline and Neurodegeneration: A Role for Gut Microbiota? *Nutr. Neurosci.* **2024**, 1–19. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2023.2298098>.
- (164) Rogerio, A. P.; Dora, C. L.; Andrade, E. L.; Chaves, J. S.; Silva, L. F. C.; Lemos-Senna, E.; Calixto, J. B. Anti-Inflammatory Effect of Quercetin-Loaded Microemulsion in the Airways Allergic Inflammatory Model in Mice. *Pharmacol. Res.* **2010**, 61 (4), 288–297. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.10.005>.
- (165) Anhê, F. F.; Roy, D.; Pilon, G.; Dudonné, S.; Matamoros, S.; Varin, T. V.; Garofalo, C.; Moine, Q.; Desjardins, Y.; Levy, E.; Marette, A. A Polyphenol-Rich Cranberry Extract Protects from Diet-Induced Obesity, Insulin Resistance and Intestinal Inflammation in Association with Increased *Akkermansia* Spp. Population in the Gut Microbiota of Mice. *Gut* **2015**, 64 (6), 872–883. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307142>.
- (166) Aziz, T.; Hussain, N.; Hameed, Z.; Lin, L. Elucidating the Role of Diet in Maintaining Gut Health to Reduce the Risk of Obesity, Cardiovascular and Other Age-Related Inflammatory Diseases: Recent Challenges and Future Recommendations. *Gut Microbes* **2024**, 16 (1), 2297864. <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2297864>.
- (167) Mills, E.; O'Neill, L. A. J. Succinate: A Metabolic Signal in Inflammation. *Trends Cell Biol.* **2014**, 24 (5), 313–320. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.11.008>.
- (168) Hashash, J. G.; Elkins, J.; Lewis, J. D.; Binion, D. G. AGA Clinical Practice Update on Diet and Nutritional Therapies in Patients With Inflammatory Bowel Disease: Expert Review. *Gastroenterology* **2024**, S001650852305597X. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2023.11.303>.
- (169) Armstrong, H.; Mander, I.; Zhang, Z.; Armstrong, D.; Wine, E. Not All Fibers Are Born Equal; Variable Response to Dietary Fiber Subtypes in IBD. *Front. Pediatr.* **2021**, 8, 620189. <https://doi.org/10.3389/fped.2020.620189>.
- (170) Monteiro, J. S.; Botelho, R. B. A.; Zandonadi, R. P.; Araujo, W. M. C. Is There a Convergence between the Food Classification Adopted by Food-Based Dietary Guidelines and Food Science and Technology? *Foods* **2023**, 12 (20), 3824. <https://doi.org/10.3390/foods12203824>.
- (171) Essa, M. M.; Bishir, M.; Bhat, A.; Chidambaram, S. B.; Al-Balushi, B.;

Hamdan, H.; Govindarajan, N.; Freidland, R. P.; Qoronfleh, M. W. Functional Foods and Their Impact on Health. *J. Food Sci. Technol.* **2023**, *60* (3), 820–834. <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05193-3>.

(172) Godny, L.; Dotan, I. Is the Mediterranean Diet in Inflammatory Bowel Diseases Ready for Prime Time? *J. Can. Assoc. Gastroenterol.* **2024**, *7* (1), 97–103. <https://doi.org/10.1093/jcag/gwad041>.

(173) Noğay, N. H. Chapter 12 - Effects of the Gut Microbiota on Autism Spectrum Disorder.

(174) Crost, E. H.; Coletto, E.; Bell, A.; Juge, N. *Ruminococcus Gnavus*: Friend or Foe for Human Health. *FEMS Microbiol. Rev.* **2023**, *47* (2), fuad014. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuad014>.

(175) González-Soltero, R.; Bailén, M.; De Lucas, B.; Ramírez-Goercke, M. I.; Pareja-Galeano, H.; Larrosa, M. Role of Oral and Gut Microbiota in Dietary Nitrate Metabolism and Its Impact on Sports Performance. *Nutrients* **2020**, *12* (12), 3611. <https://doi.org/10.3390/nu12123611>.

(176) Lee, C.; Lee, J.; Eor, J. Y.; Kwak, M.-J.; Huh, C. S.; Kim, Y. Effect of Consumption of Animal Products on the Gut Microbiome Composition and Gut Health. *Food Sci. Anim. Resour.* **2023**, *43* (5), 723–750. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2023.e44>.

(177) Thøgersen, R.; Castro-Mejía, J. L.; Sundekilde, U. K.; Hansen, L. H.; Hansen, A. K.; Nielsen, D. S.; Bertram, H. C. Ingestion of an Inulin-Enriched Pork Sausage Product Positively Modulates the Gut Microbiome and Metabolome of Healthy Rats. *Mol. Nutr. Food Res.* **2018**, *62* (19), 1800608. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201800608>.

(178) Thøgersen, R.; Castro-Mejía, J. L.; Kræmer Sundekilde, U.; H. Hansen, L.; Gray, N.; Kuhnle, G.; Rye Jørgensen, N.; Kornerup Hansen, A.; Sandris Nielsen, D.; Bertram, H. C. Inulin and Milk Mineral Fortification of a Pork Sausage Exhibits Distinct Effects on the Microbiome and Biochemical Activity in the Gut of Healthy Rats. *Food Chem.* **2020**, *331*, 127291. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127291>.

(179) Yu, K. B.; Hsiao, E. Y. Gut Microbiota: A Sweet Tale of Mice and Microbes. *Curr. Biol.* **2023**, *33* (1), R18–R20. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.11.058>.

(180) Ramne, S.; Brunkwall, L.; Ericson, U.; Gray, N.; Kuhnle, G. G. C.; Nilsson, P. M.; Orho-Melander, M.; Sonestedt, E. Gut Microbiota Composition in Relation

to Intake of Added Sugar, Sugar-Sweetened Beverages and Artificially Sweetened Beverages in the Malmö Offspring Study. *Eur. J. Nutr.* **2021**, *60* (4), 2087–2097. <https://doi.org/10.1007/s00394-020-02392-0>.

(181) Townsend, G. E.; Han, W.; Schwalm, N. D.; Raghavan, V.; Barry, N. A.; Goodman, A. L.; Groisman, E. A. Dietary Sugar Silences a Colonization Factor in a Mammalian Gut Symbiont. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2019**, *116* (1), 233–238. <https://doi.org/10.1073/pnas.1813780115>.

(182) Monteiro, C. A.; Cannon, G.; Levy, R. B.; Moubarac, J.-C.; Louzada, M. L.; Rauber, F.; Khandpur, N.; Cediel, G.; Neri, D.; Martinez-Steele, E.; Baraldi, L. G.; Jaime, P. C. Ultra-Processed Foods: What They Are and How to Identify Them. *Public Health Nutr.* **2019**, *22* (5), 936–941. <https://doi.org/10.1017/S1368980018003762>.

(183) Monteiro, C. A.; Levy, R. B.; Claro, R. M.; Castro, I. R. R. D.; Cannon, G. A New Classification of Foods Based on the Extent and Purpose of Their Processing. *Cad. Saúde Pública* **2010**, *26* (11), 2039–2049. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2010001100005>.

(184) Barbaresco, J.; Bröder, J.; Conrad, J.; Szczerba, E.; Lang, A.; Schlesinger, S. Ultra-Processed Food Consumption and Human Health: An Umbrella Review of Systematic Reviews with Meta-Analyses. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2024**, 1–9. <https://doi.org/10.1080/10408398.2024.2317877>.

