



**UFRJ**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA**

**FERNANDO MARQUES MOREIRA DE CASTRO**

**O PAPEL DA MICROBIOTA DO SANGUE NA PATOGÊNESE DAS DOENÇAS  
INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS**

**RIO DE JANEIRO  
2023**

**FERNANDO MARQUES MOREIRA DE CASTRO**

**O PAPEL DA MICROBIOTA DO SANGUE NA PATOGÊNESE DAS DOENÇAS  
INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Orientadores:

Prof. Dr. Heitor Siffert Pereira de Souza

Prof. Dra. Luciana Pizzatti Barbosa

Profa. Dra. Morgana T. Lima Castelo Branco

RIO DE JANEIRO  
2023

Castro, Fernando Marques Moreira de.

O papel da microbiota do sangue na patogênese das doenças inflamatórias intestinais. / Fernando Marques Moreira de Castro. – Rio de Janeiro: UFRJ / Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, 2023.

73 f. : il.; 31 cm.

Orientadores: Heitor Siffert Pereira de Souza; Luciana Pizzatti Barbosa; Morgana T. Lima Castelo Branco.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro / Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, 2023.

Referências: f.55-67.

1. Doenças Inflamatórias Intestinais. 2. Doença de Crohn. 3. Microbioma Gastrointestinal. 4. Disbiose. 5. Clínica Médica - Tese. I. Souza, Heitor Siffert Pereira de. II. Barbosa, Luciana Pizzatti. III. Castelo Branco, Morgana T. Lima. IV. Universidade Federal do Rio de Janeiro, / Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica. V. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

FACULDADE DE MEDICINA

COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE FERNANDO MARQUES MOREIRA DE CASTRO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA DA FACULDADE DE MEDICINA DA UFRJ.**-----

-----  
Aos vinte e dois dias do mês de dezembro de 2022, às oito horas e trinta minutos, por via remota, conforme o disposto na Resoluções do CEPG nº 01/2020, 02/2020, 09/2020 e 03/2019, realizou-se a defesa de dissertação de Fernando Marques Moreira de Castro intitulada: O papel da microbiota do sangue na patogênese das doenças inflamatórias intestinais. O trabalho foi orientado pelos Professores Heitor Siffert Pereira de Souza, Luciana Pizzatti Barbosa e Morgana Castelo-Branco. A Banca Examinadora foi presidida pela Professora Márcia Gonçalves Ribeiro e composta pelos Professores Lucila Marieta Perrotta de Souza e Ana Teresa Pugas Carvalho. Iniciados os trabalhos o aluno apresentou, em trinta minutos, os objetivos, a metodologia, os resultados e as conclusões do seu trabalho de dissertação. Em seus comentários, os examinadores procederam à arguição, indicando pontos passíveis de aperfeiçoamento na dissertação. O aluno replicou, agradecendo as sugestões e esclarecendo a sua opinião sobre os itens discutidos pelos examinadores. Após a aprovação, o aluno terá prazo máximo de sessenta dias para entregar à Secretaria os exemplares da versão final, ficando determinado pela Banca que o(a) Prof(a) Lucila Marieta Perrotta de Souza será o responsável para atestar se as modificações realizadas estão de acordo com o exigido pela Banca. Em seguida a Banca Examinadora decidiu pela **APROVAÇÃO** do candidato. Cumpridas as exigências o candidato fará jus ao **Título de Mestre em Medicina, Área de Concentração: Clínica Médica (Gastroenterologia)**. A defesa remota ocorreu após consentimento do discente, dos orientadores, da Comissão Deliberativa do Programa de Pós-graduação, bem como da banca examinadora em arguir o candidato de forma remota. Encerrada a sessão, realizada por via remota, foi lavrada a presente ata, que segue assinada pelo presidente da banca examinadora em conformidade com a resoluções do CEPG, supracitadas.-----

Rio de Janeiro, 22 de dezembro de 2022.



Professora Márcia Gonçalves Ribeiro  
Presidente da Banca Examinadora

## RESUMO

As Doenças Inflamatórias Intestinais, incluindo a Doença de Crohn e a Retocolite Ulcerativa consistem de condições crônicas caracterizadas por manifestações persistentes e recidivantes de origem multifatorial. Embora os mecanismos patogênicos exatos responsáveis pelo desenvolvimento das Doenças Inflamatórias Intestinais continuem relativamente obscuros, a hipótese atual mais aceita é a de que essas doenças resultem da interação de fatores ambientais, predisposição genética, e respostas imunitárias inapropriadas. Tais interações formam uma rede patológica complexa, fazendo das Doenças Inflamatórias Intestinais um modelo conveniente e aplicável para a pesquisa de interações hospedeiro-microbioma. Mais recentemente foi demonstrado que a microbiota intestinal se encontra alterada nas Doenças Inflamatórias Intestinais, apresentando grande heterogeneidade entre os subtipos de Doenças Inflamatórias Intestinais e também entre os indivíduos. Portanto, as Doenças Inflamatórias Intestinais parecem representar o modelo mais abrangente para o entendimento do papel do microbioma em doenças inflamatórias complexas. A existência de reservatórios de microrganismos poderia oferecer uma explicação para a inflamação persistente de baixa intensidade característica das Doenças Inflamatórias Intestinais. O comprometimento da barreira intestinal, primário ou secundário à própria disbiose intestinal, pode promover o acesso de microrganismos ao sangue, resultando em *atopobiose*, o que significa o aparecimento de membros de um microbioma em locais atípicos. Tomando por base essas evidências, formulamos a hipótese da existência de microrganismos potencialmente viáveis no sangue de pacientes, que podem alterar a homeostase e desempenhar papel crucial no desenvolvimento e na progressão das Doenças Inflamatórias Intestinais.