(185) Basson, A. R.; Katz, J.; Singh, S.; Celio, F.; Cominelli, F.; Rodriguez-Palacios, A. Sweets and Inflammatory Bowel Disease: Patients Favor Artificial Sweeteners and Diet Foods/Drinks Over Table Sugar and Consume Less Fruits/Vegetables. *Inflamm. Bowel Dis.* **2023**, *29* (11), 1751–1759. <https://doi.org/10.1093/ibd/izac272>.

(186) Stolfi, C.; Pacifico, T.; Monteleone, G.; Laudisi, F. Impact of Western Diet and Ultra-Processed Food on the Intestinal Mucus Barrier. *Biomedicines* **2023**, *11* (7), 2015. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11072015>.

(187) Vissers, E.; Wellens, J.; Sabino, J. Ultra-Processed Foods as a Possible Culprit for the Rising Prevalence of Inflammatory Bowel Diseases. *Front. Med.* **2022**, *9*, 1058373. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.1058373>.

(188) Martínez Leo, E. E.; Segura Campos, M. R. Effect of Ultra-Processed Diet on Gut Microbiota and Thus Its Role in Neurodegenerative Diseases. *Nutrition* **2020**, *71*, 110609. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2019.110609>.

- (189) Marion-Letellier, R.; Amamou, A.; Savoye, G.; Ghosh, S. Inflammatory Bowel Diseases and Food Additives: To Add Fuel on the Flames! *Nutrients* **2019**, *11* (5), 1111. <https://doi.org/10.3390/nu11051111>.
- (190) Magro, D. O.; Kotze, P. G.; Martinez, C. A. R.; Camargo, M. G.; Guadagnini, D.; Calixto, A. R.; Vasques, A. C. J.; Ayrizono, M. D. L. S.; Geloneze, B.; Pareja, J. C.; Saad, M. J.; Coy, C. S. R. Changes in Serum Levels of Lipopolysaccharides and CD26 in Patients with Crohn's Disease. *Intest. Res.* **2017**, *15* (3), 352. <https://doi.org/10.5217/ir.2017.15.3.352>.
- (191) Zhou, Y. Q.; Xu, R. Y.; Wan, Y. P. The Role of Dietary Factors in Inflammatory Bowel Diseases: New Perspectives. *J. Dig. Dis.* **2019**, *20* (1), 11–17. <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12686>.
- (192) Schoeler, M.; Ellero-Simatos, S.; Birkner, T.; Mayneris-Perxachs, J.; Olsson, L.; Brolin, H.; Loeber, U.; Kraft, J. D.; Polizzi, A.; Martí-Navas, M.; Puig, J.; Moschetta, A.; Montagner, A.; Gourdy, P.; Heymes, C.; Guillou, H.; Tremaroli, V.; Fernández-Real, J. M.; Forslund, S. K.; Burcelin, R.; Caesar, R. The Interplay between Dietary Fatty Acids and Gut Microbiota Influences Host Metabolism and Hepatic Steatosis. *Nat. Commun.* **2023**, *14* (1), 5329. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41074-3>.
- (193) Xu, A. A.; Kennedy, L. K.; Hoffman, K.; White, D. L.; Kanwal, F.; El-Serag, H. B.; Petrosino, J. F.; Jiao, L. Dietary Fatty Acid Intake and the Colonic Gut Microbiota in Humans. *Nutrients* **2022**, *14* (13), 2722. <https://doi.org/10.3390/nu14132722>.
- (194) Bouvard, V.; Loomis, D.; Guyton, K. Z.; Grosse, Y.; Ghissassi, F. E.; Benbrahim-Tallaa, L.; Guha, N.; Mattock, H.; Straif, K. Carcinogenicity of Consumption of Red and Processed Meat. *Lancet Oncol.* **2015**, *16* (16), 1599–1600. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00444-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00444-1).
- (195) Davila, A.-M.; Blachier, F.; Gotteland, M.; Andriamihaja, M.; Benetti, P.-H.; Sanz, Y.; Tomé, D. Intestinal Luminal Nitrogen Metabolism: Role of the Gut Microbiota and Consequences for the Host. *Pharmacol. Res.* **2013**, *68* (1), 95–107. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.11.005>.
- (196) Muhammad, A. Y.; Amonov, M.; Baig, A. A.; Alvi, F. J. Gut Microbiome: An Intersection between Human Genome, Diet, and Epigenetics. *Adv. Gut Microbiome Res.* **2024**, *2024*, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2024/6707728>.
- (197) Turnbaugh, P. J.; Hamady, M.; Yatsunencko, T.; Cantarel, B. L.; Duncan,

- A.; Ley, R. E.; Sogin, M. L.; Jones, W. J.; Roe, B. A.; Affourtit, J. P.; Egholm, M.; Henrissat, B.; Heath, A. C.; Knight, R.; Gordon, J. I. A Core Gut Microbiome in Obese and Lean Twins. *Nature* **2009**, *457* (7228), 480–484. <https://doi.org/10.1038/nature07540>.
- (198) Zhao, J.; Zhang, X.; Liu, H.; Brown, M. A.; Qiao, S. Dietary Protein and Gut Microbiota Composition and Function. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2018**, *20* (2), 145–154. <https://doi.org/10.2174/1389203719666180514145437>.
- (199) Pratelli, G.; Tamburini, B.; Badami, G. D.; Lo Pizzo, M.; De Blasio, A.; Carlisi, D.; Di Liberto, D. Cow's Milk: A Benefit for Human Health? Omics Tools and Precision Nutrition for Lactose Intolerance Management. *Nutrients* **2024**, *16* (2), 320. <https://doi.org/10.3390/nu16020320>.
- (200) Lyu, R.; Qu, Y.; Divaris, K.; Wu, D. Methodological Considerations in Longitudinal Analyses of Microbiome Data: A Comprehensive Review. *Genes* **2023**, *15* (1), 51. <https://doi.org/10.3390/genes15010051>.
- (201) Roach, J.; Mital, R.; Haffner, J. J.; Colwell, N.; Coats, R.; Palacios, H. M.; Liu, Z.; Godinho, J. L. P.; Ness, M.; Peramuna, T.; McCall, L.-I. Microbiome Metabolite Quantification Methods Enabling Insights into Human Health and Disease. *Methods* **2024**, *222*, 81–99. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2023.12.007>.
- (202) Wu, J.; Singleton, S. S.; Bhuiyan, U.; Krammer, L.; Mazumder, R. Multi-Omics Approaches to Studying Gastrointestinal Microbiome in the Context of Precision Medicine and Machine Learning. *Front. Mol. Biosci.* **2024**, *10*, 1337373. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2023.1337373>.
- (203) Luo, M.; Zhu, J.; Jia, J.; Zhang, H.; Zhao, J. Progress on Network Modeling and Analysis of Gut Microecology: A Review. *Appl. Environ. Microbiol.* **2024**, e00092-24. <https://doi.org/10.1128/aem.00092-24>.
- (204) FERRER, I. Racecadotril. Bula Apresentada à Agência Nacional de Vigilância Sanitária. http://200.199.142.163:8002/FOTOS_TRATADAS_SITE_14-03-2016/bulas/16883.pdf.
- (205) JANSSEN-CILAG, F. Cloridrato de Loperamida. Bula Apresentada à Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- (206) Vester-Andersen, M. K.; Mirsepasi-Lauridsen, H. C.; Prosberg, M. V.; Mortensen, C. O.; Träger, C.; Skovsen, K.; Thorkilgaard, T.; Nøjgaard, C.; Vind, I.; Krogfelt, K. A.; Sørensen, N.; Bendtsen, F.; Petersen, A. M. Increased Abun-

dance of Proteobacteria in Aggressive Crohn's Disease Seven Years after Diagnosis. *Sci. Rep.* **2019**, 9 (1), 13473. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49833-3>.

(207) Mukhopadhyay, I.; Hansen, R.; El-Omar, E. M.; Hold, G. L. IBD—What Role Do Proteobacteria Play? *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2012**, 9 (4), 219–230. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.14>.

(208) Rizzatti, G.; Lopetuso, L. R.; Gibiino, G.; Binda, C.; Gasbarrini, A. Proteobacteria: A Common Factor in Human Diseases. *BioMed Res. Int.* **2017**, 2017, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2017/9351507>.

(209) NIH Human Microbiome Portfolio Analysis Team. A Review of 10 Years of Human Microbiome Research Activities at the US National Institutes of Health, Fiscal Years 2007-2016. *Microbiome* **2019**, 7 (1), 31. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0620-y>.

(210) Golob, J. L.; Margolis, E.; Hoffman, N. G.; Fredricks, D. N. Evaluating the Accuracy of Amplicon-Based Microbiome Computational Pipelines on Simulated Human Gut Microbial Communities. *BMC Bioinformatics* **2017**, 18 (1), 283. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1690-0>.

(211) Kolde, R.; Franzosa, E. A.; Rahnavard, G.; Hall, A. B.; Vlamakis, H.; Stevens, C.; Daly, M. J.; Xavier, R. J.; Huttenhower, C. Host Genetic Variation and Its Microbiome Interactions within the Human Microbiome Project. *Genome Med.* **2018**, 10 (1), 6. <https://doi.org/10.1186/s13073-018-0515-8>.

(212) Rosenfeld, G.; Angelova, A.; Shin, C.; Quinones, M.; Hurt, D. Current Challenges in Microbiome Metadata Collection. May 5, 2021. <https://doi.org/10.1101/2021.05.05.442781>.

(213) Gloor, G. B.; Wu, J. R.; Pawlowsky-Glahn, V.; Egozcue, J. J. It's All Relative: Analyzing Microbiome Data as Compositions. *Ann. Epidemiol.* **2016**, 26 (5), 322–329. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2016.03.003>.

(214) Kers, J. G.; Saccenti, E. The Power of Microbiome Studies: Some Considerations on Which Alpha and Beta Metrics to Use and How to Report Results. *Front. Microbiol.* **2022**, 12, 796025. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.796025>.

(215) Amos, G. C. A.; Sergaki, C.; Logan, A.; Iriarte, R.; Bannaga, A.; Chandrapalan, S.; Wellington, E. M. H.; Rijpkema, S.; Arasaradnam, R. P. Exploring How Microbiome Signatures Change across Inflammatory Bowel Disease Conditions and Disease Locations. *Sci. Rep.* **2021**, 11 (1), 18699.

<https://doi.org/10.1038/s41598-021-96942-z>.

(216) Colella, M.; Charitos, I. A.; Ballini, A.; Cafiero, C.; Topi, S.; Palmirotta, R.; Santacroce, L. Microbiota Revolution: How Gut Microbes Regulate Our Lives. *World J. Gastroenterol.* **2023**, *29* (28), 4368–4383. <https://doi.org/10.3748/wjg.v29.i28.4368>.

(217) Teófilo, J. S. C. Perfil do microbioma intestinal humano com dados de metagenoma em brasileiros, Universidade Federal de Santa Catarina, 2021.

(218) García-Montero, C.; Fraile-Martínez, O.; Gómez-Lahoz, A. M.; Pekarek, L.; Castellanos, A. J.; Nogueras-Fraguas, F.; Coca, S.; Guijarro, L. G.; García-Honduvilla, N.; Asúnsolo, A.; Sanchez-Trujillo, L.; Lahera, G.; Bujan, J.; Monserrat, J.; Álvarez-Mon, M.; Álvarez-Mon, M. A.; Ortega, M. A. 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. <https://doi.org/10.3390/nu13020699>.

(219) Zinöcker, M.; Lindseth, I. The Western Diet–Microbiome–Host Interaction and Its Role in Metabolic Disease. *Nutrients* **2018**, *10* (3), 365. <https://doi.org/10.3390/nu10030365>.

(220) Frame, L. A.; Costa, E.; Jackson, S. A. Current Explorations of Nutrition and the Gut Microbiome: A Comprehensive Evaluation of the Review Literature. *Nutr. Rev.* **2020**, *78* (10), 798–812. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuz106>.

(221) Shin, N.-R.; Whon, T. W.; Bae, J.-W. Proteobacteria: Microbial Signature of Dysbiosis in Gut Microbiota. *Trends Biotechnol.* **2015**, *33* (9), 496–503. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.011>.

(222) Belkaid, Y.; Hand, T. W. Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation. *Cell* **2014**, *157* (1), 121–141. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.011>.

(223) Hou, K.; Wu, Z.-X.; Chen, X.-Y.; Wang, J.-Q.; Zhang, D.; Xiao, C.; Zhu, D.; Koya, J. B.; Wei, L.; Li, J.; Chen, Z.-S. Microbiota in Health and Diseases. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2022**, *7* (1), 135. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00974-4>.

(224) Vidal-Gallardo, A.; Méndez Benítez, J. E.; Flores Rios, L.; Ochoa Meza, L. F.; Mata Pérez, R. A.; Martínez Romero, E.; Vargas Beltran, A. M.; Beltran Hernandez, J. L.; Banegas, D.; Perez, B.; Martinez Ramirez, M. The Role of Gut Microbiome in the Pathogenesis and the Treatment of Inflammatory Bowel Diseases. *Cureus* **2024**. <https://doi.org/10.7759/cureus.54569>.

- (225) Prame Kumar, K.; Ooi, J. D.; Goldberg, R. The Interplay between the Microbiota, Diet and T Regulatory Cells in the Preservation of the Gut Barrier in Inflammatory Bowel Disease. *Front. Microbiol.* **2023**, *14*, 1291724. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1291724>.
- (226) Christensen, C.; Knudsen, A.; Arnesen, E. K.; Hatlebakk, J. G.; Sletten, I. S.; Fadnes, L. T. Diet, Food, and Nutritional Exposures and Inflammatory Bowel Disease or Progression of Disease: An Umbrella Review. *Adv. Nutr.* **2024**, *15* (5), 100219. <https://doi.org/10.1016/j.advnut.2024.100219>.
- (227) Cheng, H.; Zhou, J.; Sun, Y.; Zhan, Q.; Zhang, D. High Fructose Diet: A Risk Factor for Immune System Dysregulation. *Hum. Immunol.* **2022**, *83* (6), 538–546. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2022.03.007>.

11. Anexos

11.1 Anexo 1: Termo De Consentimento Livre e Esclarecido

Estudo longitudinal da microbiota intestinal em portadores de Doença de Crohn Ileocolônica e Colônica após a introdução da terapia com Anti-Fator de Necrose Tumoral e correlação com as características clínicas e fenótipos da doença.