Esta dissertação diz respeito à primeira etapa de um estudo observacional transversal para investigar a existência de microbiota no sangue de pacientes com Doenças Inflamatórias Intestinais e sua associação com a microbiota intestinal. Nesses resultados preliminares é apresentada uma análise transversal de 12 pacientes com Doença de Crohn e 8 controles normais (voluntários saudáveis), que tiveram o material coletado e os dados demográficos e clínicos registrados. A análise do microbioma dos pacientes, incluindo as amostras de sangue, foi realizada

através de técnicas moleculares baseadas no sequenciamento do gene que codifica para o RNA ribossomal 16S bacteriano, utilizando-se os protocolos e orientações estabelecidos no projeto “Microbioma Humano”. Os genes foram sequenciados através da tecnologia *Next Generation Sequencing*.

A análise identificou a presença de DNA bacteriano circulante no sangue, contemplando um total de 17 diferentes filos. Destes, 10 foram identificados em pacientes e controles, 5 apenas em pacientes e 2 apenas nos controles. Em relação aos gêneros bacterianos no sangue, a abundância e a diversidade foram semelhantes entre pacientes e controles saudáveis. Entretanto, observou-se maior quantidade de DNA bacteriano presente no sangue de pacientes do que em controles saudáveis.

Portanto, este trabalho apresenta dados inéditos na avaliação e corroboração da hipótese base de maior quantidade de DNA bacteriano circulante no sangue de pacientes com Doença de Crohn, sugerindo correlação com aumento de permeabilidade intestinal e disbiose.

**Palavras-chave:** Doença Inflamatória Intestinal; microbiota intestinal; disbiose; imunidade da mucosa; permeabilidade de mucosa; barreira epitelial intestinal; Doença de Crohn.

## ABSTRACT

Inflammatory Bowel Diseases, including Crohn's Disease and Ulcerative Colitis consist of chronic conditions characterized by persistent and recurrent clinical manifestations of multifactorial origin. Although the exact pathogenic mechanisms responsible for the development of Inflammatory Bowel Diseases remain relatively unclear, the current most accepted hypothesis is that these diseases result from the interaction of environmental factors, genetic predisposition, and inappropriate immune responses. Such interactions form a complex pathological network, making Inflammatory Bowel Diseases a convenient and applicable model for researching host-microbiome interactions. More recently, it has been shown that the intestinal microbiota is altered in Inflammatory Bowel Diseases, showing great heterogeneity between Inflammatory Bowel Diseases subtypes and also between individuals. Therefore, Inflammatory Bowel Diseases appear to represent the most comprehensive model for understanding the role of the microbiome in complex inflammatory diseases. The existence of reservoirs of microorganisms could explain the persistent low-intensity inflammation characteristic of Inflammatory Bowel Diseases. Impairment of the intestinal barrier, primary or secondary to intestinal dysbiosis itself, can promote the access of microorganisms to the blood, resulting in atropobiosis, which means the appearance of members of a microbiome in atypical locations. Based on this evidence, we hypothesized the existence of potentially viable microorganisms in the blood of patients, which may alter homeostasis and play a crucial role in the development and progression of Inflammatory Bowel Diseases.

This dissertation concerns the first stage of a cross-sectional observational study to investigate the existence of microbiota in the blood of patients with inflammatory bowel diseases and its association with the intestinal microbiota. These preliminary results present a cross-sectional analysis of 12 patients with Crohn's Disease and 8 normal controls (healthy volunteers), who had the material collected and the demographic and clinical data recorded. The analysis of the microbiome of the patients, including the blood samples, was performed using molecular techniques based on the sequencing of the gene that encodes the bacterial 16S ribosomal RNA, using the protocols and guidelines established in the "Human Microbiome" project. The genes were sequenced using Next Generation Sequencing technology.

The analysis identified the presence of bacterial circulating DNA in the blood,

covering a total of 17 different phyla. Of these, 10 were identified in patients and controls, 5 only in patients and 2 only in controls. Regarding bacterial genera in blood, abundance and diversity were similar between patients and healthy controls. However, there was a greater amount of bacterial DNA present in the blood of patients than in healthy controls.

Therefore, this work presents new data in the evaluation and corroboration of the base hypothesis of a greater amount of bacterial circulating DNA in the blood of patients with Crohn's Disease, suggesting correlation with increased intestinal permeability and dysbiosis.

**Keywords:** Inflammatory Bowel Disease; gut microbiota; dysbiosis; mucosal immunity; mucosal permeability; intestinal epithelial barrier; Crohn's Disease.



## LISTA DE ABREVIATURAS

ASM	Manual da Sociedade Americana de Microbiologia Clínica ( <i>Manual of American Society for Clinical Microbiology</i> )
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DC	Doença de Crohn
DDW	Semana da Doença Digestiva ( <i>Digestive Disease Week</i> )
DII	Doença Inflamatória Intestinal
DIIs	Doenças Inflamatórias Intestinais
ELISA	Ensaio Imunossorvente Ligado a Enzima ( <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> )
ESBL	$\beta$ -Lactamases de Espectro Estendido
HUCFF	Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IQ	Instituto de Química
LABMOPS	Laboratório de Biologia Molecular e Proteômica do Sangue
LPS	Lipopolissacarídeo
MAP	<i>Mycobacterium avium subsp paratuberculosis</i>
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente à Meticilina
MBL	Metallo-Beta-Lactamases
NF-kappaB	Fator Nuclear Kappa B
NGS	Sequenciamento de Próxima Geração ( <i>Next Generation Sequencing</i> )
NOS	Óxido Nítrico Sintase
OTU	Unidades Taxonômicas Operacionais ( <i>Operational Taxonomic Unit</i> )
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PGM	Máquina Genômica Pessoal ( <i>Personal Genome Machine</i> )
PICRUST	Investigação Filogenética de Comunidades por Reconstrução de Estados Inobservados ( <i>Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States</i> )
qPCR	Quantificação em PCR em Tempo Real
RCU	Retocolite Ulcerativa