Dr. Marcello Imbrizi Rabello, Dra. Daniela Oliveira Magro, Dr. Mario José Abdala Saad, Dr. Cláudio Saddy Rodrigues Coy

Número do CAAE: 50831615.1.0000.5404

Você está sendo convidado a participar como voluntário de uma pesquisa.

Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador. Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com um dos pesquisadores. Se preferir, pode levar este Termo para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar.

Não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo se você não aceitar participar ou retirar sua autorização em qualquer momento.

Justificativa e objetivos:

Estamos estudando as doenças inflamatórias intestinais: Doença de Crohn.

Este estudo será desenvolvido no Ambulatório de Coloproctologia do Gastrocentro da UNICAMP, e seu objetivo é analisar a sua flora intestinal e as interações com seu tratamento e manifestações clínicas da Doença de Crohn.

A escolha da medicação ou a necessidade de qualquer modificação na terapia não serão afetadas caso você esteja participando do estudo.

O objetivo deste estudo é avaliar a microbiota intestinal nos pacientes com Doença de Crohn, pesquisar se existe diferenças na flora intestinal de acordo com os sintomas e a apresentação clínica da doença e verificar se após o tratamento a flora bacteriana será modificada.

Procedimentos:

Com a participação neste estudo você irá ser observado e realizará exames para a avaliação da atividade da doença (exames de sangue e de fezes capazes de identificar se a sua doença está ativa ou se está melhorando conforme o tratamento), composição da flora intestinal (exame de fezes que vai identificar alguns tipos de bactérias que vivem dentro do seu intestino), monitorização dos exames de sangue que avaliam inflamação, deficiências nutricionais, efeitos colaterais relacionados a medicação que foi prescrita para o seu tratamento e quantidade desta medicação circulante no seu sangue.

Todos os exames serão realizados gratuitamente. Os exames de calprotectina fecal, a dosagem do nível sérico da medicação anti-TNF (medicação que foi prescrita para seu tratamento, seja Infliximabe ou Adalimumabe) e a avaliação da composição microbiana serão custeados pela pesquisa. Todos os demais exames serão custeados pelo Sistema Único de Saúde.

Os pesquisadores acessarão os dados contidos em seu prontuário, avaliando o perfil de sua doença, os exames já realizados e os tratamentos já empregados, sejam eles medicamentosos ou cirúrgicos.

Num período de 12 meses você realizará os seguintes exames:

Exames que são realizados na rotina do seu tratamento, independentemente do estudo, e serão avaliados na pesquisa:

- 2 colonoscopias com biópsias intestinais (uma antes de iniciar a terapia e outra ao fim de 12 meses de terapia. Estes exames são rotineiramente solicitados para indicar o início da medicação e posteriormente, avaliar se a medicação apresentou resultado).
- 2 Ressonâncias Nucleares Magnéticas ou Tomografias Computadorizadas (este exame será realizado somente se você tiver Doença de Crohn que acometa o intestino delgado, a critério dos médicos do ambulatório).

Exames que serão realizados para a pesquisa, e poderão ser utilizados na rotina do seu tratamento, caso sejam necessários:

- 3 coletas de fezes para avaliação da composição microbiana e dosagem da calprotectina.
- 4 coletas de sangue.

Ao participar deste estudo você deverá conceder amostras de fezes, coletadas em sua própria casa e posteriormente entregues ao laboratório no prazo máximo de 24 horas. As fezes serão utilizadas para extração de DNA bacteriano para a determinação da composição da flora intestinal além da dosagem da calprotectina fecal.

Todas as colonoscopias serão realizadas no Gastrocentro e seguem a rotina do serviço com orientações pela equipe de enfermagem sobre o exame e complicações. O preparo é feito com Manitol a 10% que será fornecido pelo Gastrocentro. Espera-se que ao final do mesmo você apresente evacuações líquidas de cor amarelo claro. Os exames serão realizados com horário pré-definido, no período da manhã ou tarde. Na eventualidade de ocorrerem sintomas como dor abdominal (cólica, náuseas ou vômitos), você será medicado no Gastrocentro sob a orientação do médico que realizará a colonoscopia e do pesquisador responsável Dr. Marcello Imbrizi Rabello.

Os exames de Ressonância Nuclear Magnética serão realizados no Hospital de Clínicas e seguem a rotina do serviço com orientações pela equipe de enfermagem sobre o exame e complicações. Antes de iniciar o exame será realizada a ingestão com solução de polietilenoglicol para a distensão do intestino. Ao final do exame você poderá sentir vontade de evacuar pois esta medicação

tem atividade laxativa. Você receberá contraste via intravenosa a base de gadolínio. Caso exista alguma contraindicação à realização da Ressonância, você poderá realizar a Tomografia Computadorizada, que segue os mesmos padrões, porém o contraste intravenoso é a base de Iodo.

Na primeira avaliação você será questionado sobre seus hábitos de vida, como alimentação, tabagismo e prática de atividade física. Este questionário poderá ser respondido em aproximadamente cinco minutos.

Desconfortos e riscos:

Caso você participe do estudo, algumas questões precisam ser esclarecidas.

Não iremos interferir na indicação das medicações do tratamento da Doença de Crohn. Após o final da pesquisa você continuará sendo acompanhado pela equipe do ambulatório de Doenças Inflamatórias Intestinais normalmente, sem nenhum ônus.

Caso haja necessidade de consultas adicionais, fora da sua rotina habitual de tratamento, você será ressarcido dos gastos necessários para tal.

Ao participar desta pesquisa você será submetido a exames comuns ao acompanhamento da Doença de Crohn, incluindo colonoscopias, coleta de sangue e fezes para exames laboratoriais, além da coleta de fezes para estudo. Estes exames já fazem parte de sua rotina de acompanhamento, portanto espera-se que o desconforto ocasionado seja pequeno.

Os riscos relacionados à colonoscopia estão associados as complicações técnicas, incluindo a ocorrência de perfuração intestinal e sangramento, além de distúrbios hidroeletrólíticos oriundos do preparo intestinal e a complicações decorrentes da sedação.

Os riscos relacionados à Ressonância Nuclear Magnética ou Tomografia Computadorizada são relacionados aos meios de contraste, podendo ocorrer diarreia, alteração da função renal ou reações alérgicas (hipersensibilidade).

As amostras de fezes, tanto para exames laboratoriais quanto para análise de microbiota, poderão ser coletadas em casa, e a seguir entregues no ambulatório, gerando assim o mínimo desconforto.

As amostras de sangue para exames laboratoriais serão colhidas na rotina habitual de seu acompanhamento no ambulatório. Em relação aos ricos e desconfortos para a coleta de sangue pode ocorrer dor no local da punção, hematoma (mancha roxa), flebite (inflamação no braço).

Em caso de dúvidas sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com o pesquisador, *Dr. Marcello Imbrizi Rabello*, por telefone, SMS ou mensagem de WhatsApp pelo número (19)998792736. Também poderão ser contactados em horário comercial pelo telefone (19)35218540 ou por e-mail: marcelloimbrizi@gmail.com e ou no próprio ambulatório de Coloproctologia do Gastrocentro da UNICAMP, situado na Rua Carlos Chagas, 480 piso térreo.

Benefícios:

Os benefícios serão contribuir com informações que irão ajudar no tratamento e no entendimento da Doença de Crohn.