RE	Retículo Endoplasmático
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	Ácido Ribonucleico Mensageiro
STAMP	Análise Estatística de Perfis Metagenômicos ( <i>Statistical Analysis of Metagenomic Profiles</i> )
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- $\beta$	Fator de Crescimento Tumoral Beta
TNBS	Ácido 2,4,6-Trinitrobenzeno Sulfônico
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral-Alfa
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UPR	Resposta de Proteínas Desdobradas

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	12
<b>2.1</b>	<b>Justificativa: relevância e originalidade</b> .....	12
2.1.1	Benefícios .....	13
<b>2.2</b>	<b>Fundamentação Teórica</b> .....	14
2.2.1	A patogênese das DII resulta da interação complexa de múltiplos fatores biológicos .....	14
2.2.2	Permeabilidade Intestinal Alterada nas DIIs .....	15
2.2.3	Disbiose Intestinal nas DIIs .....	16
2.2.4	Microbiota do Sangue .....	18
2.2.5	Como funciona o Sequenciamento de Próxima Geração utilizado no estudo: <i>Next Generation Sequencing</i> (NGS).....	21
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	27
<b>3.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	27
<b>3.2</b>	<b>Objetivo Secundário</b> .....	27
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	28
<b>4.1</b>	<b>Pacientes</b> .....	28
4.1.1	Critérios de Inclusão.....	28
4.1.2	Critérios de Exclusão .....	28
<b>4.2</b>	<b>Avaliação Clínica, Laboratorial e Complementar dos Pacientes</b> .....	29
<b>4.3</b>	<b>Microbiologia e Análises Moleculares do Sangue e Fezes dos Pacientes</b> .....	31
4.3.1	Microbiologia Clássica.....	32
4.3.2	Métodos Moleculares .....	32
4.3.2.1	Extração e Quantificação do DNA Metagenômico do Sangue dos Pacientes e Controles.....	33
4.3.2.2	Amplificação do Gene 16S rRNA Através da Técnica de PCR e Purificação dos Produtos da PCR.....	34
4.3.2.3	Quantificação do DNA Bacteriano .....	35
4.3.2.4	Construção da Biblioteca.....	35
4.3.2.5	Preparo do <i>Template</i> no Ion PGM e Recuperação das Esferas .....	35
4.3.2.6	Enriquecimento e Determinação da Qualidade das Esferas.....	36

4.3.2.7	Preparo do Ion Torrent PGM, do Chip e Sequenciamento .....	37
4.3.2.8	Análises das Sequências Obtidas pela Plataforma <i>Ion Torrent</i> PGM .....	38
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
<b>5.1</b>	<b>Resultados em Relação Filos, Gêneros, Vias de Sinalização e Características Fenotípicas de DC</b> .....	<b>39</b>
5.1.1	Características de Pacientes e controles incluídos .....	39
5.1.2	Resultados por Filo .....	41
5.1.3	Resultados por Gêneros .....	43
5.1.4	Resultados por Atividade de Doença .....	45
5.1.5	Resultados por Vias de Sinalização .....	46
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	<b>53</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>54</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>55</b>
	<b>ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)</b> .....	<b>68</b>
	<b>ANEXO B – Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)</b> .....	<b>70</b>
	<b>ANEXO C – Trabalho aprovado na <i>Digestive Disease Week</i> (DDW)</b> .....	<b>73</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As Doenças Inflamatórias Intestinais (DIIs), incluindo a Doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa (RCU) consistem de condições crônicas caracterizadas por manifestações persistentes e recidivantes de origem multifatorial. Embora os mecanismos patogênicos exatos responsáveis pelo desenvolvimento das DIIs continuem relativamente obscuros, a hipótese atual mais aceita é a de que essas doenças resultem da interação de fatores ambientais, predisposição genética, e respostas imunitárias inapropriadas. Tais interações formam uma rede patológica complexa, fazendo das DIIs um modelo conveniente e aplicável para a pesquisa de interações hospedeiro-microbioma. Mais recentemente foi demonstrado que a microbiota intestinal se encontra alterada nas DIIs, apresentando grande heterogeneidade entre os subtipos de DIIs e também entre os indivíduos. Portanto, as DIIs parecem representar o modelo mais abrangente para o entendimento do papel do microbioma em doenças inflamatórias complexas.

Em condições de saúde, o sangue tem sido sempre considerado como um ambiente estéril (PROAL; ALBERT; MARSHALL, 2014). Contudo, recentemente foi detectada a presença de microrganismos no sangue de doentes diabéticos do tipo II (AMAR *et al.*, 2011) e em pacientes com doenças cardiovasculares (AMAR *et al.*, 2013), sustentando a hipótese de translocação bacteriana a partir do intestino. Nas DIIs, a depuração inadequada de padrões moleculares associados com microrganismos tem sido considerada como mecanismo patogênico fundamental, especialmente na DC, onde defeitos na autofagia e na depuração de bactérias têm sido associados com polimorfismos genéticos de *NOD2* e *ATG16L1* (SOUZA; FIOCCHI, 2016). Além da disbiose observada nas DIIs, a liberação da endotoxina Lipopolissacarídeo (LPS), constituinte de bactérias Gram-negativas, desempenha papel importante na homeostase intestinal, incluindo o controle da morte celular na mucosa, que permite a translocação entre o intestino, o sangue e outros tecidos (RHEE, 2014). A existência de reservatórios de microrganismos poderia oferecer uma explicação para a inflamação persistente de baixa intensidade característica das DIIs. O comprometimento da barreira intestinal, primário ou secundário à própria disbiose intestinal, pode promover o acesso de microrganismos ao sangue, resultando em *atopobiose*, o que significa o aparecimento de membros de um microbioma em locais atípicos.

Tomando por base essas evidências, formulamos a hipótese da existência de microrganismos potencialmente viáveis no sangue de pacientes, que podem alterar a homeostase e desempenhar papel crucial no desenvolvimento e na progressão das DIIs.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Justificativa: relevância e originalidade

O epitélio intestinal é reconhecido como a maior superfície mucosa do corpo, mas os mecanismos que regulam a interação do microbioma com as células epiteliais são ainda pouco conhecidos. A esse respeito, os conhecimentos atuais sugerem que a disbiose intestinal resulta de uma relação anormal entre a microbiota e seus produtos secretórios, com a camada epitelial. Tal interação resulta em uma função alterada de barreira que pode levar a uma resposta imunitária anormal da mucosa e, em última instância, à *atopobiose*. Por exemplo, existem evidências que sugerem que o epitélio, particularmente as células M que recobrem as placas de Peyer (FUKUDA; HASE; OHNO, 2011; LELOUARD *et al.*, 2010), sensores do sistema imunitário da mucosa, constitui uma via primária para a translocação limitada de microrganismos para a circulação sanguínea (JUNG; HUGOT; BARREAU, 2010). Em vista dessas interações com células da mucosa tem sido proposto que uma microbiota intestinal disbiótica possa também influenciar na imunidade da mucosa (SATO; KIYONO; FUJIHASHI, 2015). De fato, tem sido atribuído à disbiose intestinal o surgimento de doenças inflamatórias crônicas, incluindo as DIIs (KOSTIC; XAVIER; GEVERS, 2014; MA *et al.*, 2015; OWYANG; WU, 2014). Além disso, uma microbiota intestinal anormal tem sido implicada no desencadeamento de autoimunidade, provavelmente constituindo fator epigenético crítico em doenças autoimunes (CATRINA; DEANE; SCHER, 2016; TANEJA, 2014). Acrescente-se a isso, o fato de dados recentes sugerirem que fatores microbianos são capazes de influenciar a função de linfócitos T regulatórios do intestino, e que a disbiose pode afetar as funções indutora e supressora dessas células, determinando alterações na imunidade da mucosa (KINOSHITA; TAKEDA, 2014).

Com este estudo, investigamos mais as influências da microbiota na patogênese das DIIs e seu potencial de aplicação em medicina translacional. De uma forma geral, esta proposta oferece uma análise integrativa do microbioma baseada na hipótese de *atopobiose* e do conceito chave de dormência ou hibernação microbiana. Além disso, estamos apresentando aqui a ideia de que uma microbiota dormente do sangue possa contribuir com as alterações mais precoces no desenvolvimento e na progressão das DIIs, potencialmente servindo como

biomarcadores para a identificação de fenótipos específicos e, possivelmente, trazendo uma nova visão sobre intervenções terapêuticas orientadas com base no microbioma. Acreditamos que a exploração de um microbioma dormente do sangue por métodos baseados em sequenciamento para a detecção de microrganismos não proliferantes, seguida de estudos de metagenômica, possa abrir novas perspectivas com relação aos mecanismos pelos quais a microbiota deve contribuir para a resposta imunitária, assim como para o desenvolvimento das DII.

Confirmando que o intestino deve representar a maior fonte de uma microbiota dormente do sangue, esperávamos estabelecer uma relação com o número e a natureza dos microrganismos do sangue, e sequências e antígenos microbianos que poderiam ser detectados em diferentes amostras da mesma coorte. Subsequentemente, em estudos futuros, será fundamentalmente importante determinar o estado fisiológico dos vários microrganismos. Presumindo que microrganismos, inflamação e diversas síndromes estejam frequentemente sobrepostos, estudos longitudinais serão cruciais para revelar a dinâmica das interações, e possivelmente para discriminar causa e efeito através da evolução das DII. A imunogenicidade dos microrganismos dormentes e seu potencial para induzir inflamação é provavelmente diferente daquela dos microrganismos replicantes, e isso também precisará ser investigado. Finalmente, esperamos que todas essas potenciais novas informações nos permitam desenvolver melhores tratamentos para pacientes com DII, com enfoque na microbiota.

### 2.1.1 Benefícios

O método proposto neste estudo se baseou na investigação e caracterização da microbiota do sangue e das fezes. Este envolveu a separação de uma amostra de fezes e de uma coleta de sangue de veia periférica, seguidas de análise laboratorial. Do ponto de vista da segurança do paciente, nenhuma intervenção adicional foi feita. Assim sendo, não houve nenhum tipo de risco adicional aos indivíduos estudados.

O desenho do estudo previu a investigação inédita da existência de uma microbiota dormente no sangue dos pacientes com DII. Como existem grandes lacunas no conhecimento a respeito da patogenia das DII, o reconhecimento de uma microbiota no sangue dos pacientes poderá constituir informação valiosa para a



confirmação de alteração da permeabilidade intestinal, da presença de translocação microbiana a partir do intestino e, possivelmente, de um novo mecanismo fomentador da resposta imunitária anormal subjacente ao processo inflamatório crônico. Pretendeu-se também investigar se um determinado padrão filogenético ou quantitativo de microrganismos possa estar associado com a intensidade e a gravidade das doenças de interesse, de forma não-invasiva, rápida, de baixo custo e praticamente sem riscos ao paciente.