Acompanhamento e assistência:

Os pacientes participantes da pesquisa receberão assistência idêntica aos que não estão participando.

Durante o período de estudo os participantes serão acompanhados através de consultas presenciais trimestrais, e após o término deste ou em caso de sua interrupção, retornarão à rotina de acompanhamento habitual no ambulatório, sem distinção em relação aos que não participaram.

Diante de eventuais danos, direta ou indiretamente relacionados à pesquisa, imediatos ou tardios, você terá direito ao acompanhamento e assistência integral, de forma gratuita, pelo tempo que for necessário.

Durante as consultas de acompanhamento você será avaliado, e poderá ser conduzido para intervenções necessárias à melhor condução do seu caso, incluindo acompanhamento médico em outras especialidades, acompanhamento nutricional ou psicológico, sem distinção em relação aos pacientes que não participaram.

Você pode desistir de participar do estudo a qualquer momento, e essa decisão não prejudicará seu atendimento médico atual ou futuro na instituição envolvida nesta pesquisa.

Caso participe, você terá acesso garantido aos resultados da pesquisa. Terá direito aos resultados de exames, sempre que solicitados.

Sigilo e privacidade:

Você tem a garantia de que sua identidade será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores.

Na divulgação dos resultados desse estudo, seu nome não será citado. Os dados de seu acompanhamento clínico serão obtidos a partir do seu prontuário médico (pasta de atendimento), com a garantia de sigilo dos seus dados pessoais.

As informações obtidas no estudo serão estritamente confidenciais, garantindo anonimato e privacidade da sua identidade, na apresentação e/ou divulgação dos resultados.

Ressarcimento e Indenização:

Não haverá nenhuma forma de reembolso financeiro, já que a participação na pesquisa, não terá nenhum gasto adicional.

A coleta de dados será realizada durante a rotina de seu atendimento. Caso ocorra a necessidade de sua presença fora da rotina do ambulatório, haverá o ressarcimento das despesas decorrentes da participação na pesquisa, tais como transporte e alimentação, tanto para o participante quanto para seu acompanhante, quando for necessário.

Os participantes têm direito à indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa, desde que o mesmo se comprove e seja assim definido de forma legal.

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você poderá entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNICAMP das 08:30h às 11:30hs e das 13:00h às 17:00h na Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936 ou (19) 3521-7187; e-mail: cep@fcm.unicamp.br.

Armazenamento de Material

Participando desta pesquisa você fornecerá amostras de fezes para estudo, e o DNA dessas fezes será armazenado em um Biorrepositório, e após o término da pesquisa poderão ser mantidas por até 10 anos, podendo ou não ser utilizadas em novos estudos.

A guarda e a autorização do uso do referido material estará sob a responsabilidade exclusiva do Prof. Dr. Claudio Saddy Rodrigues Coy (matrícula 272906), Docente do Departamento de Cirurgia da FCM-UNICAMP.

Toda nova pesquisa a ser realizada com o material armazenado será submetida para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

() concordo em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa.

() concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

Em caso de falecimento ou condição incapacitante, os direitos sobre o material armazenado deverão ser dados a: _____ (indicar o nome de uma pessoa a ser contatada).

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP):

O papel do CEP é avaliar e acompanhar os aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), tem por objetivo desenvolver a regulamentação sobre proteção dos seres humanos envolvidos na pesquisa. Desempenha um papel coordenador da rede de Comitês de Ética em Pesquisa (CEPs) das instituições, além de assumir a função de órgão consultor na área de ética em pesquisas.

Consentimento livre e esclarecido:

Após ter recebido esclarecimentos sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar e declaro estar recebendo uma via original deste documento assinada pelo pesquisador e por mim, tendo todas as folhas por nós rubricadas:

Nome do (a) participante:

Contato

telefônico:

E-mail

(opcional):

Data:

____/____/____

(Assinatura do participante)

Responsabilidade do Pesquisador:

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado e pela CONEP, quando pertinente. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

Data: ____/____/____.

(Assinatura do pesquisador)

11.2 Anexo 2: Questionário Social e Alimentar:

Nome: _____

Número Pesquisa: _____ Data de Nascimento: ____/____/____

Local de Nascimento: Cidade: _____ Estado: _____

Cidade atual: _____ Estado: _____ Tempo (anos): _____

Profissão: _____ Escolaridade: _____

Escolaridade: Pai: _____ Mãe: _____

Sua casa tem rede de saneamento de esgoto? () Sim () Não

Sua casa tem água tratada? () Sim () Não

Em sua casa tem animais de estimação: () Sim () Não

Quantas horas você dorme (em média): _____

Presença de manifestações extraintestinais? Quais? _____

Tem alguma doença crônica? Qual? _____

Uso de medicações? Qual? _____

Já realizou alguma cirurgia? Qual? _____

Seus parentes de primeiro ou segundo grau têm Doença de Crohn? _____

Você fuma ou já fumou? () Fumo () Já fumei () Não

(tempo que interrompeu em anos: _____)

Sobre sua alimentação:

Você come leguminosas (ex: feijão, grão de bico, lentilha)?

☐ Sim ☐ Não

Frequência: ☐ < 1 vez/sem ☐ 1-2 vezes/sem ☐ > 3 vezes/sem

Você come frutas? ☐ Sim ☐ Não

Frequência:

☐ < 1 vez/sem ☐ 1-2 vezes/sem ☐ > 3 vezes/sem

☐ 1x dia ☐ > 1/ dia

Você come verduras? ☐ Sim ☐ Não

Frequência:

☐ < 1 vez/sem ☐ 1-2 vezes/sem ☐ > 3 vezes/sem

☐ 1x dia ☐ > 1/ dia

Você come legumes e tubérculos (ex: cenoura, batata, beterraba) ?

☐ Sim ☐ Não

Frequência:

☐ < 1 vez/sem ☐ 1-2 vezes/sem ☐ > 3 vezes/sem

☐ 1x dia ☐ > 1/ dia

Você come frituras? ☐ Sim ☐ Não

Frequência:

☐ < 1 vez/sem ☐ 1-2 vezes/sem ☐ > 3 vezes/sem

☐ 1x dia ☐ > 1/ dia

Você come enlatados? ☐ Sim ☐ Não

Frequência:

☐ < 1 vez/sem ☐ 1-2 vezes/sem ☐ > 3 vezes/sem

☐ 1x dia ☐ > 1/ dia

Você come defumados (presunto, mortadela, linguiça, etc.)? ☐ Sim ☐ Não

Frequência:

☐ < 1 vez/sem ☐ 1-2 vezes/sem ☐ > 3 vezes/sem

☐ 1x dia ☐ > 1/ dia

Você come doces? ☐ Sim ☐ Não

Frequência:

☐ < 1 vez/sem ☐ 1-2 vezes/sem ☐ > 3 vezes/sem

☐ 1x dia ☐ > 1/ dia

Você come carne bovina? ☐ Sim ☐ Não

Frequência:

() < 1 vez/sem () 1-2 vezes/sem () > 3 vezes/sem

() 1x dia () > 1/ dia

Você come carne suína? () Sim () Não

Frequência:

() < 1 vez/sem () 1-2 vezes/sem () > 3 vezes/sem

() 1x dia () > 1/ dia

Você come carne de peixe? () Sim () Não

Frequência:

() < 1 vez/sem () 1-2 vezes/sem () > 3 vezes/sem

() 1x dia () > 1/ dia

Você come carne de frango? () Sim () Não

Frequência:

() < 1 vez/sem () 1-2 vezes/sem () > 3 vezes/sem

() 1x dia () > 1/ dia

Você ingere leite e derivados? () Sim () Não

Frequência:

() < 1 vez/sem () 1-2 vezes/sem () > 3 vezes/sem

() 1x dia () > 1/ dia

Sobre atividade física:

Você pratica atividade física aeróbica? () Sim () Não

Frequência:

() < 1 vez/sem () 1-2 vezes/sem () > 3 vezes/sem

() 1x dia () > 1/ dia

Peso Usual: _____

Peso Atual: _____

Altura: _____

11.3 Anexo 3: Acesse o código QR para visualizar as famílias e/ou ordens.



<https://qrco.de/beqpel>

11.4 Anexo 4: Acesse o código QR para visualizar os gêneros e/ou espécies.



<https://qrco.de/beqpfy>

11.5 Anexo 5: Composição dos fios nos dois momentos avaliados.

	Actinobacteri/	Bacteroides	Cyanobacteri/	Firmicutes	Fusobacteri	Fusobacteri	Proteobacteri	Saccharibact	Synergistetes	Verrucomicrobi
	ActinobacteriaPos	BacteroidetesPos	CyanobacteriaPos	FirmicutesPos	FusobacteriaPos	FusobacteriaPos	ProteobacteriaPos	SaccharibacteriaPos	SynergistetesPos	VerrucomicrobiPos
1	0.0091	48.5818	0	49.3727	32.0636	0	1.4909	0.8455	0	0.5273
2	0.0091	68.8727	0	11.4091	56.3727	0.4384	2.8727	0.1909	0	0.5273
3	0.2636	22.8636	0	17.2818	61.3455	16.1273	6.4384	21.8545	0.0091	5.4384
4	31.8636	0.2645	0	2.8545	50.2909	0	65.1545	1.9727	0	0.0091
5	0.0273	65.1636	0	24.4636	66.1818	0.9636	0.9327	0.0545	0	0
6	0.0273	0.0455	0	23.7455	23.5091	0.0091	1.7818	1.0545	0	0.1182
7	0.0818	53.7727	0	44.6182	45.6909	0	1.5273	0.0273	0	0
Media	4.61168571	48.0844	0	24.3922	47.2467143	0.883128571	17.9582686	4.2883	0.01298571	0.22338571
SD	12.0173023	23.45707739	0	16.8774908	15.31414725	2.74767078	25.7606196	7.785685363	0.01952225	0.35806362
Mediana	0.2645	53.7727	47.4818	20.7455	50.2909	0.0091	2.8727	1.9727	0.0091	0
Quanti 25%	0.0182	0.0909	35.7727	14.3455	38.87725	0.95	0	0.95	0	0
Quanti 75%	0.1727	66.98545	59	34.5409	58.8591	8.46815	26.4136	2.09545	0.01865	0.01365
Quanti 90%	0.1545	0.68835	31.27275	20.19545	19.88185	4.68185	0.22275	1.4545	0.01365	0.32275
Quanti 95%	0.1545	0.68835	31.27275	20.19545	19.88185	4.68185	0.22275	1.4545	0.01365	0.32275

11.6 Anexo 6: Proposta para o protocolo para avaliação da microbiota intestinal em portadores de Doenças Inflamatórias Intestinais.

- Definição do tema e revisão da literatura.
 - Descrição detalhada do tema de pesquisa assim como detalhamento das palavras-chaves e citação das referências bibliográficas.
- Classificação das doenças pesquisadas conforme o Classificação Internacional de Doença (CID) vigente.
 - A busca de pacientes em prontuários poderá ser realizada através do código da doença conforme o CID vigente. Atualmente a décima versão do CID é a utilizada.
- Diagnóstico
 - Definição dos diagnósticos e dos critérios realizados para o diagnóstico das doenças estudadas.
- Critérios de Inclusão
 - Critérios estabelecidos de características do paciente para que os mesmos possam ser incluídos no protocolo.
- Critérios de Exclusão
 - Critérios ou características que impedem a inclusão do paciente no protocolo de avaliação.
- Definição dos objetivos da pesquisa
 - Esclarecer qual o objetivo principal da análise da microbiota e quais serão os objetivos secundários.
- Definição metodológica:
- Definição dos sítios avaliados e material necessário

- Para avaliação da microbiota:
 - Íleo terminal, cólon e reto:
 - Amostras fecais
 - Tecido
 - Intestino Delgado:
 - Aspirado por via endoscópica
 - Tecido
- Para avaliação da metabolômica
 - Íleo terminal, cólon e reto
 - Amostras fecais
 - Tecido
 - Sangue
 - Intestino Delgado:
 - Aspirado por via endoscópica
 - Tecido
 - Sangue
- Para avaliação da expressão de micro RNAs
 - Todos os sítios
 - Tecido
- Definição da forma de armazenamento e locais de trabalho.
 - Para avaliação da microbiota
 - Amostras fecais:
 - Armazenamento único em solução de proteção de DNA e RNA
 - armazenamento inicial em geladeira por até 7 dias
 - armazenamento definitivo em freezer temperatura $\leq -80^{\circ}\text{C}$
 - Amostras de tecido:
 - Armazenamento em solução de proteção de DNA e RNA
 - armazenamento inicial em geladeira por até 7 dias

- armazenamento definitivo em freezer temperatura $\leq -80^{\circ}\text{C}$
 - Armazenamento imediato por congelação em nitrogênio líquido e posterior armazenamento em freezer temperatura $\leq -80^{\circ}\text{C}$
- Para avaliação da metabolômica
 - Amostras fecais:
 - Armazenamento em frasco estéril e congelamento imediato em nitrogênio líquido e posterior armazenamento em freezer temperatura $\leq -80^{\circ}\text{C}$
 - Amostras sanguíneas:
 - Realização de centrifugação e armazenamento do soro em freezer temperatura $\leq -80^{\circ}\text{C}$
- Para avaliação da expressão de micro RNAs
 - Amostras de tecido
 - Armazenamento inicial em formol.
 - Inclusão dos tecidos em parafina, seguindo o processo padrão de preparo de lâminas com separação de fragmento fatiado com tamanho de 8 a 10 micras.
- Locais de Realização da Pesquisa e Coleta das Amostras
 - Gastrocentro, Unicamp. Disciplina de Gastroenterologia, Departamento de Clínica Médica.
 - As amostras de tecido de cólon devem ser realizadas em exames endoscópicos com pinça de biópsia comum.
 - Um frasco com solução de proteção de DNA e RNA (microbiota).
 - Um frasco com formol (mRNA).
 - As amostras de aspiração de conteúdo intestinal devem ser realizadas com cateter injetor.
 - Um frasco com solução de proteção de DNA e RNA (microbiota).
 - Um frasco estéril (metabólitos).