Em comparação com outros métodos, a coleta de sangue e de fezes foi considerada não-invasiva, não exigiu cirurgias, internação hospitalar, aplicação de sedativos ou outras substâncias, não exigiu preparo especial, não demandou a aplicação de contrastes, nem expôs o paciente à radiação ionizante; com relação aos marcadores séricos conhecidos, o método proposto teve a possibilidade de acrescentar em termos de especificidade e sensibilidade, mas também pôde trazer subsídios para a compreensão de mecanismos patogênicos.

## **2.2 Fundamentação Teórica**

### **2.2.1 A patogênese das DII resulta da interação complexa de múltiplos fatores biológicos**

A complexidade das DIIs, incluindo a DC e a RCU não se restringe à variedade e gravidade das manifestações clínicas, mas estende-se até os mecanismos patogênicos subjacentes. A distribuição universal das DII, o papel determinante de fatores genéticos, a descoberta de alguns mecanismos celulares e moleculares envolvidos na inflamação, e a influência da microbiota entérica e da disbiose na resposta imunitária, têm contribuído para consolidar a hipótese de que as DIIs resultam de uma complexa interação de fatores ambientais, genéticos, imunitários e não-imunitários (BAUMGART; CARDING, 2007; SOUZA; FIOCCHI, 2016). Evidências recentes sugerem que interações envolvendo fatores imunitários e não-imunitários (ou de origem não-linfoide) constituam componentes intrínsecos da patogênese das DIIs (CHO, 2008; XAVIER; PODOLSKY, 2007). Dentre os fatores primariamente não-imunitários envolvidos nos processos inflamatórios intestinais merecem destaque a permeabilidade intestinal e a disbiose.

### 2.2.2 Permeabilidade Intestinal Alterada nas DIIs

Vários fatores controlam e podem aumentar a permeabilidade intestinal, sendo considerados como os principais, os processos inflamatórios, fatores neuroimunes, predisposição genética, e a própria microbiota residente. Por exemplo, foi demonstrado que microrganismos podem induzir à alteração da expressão e localização das junções oclusivas, modificar a permeabilidade através da ação de peptídeos, toxinas e metabólitos, e também modular a função de barreira epitelial por meio de substratos bacterianos tais como ácidos graxos de cadeia curta, acetato e butirato (CAMILLERI *et al.*, 2012). Por outro lado, respostas imunitárias contra microrganismos presentes no intestino podem resultar em inflamação, e consequentemente em aumento da permeabilidade e da absorção de conteúdos luminiais (SHARMA; ZIMMERMANN-MEINZINGEN; JOHANSON, 2010). De uma maneira geral, tanto as respostas da imunidade inata quanto da adaptativa poderão causar impacto sobre a permeabilidade intestinal, principalmente através da liberação de citocinas inflamatórias.

Na DC e na RCU os fatores responsáveis pela disfunção de barreira e aumento da permeabilidade intestinal são similares, incluindo a morte de células epiteliais, micro e macroulcerações, aumento na absorção de antígenos pelas vias paracelular e transcelular, e anormalidades nas junções celulares (SCHMITZ *et al.*, 1999; ZEISSIG *et al.*, 2007). Além disso, uma variedade de elementos associados com inflamação contribui para o desencadeamento e manutenção da disfunção de barreira e a elevada permeabilidade, incluindo metabólitos do estresse oxidativo, neutrófilos, e citocinas tais como o interferon-gama (IFN $\gamma$ ), o TNF-alfa, a IL-1 beta, IL-8, e IL-13. Em conjunto, todos esses fatores e eventos celulares e moleculares, levam a um aumento na captação de antígenos derivados de alimentos e da microbiota presente na luz intestinal, estimulando e exacerbando a resposta imunitária, e criando um ciclo vicioso onde a disfunção de barreira é o princípio perpetuador da inflamação crônica das DIIs (JOHN; FROMM; SCHULZKE, 2011). A resposta inflamatória é perpetuada não apenas localmente, mas também do ponto de vista sistêmico, conforme demonstrado pelo elevado número de linfócitos ativado circulantes em pacientes com DC (YACYSHYN; MEDDINGS, 1995).

Vale notar que eventos patogênicos secundários a uma barreira intestinal anormal e o consequente aumento da permeabilidade, podem ser encontrados em

diversas condições intestinais e não-intestinais (CATALIOTO; MAGGI; GIULIANI, 2011), mas seu papel potencial na DC parece adquirir uma dimensão maior. Resultados de estudo fundamental mostraram que o aumento de permeabilidade intestinal nos pacientes acometidos pela DC, também ocorre em uma proporção de seus parentes de primeiro grau saudáveis (HOLLANDER; VADHEIM; BRETTHOLZ; PETERSEN *et al.*, 1986). Uma permeabilidade aumentada na ausência de doença, contribui para a hipótese de que a permeabilidade anormal poderia representar um fator etiológico primário, possivelmente até precedendo as manifestações clínicas de doença (MAY; SUTHERLAND; MEDDINGS, 1993; PEETERS *et al.*, 1997; THJODLEIFSSON *et al.*, 2003). Essas questões permanecem sem resposta e necessitam de novos estudos para melhor esclarecimento.