- A coleta de fezes pode ser realizada em domicílio pelo próprio paciente ou dentro do Gastrocentro utilizando:
 - Acessório para apoio de vaso sanitário.
 - Armazenamento das fezes em frasco com solução de proteção de DNA e RNA (microbiota).
 - Armazenamento das fezes em frasco simples (metabólitos).
 - A preparação das amostras de tecido e corte dos fragmentos de parafina serão realizados no laboratório de patologia do Gastrocentro.
 - As amostras sanguíneas serão coletadas no hospital dia do Gastrocentro e encaminhadas ao Laboratório de Investigação Clínica de Resistência à Insulina (LICRI) imediatamente após a coleta em embalagem resfriada térmica.
 - Os documentos da pesquisa poderão ser armazenados na Sala de Pesquisa Clínica de Doenças Intestinais, Disciplina de Gastroenterologia, Departamento de Clínica Médica.
- LICRI, Departamento de Clínica Médica.
 - Os seguintes processos serão realizados no LICRI.
 - Centrifugação do sangue e separação do soro.
 - Preparo das fezes e extração de RNA e DNA.
 - Análise da microbiota.
 - Centro de Investigação em Pediatria, Disciplina de Gastroenterologia Pediátrica, Departamento de Pediatria.
 - Os seguintes processos serão realizados no CIP:
 - Armazenamento em freezer conforme protocolo do biobanco local aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.
 - Faculdade de Medicina de Botucatu, Disciplina de Gastroenterologia da Universidade Estadual de São Paulo, UNESP, Botucatu.
 - A avaliação da expressão de micro RNAs é realizada em parceria com a Disciplina de Gastroenterologia da Universidade Estadual de São Paulo, UNESP.

- Definição centros de tratamento de pacientes com DII.
 - Ambulatório de Diarreias, disciplina de Gastroenterologia, departamento de Clínica Médica, Hospital de Clínicas – Unicamp.
 - Ambulatório de Doenças Inflamatórias Intestinais, disciplina de Coloproctologia, departamento de Cirurgia, Gastrocentro – Unicamp.
 - Ambulatório de Gastropediatria, disciplina de Gastroenterologia Pediátrica, departamento de Pediatria, Hospital de Clínicas – Unicamp.

- Definição do tipo de avaliação e monitoramento.
 - Esclarecimento sobre o tipo de estudo, transversal ou horizontal, e os tempos em que as amostras serão coletadas.

- Realização do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)
 - O TCLE deverá conter a explanação e objetivo da pesquisa, as responsabilidades e, se houver, os riscos dos pacientes, os locais em que a pesquisa será realizada e a forma de publicação dos resultados.
 - Deverá ser assinado pelo médico e pelo paciente.
 - Deverá ser redigido em linguagem simples de fácil entendimento pelo paciente.

11.7 Anexo 7: Parecer Consubstanciado do CEP.



UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo longitudinal da microbiota intestinal em portadores de Doença de Crohn Ileocolônica e Colônica após a introdução da terapia com Anti-Fator de Necrose Tumoral e correlação com as características clínicas e fenótipos da doença.

Pesquisador: Claudio Saddy Rodrigues Coy **Area Temática:**

Versão: 3

CAAE: 34826220.4.0000.5404

Instituição Proponente: Gastrocentro

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.498.687

Apresentação do Projeto:

- As informações contidas nos campos “Apresentação do Projeto”, “Objetivo da Pesquisa” e “Avaliação dos Riscos e Benefícios” foram obtidas dos documentos apresentados para apreciação ética e das informações inseridas pelo Pesquisador Responsável do estudo na Plataforma Brasil.

As Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) representadas principalmente pela Doença de Crohn (DC) e pela Retocolite Ulcerativa (RCU) são doenças sistêmicas, de acometimento principalmente intestinal, com patogenia pouco conhecida e com incidência em crescente, especialmente nos países em desenvolvimento. A patogênese das DII parece envolver uma interação entre resposta imune e o microbioma de indivíduos geneticamente propensos através de um ou mais estímulos ambientais. Existem mais de 100 trilhões de microrganismos compondo a microbiota humana e estes, são componentes importantes na patogênese das DII, através de estímulos antigênicos e de composições microbianas alteradas que promovem desequilíbrio entre flora bacteriana e resposta imune. A microbiota parece ter envolvimento na gênese das DII mas é importante ressaltar que os estudos publicados até o momento descrevem somente associação e não causalidade. Ainda é desconhecida a relação causal direta entre disbiose e a DII. Apesar das bactérias intestinais frequentemente impulsionarem a ativação imunológica, a inflamação crônica, por sua vez, molda a microbiota intestinal e contribui para a disbiose. A disbiose é definida como uma diminuição na diversidade microbiana do intestino, devido a uma mudança no equilíbrio entre microrganismos

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

Página 01 de 08



UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS

Continuação do Parecer: 4.498.687

comensais e potencialmente patogênicos. Alguns fatores corroboram o papel da flora intestinal na DII como a resposta ao uso de antibióticos, a predisposição de inflamação para regiões anatômicas com relativa estase fecal (íleo terminal e reto), a eficácia do desvio de trânsito na Doença de Crohn e o rápido aumento da incidência da DII associada à industrialização com suas alterações dietéticas e exposições ambientais. Embora existam divergências nos estudos relacionados a microbiota e DII, existe consenso no que diz respeito à diversidade microbiana (que está reduzida na DII) e o aumento ou redução de determinadas espécies bacterianas. Estudos apontam que alterações da diversidade da microbiota podem estar relacionadas ao fenótipo da Doença de Crohn e predizer maior gravidade da doença,

como a ausência de cicatrização da mucosa após o início da terapia biológica. Dentre tais alterações, foi-se observado que na DC Ileocolônica ocorre mais comumente a redução de bactérias do grupo *Clostridium leptum* (particularmente o *Faecalibacterium prausnitzii*) do que na DC primariamente colônica. Neste mesmo fenótipo de doença, Willing BP et al (2010) observaram um aumento das Proteobacterias nos controles saudáveis. Neste mesmo estudo, foi encontrado um aumento das famílias Actinobacterias (*Bifidobacteriaceae*, *Coriobacteriaceae*), Firmicutes (*Ruminococcaceae*) e Tenericutes (*Anaeroplasmataceae*) no fenótipo de DC primária do cólon. Alguns estudos apontam uma redução do grupo *Clostridium coccoides* em portadores de RCU, não encontrado na DC de cólon. Devido a complexidade do estudo e dificuldade metodológica, poucos estudos conseguiram avaliar a diversidade da microbiota intestinal e as manifestações da DC (inflamatória, estenosante ou penetrante). Em um estudo pioneiro, Goethel A et al (2019) evidenciaram que determinados tipos de população bacteriana poderiam modular a expressão do Fator de Necrose Tumoral alfa 1 (TNF-alfa) a favor da promoção de fibrose, provocando maior processo inflamatório associado à deposição de colágeno,

causando maior incidência de doença fibroestenossante.

Metodologia Proposta:

Tipo de estudo: Trata-se de um estudo observacional longitudinal. **População e período do estudo:** Serão selecionados pacientes portadores de Doença de Crohn, com indicação prévia de terapia com medicação anti-TNF, provenientes do ambulatório de Doenças inflamatórias intestinais, Professor Dr. Juvenal Ricardo Góes, da disciplina de Coloproctologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas. Os pacientes serão seguidos por um período de 12 meses. **Tamanho da amostra:** Serão selecionados todos os pacientes com Doença de Crohn que iniciarão o uso de terapia biológica com anti- TNF (Adalimumabe ou Infliximabe). A amostra será

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS

Continuação do Parecer: 4.498.687

selecionada durante o período de 12 meses. O estudo não irá interferir na escolha da terapia, tampouco no manejo clínico da doença.