Outra questão interessante do ponto de vista clínico é se alterações na permeabilidade intestinal poderiam constituir fator preditivo de recidivas. Em estudo com pacientes com DC em remissão, uma correlação significativa foi encontrada entre o nível de permeabilidade e a probabilidade de recaída, sugerindo que o aumento da permeabilidade talvez preceda as manifestações clínicas e que ela poderia representar um bom indicador de doença subclínica (WYATT *et al.*, 1993). Essa observação foi subsequentemente confirmada, e algumas outras evidências apontaram para alterações de permeabilidade também em recaídas de pacientes com RCU (MIELE *et al.*, 2007). Tomadas em conjunto, essas observações sustentam a ideia de alteração da permeabilidade intestinal como um componente crucial e dos mais primitivos na patogênese das DIIs e, em particular, da DC.

### 2.2.3 Disbiose Intestinal nas DIIs

Anormalidades da microbiota intestinal têm sido identificadas em diversas condições intestinais comuns, tais como diarreia idiopática crônica, síndrome do intestino irritável e DIIs (QUIGLEY, 2011; SHANAHAN, 2007; SWIDSINSKI *et al.*, 2008). Entretanto, o impacto da microbiota intestinal na patogênese de doenças parece ir além das doenças gastrointestinais, influenciando também em doenças mediadas imunologicamente, incluindo diabetes tipo I, doenças cardiovasculares, desmielinização autoimune, entre outras (BERER *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2011; WEN *et al.*, 2008).

Alterações quantitativas e qualitativas na composição da microbiota intestinal

têm sido detectadas em pacientes com DC e RCU, reforçando a hipótese de disbiose como um mecanismo relevante na patogênese das DIIs (CHASSAING; DARFEUILLE-MICHAUD, 2011). Na DC, em particular, a composição alterada da microbiota aponta geralmente para uma redução da diversidade microbiana (HANSEN *et al.*, 2012), mas também um aumento de *Bacteroidetes* e *Proteobacteria* juntamente com uma diminuição na abundância de *Firmicutes* (MAN; KAAKOUSH; MITCHELL, 2011). Em uma grande coorte pediátrica de pacientes com DC de início recente, um aumento na abundância de *Enterobacteriaceae*, *Pasteurellaceae*, *Veillonellaceae*, e *Fusobacteriaceae* e uma diminuição de *Erysipelotrichales*, *Bacteroidales*, e *Clostridiales* foram correlacionados de forma consistente com a gravidade da doença (GEVERS *et al.*, 2014). Alterações na composição microbiana na DC foram corroboradas recentemente em revisão sistemática confirmando o aumento relativo na abundância de *Bacteroidetes* em contraste com a diminuição de *Firmicutes*. Em particular, verificou-se que a abundância relativa de *Enterobacteriaceae* estava aumentada, enquanto que a de *Faecalibacterium prausnitzii* estava diminuída, incluindo em pacientes com recorrência pós-operatória (WRIGHT *et al.*, 2015). Anormalidades na microbiota intestinal também têm sido detectadas em pacientes com RCU, embora de forma menos marcante do que na DC (ANDOH *et al.*, 2011). À semelhança do que se observa para a DC, uma diversidade menor também tem sido encontrada em amostras de fezes de pacientes com RCU, sendo a maior atividade da doença associada com o aumento de *C. perfringens* (LI *et al.*, 2016), ou com a diminuição de *Fusicatenibacter saccharivorans* (TAKESHITA *et al.*, 2016).

A questão de se a disbiose representa um fenômeno primário ou secundário nas DIIs continua não respondida. Existem evidências mostrando que a microbiota intestinal pode ser moldada de acordo com o genótipo do hospedeiro (RAUSCH *et al.*, 2011; REHMAN *et al.*, 2011), mas também por conta de fatores dietéticos, hábitos, história de infecções, uso de antibióticos e outros medicamentos, e pela presença de inflamação (FRANK *et al.*, 2007; REHMAN *et al.*, 2016; ROUND; MAZMANIAN, 2009; WANG *et al.*, 2014). Por outro lado, é importante chamar a atenção para o fato de que a disbiose isoladamente não seria suficiente para induzir DII. De fato, os vários defeitos na resposta inflamatória contra microrganismos (MARKS *et al.*, 2006; SMITH *et al.*, 2009), sugerem que uma depuração inadequada de padrões moleculares associadas com patógenos possa constituir importante

mecanismo patogênico nas DIIs (SEWELL; MARKS; SEGAL, 2009). Tal fato parece particularmente importante na DC, tendo em vista a associação já bem estabelecida da doença com polimorfismos genéticos de *NOD2* e *ATG16L1*, por exemplo, que resultam em defeito na autofagia e depuração microbiana prejudicada (COONEY *et al.*, 2010; FRITZ *et al.*, 2011; SALEM *et al.*, 2015). Acredita-se que outra associação mecanística importante na inflamação intestinal ocorra por conta de sobrecarga na capacidade de dobramento de proteínas no lúmen do Retículo Endoplasmático (RE) (estresse do RE), resultando em um mecanismo adaptativo de ativação de vias intracelulares de transdução de sinal, conhecidas como Resposta de Proteínas Desdobradas (UPR). Além da relação com a autofagia, o estresse do RE tem sido associado com inflamação intestinal e DIIs com base em estudos que revelaram a existência de alterações genéticas primárias envolvendo *XBP1*, *ARG2*, *ORMDL3*, e outros componentes da UPR (HOSOMI; KASER; BLUMBERG, 2015; KASER; MARTINEZ-NAVES; BLUMBERG, 2010). Outro exemplo do reconhecimento e controle inadequados de microrganismos, com implicações na patogênese da DC, está na expressão reduzida de peptídeos antimicrobianos produzidos pelas células de Paneth em pacientes com mutações do *NOD2* (WEHKAMP *et al.*, 2005).

Defeitos individuais ou combinados envolvendo vários genes tais como *NOD2*, *ATG16L1* e *IRGM* devem resultar em reconhecimento inadequado de microrganismos presentes na luz intestinal (BILLMANN-BORN *et al.*, 2011) com conseqüente comprometimento da indução da autofagia, ativação de vias alternativas, e modulação da imunidade adaptativa (SHAW *et al.*, 2011). Além disso, interações entre polimorfismos de nucleotídeo único de *ATGL1* e *IRGM* também foram demonstradas na DC (HOEFKENS *et al.*, 2013), indicando provável integração de defeitos da autofagia, da disfunção mitocondrial e da apoptose. O conhecimento acumulado nos últimos anos no campo das DIIs tem contribuído para revelar a existência de múltiplas vias sobrepostas e redundantes com participação em sua patogênese. Vale ressaltar que esse conjunto de informações está em consonância com as recentes mudanças epidemiológicas e reforçam a participação da disbiose na patogênese das DIIs (SAIDEL-ODES; ODES, 2014).

#### 2.2.4 Microbiota do Sangue

Infecções têm sido propostas como fatores desencadeantes de uma série de doenças tais como o exemplo da infecção pelo *H. pylori* determinando a doença ulcerosa péptica e o câncer (MARSHALL; WARREN, 1984). Evidências para a participação de componentes microbianos em diversas outras condições não transmissíveis e primariamente não infecciosas têm sido relatadas ao longo dos anos, mas a associação exata entre agentes infecciosos específicos e o aparecimento de doenças crônicas permanece discutível. Entretanto, tem havido relatos de anormalidades persistentes na imunidade relacionada a tecidos ou órgãos, surgidas a partir de infecções agudas isoladas, como no período de resolução da infecção por *Yersinia pseudotuberculosis* (LE BAUT *et al.*, 2018).

Em camundongos, sinais derivados da microbiota residente induzem alterações persistentes nas funções imunitárias da mucosa, incluindo mecanismos de tolerância e de defesa (FONSECA *et al.*, 2015). De fato, em circunstâncias semelhantes, a capacidade de identificar microrganismos relevantes em culturas, raramente tem sido bem-sucedida, até recentemente. Contudo, a aparente incapacidade de identificar e crescer microrganismos em culturas também é compatível com um estado peculiar de dormência ou hibernação (EPSTEIN, 2013; KAPRELYANTS; KELL, 1993). Em uma condição como essa, embora a célula ou o microrganismo vivo, não seja presentemente cultivável, sua viabilidade de fato não está comprometida de forma irreversível, e o mesmo poderia ser ressuscitado mediante a exposição a determinados estímulos.

Em condições normais de saúde o sangue é considerado um ambiente estéril do organismo (PROAL; ALBERT; MARSHALL, 2014). Todavia, o antigo paradigma de um sangue completamente livre de microrganismos tem sido questionado recentemente. De fato, a presença de um microbioma bacteriano no sangue tem sido associado com diversas doenças infecciosas e não-infecciosas (HUANG *et al.*, 2006; KIBRU *et al.*, 2012; PRAJSNAR *et al.*, 2012; SATO *et al.*, 2014; THWAITES; GANT, 2011; WANG; LI *et al.*, 2012). Por exemplo, uma microbiota aberrante detectada no sangue, por sequenciamento genético, foi implicada no diabetes do tipo II (AMAR *et al.*, 2011), e a alta taxa de bactérias intestinais na circulação dos pacientes sustenta a hipótese de translocação a partir do intestino, de uma microbiota disbiótica (SATO *et al.*, 2014). Em doenças cardiovasculares também há evidências indicativas da existência de um microbioma anormal no sangue (AMAR *et al.*, 2013). Além disso, doença periodontal e gengivite têm sido intimamente

associadas com o desenvolvimento de doença cardiovascular (RAMIREZ *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2013), e a translocação bacteriana para o sangue tem sido apontada como indutora de endocardite bacteriana, além de infarto do miocárdio e cerebral (AMAR; ENGELKE, 2015; KOREN *et al.*, 2010; SERINGEC *et al.*, 2015).

Nas DIIs, a depuração inadequada de padrões moleculares associados a patógenos tem sido considerada como mecanismo crucial na patogênese das doenças, em especial da DC, onde a associação com polimorfismos do *NOD2* e do *ATG16L1* induzem defeitos na autofagia e na depuração bacteriana (SOUZA; FIOCCHI, 2016). Por exemplo, componentes da parede bacteriana, tais como LPS de cepas Gram-negativas, constituem poderosos agentes inflamatórios capazes de modular respostas inflamatórias e imunitárias (GLAROS *et al.*, 2013; RONCO, 2014). No contexto das DIIs, além da disbiose, caracterizada por uma diversidade reduzida e pela presença de comunidades microbianas menos estáveis de diferentes grupos microbianos (PASCAL *et al.*, 2017; PEDAMALLU *et al.*, 2016), a liberação de LPS também desempenha papel crucial na regulação da homeostase intestinal, incluindo o controle de processos de morte celular que permitem a translocação bacteriana entre o intestino, o sangue e outros tecidos (RHEE, 2014). Portanto, a produção e o reabastecimento contínuos de LPS a partir de reservatórios microbianos dormentes poderia constituir uma explicação para o estado de inflamação persistente de baixo grau, característico das DIIs.