Objetivo da Pesquisa:

Segundo informações do pesquisador.

Objetivo Primário:

Analisar a composição da microbiota intestinal em portadores de Doença de Crohn antes e após a introdução da terapia biológica.

Objetivo Secundário:

Identificar as possíveis diferenças da microbiota intestinal entre os fenótipos da doença de Crohn. Identificar as possíveis diferenças da microbiota intestinal nas apresentações clínicas locais (intestinais) e sistêmicas da Doença de Crohn. Verificar as possíveis alterações na microbiota intestinal após o tratamento com anti- TNF.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo informações do pesquisador.

Riscos:

O estudo é observacional, sem riscos excedentes aos pacientes participantes.

Benefícios:

Identificar associações fenotípicas da Doença de Crohn com a microbiota intestinal do paciente, assim como avaliar diferenças na resposta terapêutica. Os pacientes poderão receber os resultados obtidos de todos os exames realizados durante o estudo podendo auxiliar no manejo clínico da equipe assistente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

- Projeto de Doutorado;
- Instituição proponente: Gastrocentro;
- Pesquisador Responsável: Claudio Saddy Rodrigues Coy;
- Equipe de pesquisa: Mario José Abdalla Saad, Marcelo Imbrizzi Rabello, Daniela Oliveira Magro;
- Desenho do Projeto: Trata-se de um estudo observacional longitudinal onde serão acompanhados portadores de Doença de Crohn, com indicação prévia de terapia com medicação anti-TNF, por um período de 12 meses e, neste período, observar a evolução da doença, resposta terapêutica e correlacionar com a microbiota fecal. "Serão selecionados pacientes portadores de Doença de Crohn, com indicação prévia de terapia com medicação anti-TNF, provenientes do ambulatório de Doenças inflamatórias

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887

UF: SP **Município:** CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS

Continuação do Parecer: 4.498.687

intestinais, Professor Dr. Juvenal Ricardo Góes, da disciplina de Coloproctologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas. Os pacientes serão seguidos por um período de 12 meses. Amostras: Serão selecionados todos os pacientes com Doença de Crohn que iniciarão o uso de terapia biológica com anti-TNF (Adalimumabe ou Infliximabe). O estudo não irá interferir na escolha da terapia, tampouco no manejo clínico da doença."

O estudo propõe retenção de amostras para armazenamento em biorrepositório. Desfecho principal: Um ano de terapia com anti Fator de Necrose Tumoral. Tamanho da amostra: 50.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos obrigatórios discriminados abaixo foram adequadamente apresentados:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Informações básicas do projeto de pesquisa envolvendo seres humanos;
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) - Revisão 3 de 10/01/20121;
- Regulamento do Biorrepositório: Anexado minuta do Regulamento do Biorrepositório assinada pelo Prof. Dr. Mário José Abdala Saad;

Recomendações:

A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Conep), do Conselho Nacional de Saúde (CNS) orienta a adoção das diretrizes do Ministério da Saúde (MS) decorrentes da pandemia causada pelo Coronavírus SARS-CoV-2 (Covid-19), com o objetivo de minimizar os potenciais riscos à saúde e a integridade dos participantes de pesquisas e pesquisadores.

De acordo com carta circular da CONEP intitulada "ORIENTAÇÕES PARA CONDUÇÃO DE PESQUISAS E ATIVIDADE DOS CEP DURANTE A PANDEMIA PROVOCADA PELO CORONAVÍRUS SARS-COV-2 (COVID-19)" publicada em 09/05/2020, referente ao item II. "Orientações para Pesquisadores":

- Aconselha-se a adoção de medidas para a prevenção e gerenciamento de todas as atividades de pesquisa, garantindo-se as ações primordiais à saúde, minimizando prejuízos e potenciais riscos, além de prover cuidado e preservar a integridade e assistência dos participantes e da equipe de pesquisa.
- Em observância às dificuldades operacionais decorrentes de todas as medidas impostas pela pandemia do SARS-CoV-2 (COVID-19), é necessário zelar pelo melhor interesse do participante da pesquisa, mantendo-o informado sobre as modificações do protocolo de pesquisa que possam afetá-lo, principalmente se houver ajuste na condução do estudo, cronograma ou plano de trabalho.
- Caso sejam necessários a suspensão, interrupção ou o cancelamento da pesquisa, em

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887

UF: SP **Município:** CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

Página 04 de 08



UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS

Continuação do Parecer: 4.498.687

decorrência dos riscos imprevisíveis aos participantes da pesquisa, por causas diretas ou indiretas, caberá aos investigadores a submissão de notificação para apreciação do Sistema CEP/Conep.

- Nos casos de ensaios clínicos, é permitida, excepcionalmente, a tramitação de emendas concomitantes à implementação de modificações/alterações no protocolo de pesquisa, visando à segurança do participante da pesquisa, assim como dos demais envolvidos no contexto da pesquisa, evitando-se, ainda, quando aplicável, a interrupção no tratamento dos participantes da pesquisa. Eventualmente, na necessidade de modificar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), o pesquisador deverá proceder com o novo consentimento, o mais breve possível.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Avaliado os documentos inseridos na Plataforma Brasil em 10 janeiro 2021 e carta dos pesquisadores com as resposta ao CEP das pendências discriminadas no Parecer Consubstanciado 4493455:

Análise: Pendências atendidas.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).
- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887

UF: SP **Município:** CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS

Continuação do Parecer: 4.498.687

normal do estudo. E papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).

- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. E papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887

UF: SP **Município:** CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS

Continuação do Parecer: 4.498.687

mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, “cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento”.

- O pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento

Informações Básicas do Projeto

Outros

Folha de Rosto

Declaração de concordância

Outros

Arquivo

PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1473631.pdf

Carta_Resposta_ao_CEP_2.pdf

Folha_de_Rosto.pdf Of0632020ClaudioCoy.pdf

ID_Unicamp_ClaudioCoy.jpg

Postagem

10/01/2021 16:33:59

10/01/2021 16:31:35

30/06/2020 13:21:32 26/06/2020 13:18:04

22/05/2020 11:00:23

Autor

Marcello Imbrizi Rabello

Marcello Imbrizi Rabello
Renata Maria dos Santos Celeghini

Marcello Imbrizi Rabello

Situação

Aceito

Aceito

Aceito Aceito

Aceito

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Brochura_Projeto_Revisao_3.pdf	10/01/2021 16:33:41	Marcello Imbrizi Rabello	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Revisao_3.pdf	10/01/2021 16:30:48	Marcello Imbrizi Rabello	Aceito

Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	Carta_Pesquisador_Principal.pdf	22/06/2020 17:54:53	Marcello Imbrizi Rabello	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico /	Biorrepositorio.pdf	22/05/2020 10:57:29	Marcello Imbrizi Rabello	Aceito

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126**Bairro:** Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887**UF:** SP **Município:** CAMPINAS**Telefone:** (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

Página 07 de 08

**UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS**

Continuação do Parecer: 4.498.687

Biorrepositório / Biorrepositorio.pdf Biobanco

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

22/05/2020 10:57:29

Marcello Imbrizi Rabello

Aceito

▪

CAMPINAS, 14 de Janeiro de 2021

Assinado por:

Renata Maria dos Santos Celeghini (Coordenador(a))