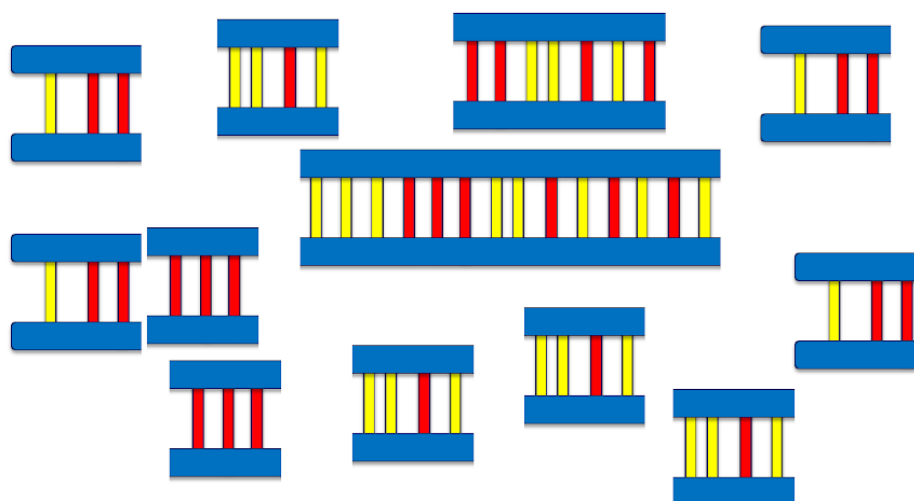
A disbiose intestinal tem sido apontada como responsável por afetar a função de barreira do epitélio intestinal, portanto proporcionando um acesso de microrganismos luminiais para dentro do corpo, podendo resultar em *atopobiose*, o fenômeno do aparecimento de microrganismos da microbiota intestinal (ou de outra origem) em locais inusitados, incluindo o sangue. Com base nessas evidências, levantamos aqui a hipótese da existência de uma microbiota no sangue composta de microrganismos potencialmente viáveis (mas possivelmente não proliferantes e não cultiváveis), capaz de perturbar a homeostase e desempenhar papel fundamental no desenvolvimento e na progressão das DIIs. Portanto, este estudo destinou-se a testar a seguinte hipótese central: a microbiota do sangue reflete a permeabilidade intestinal e a disbiose presentes em pacientes com DIIs, sendo provavelmente inexistente em pacientes sem DIIs ou em indivíduos saudáveis. A microbiota do sangue possivelmente será mais exuberante em pacientes com doença extensa e em atividade clínica, podendo constituir indicador precoce de recidivas em pacientes

com doença em remissão clínica, e talvez também explicação para manifestações sistêmicas e extraintestinais.

### 2.2.5 Como funciona o Sequenciamento de Próxima Geração utilizado no estudo: *Next Generation Sequencing* (NGS)

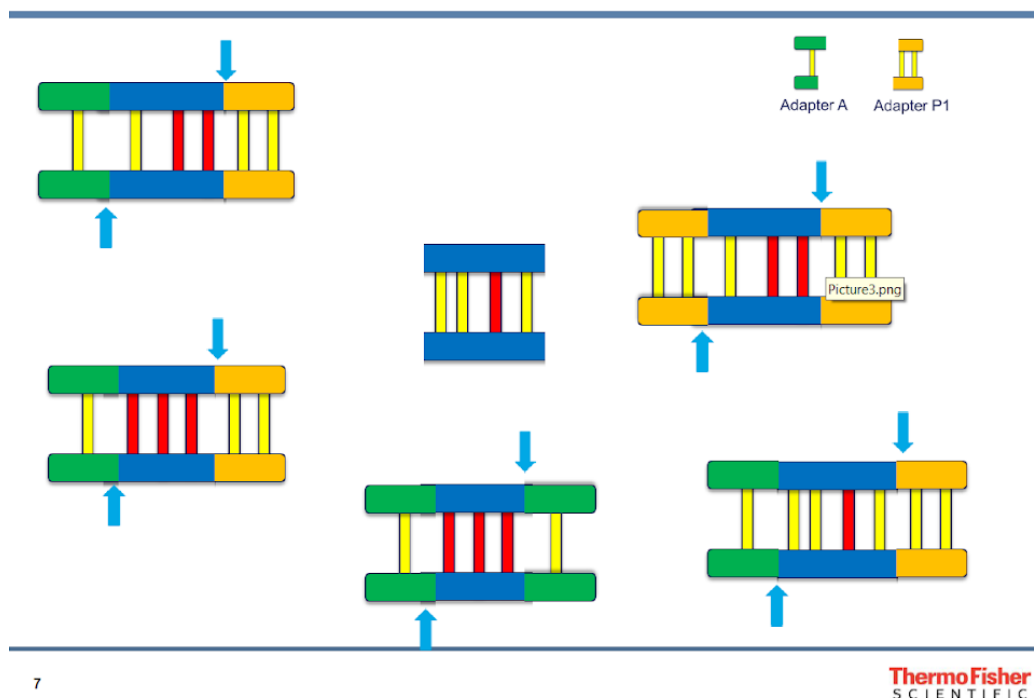
Apesar de cada tecnologia de sequenciamento possuir estratégias diferentes, todas apresentam etapas comuns, como: preparo de amostras, amplificação de biblioteca e sequenciamento. Na etapa do preparo das amostras todo o DNA é fragmentado aleatoriamente por um processo químico, mecânico ou enzimático e, cada um desses fragmentos é chamado de *template*. Logo após essa fragmentação, sequências artificiais previamente conhecidas, chamadas de adaptadores, são incorporadas ao *template*. Assim torna-se possível a combinação de diferentes amostras em uma mesma reação de sequenciamento através do uso de adaptadores, com uma parte composta por 5 a 10 bases, diferentes umas das outras como mostra a figura 1.

Figura 1 – Fragmentação de DNA e Incorporação dos Adaptadores  
Fragmentação do DNA





## Ligação dos adaptadores – Nick Repair



Fonte: adaptado de Thermo Fisher Scientific (2018)

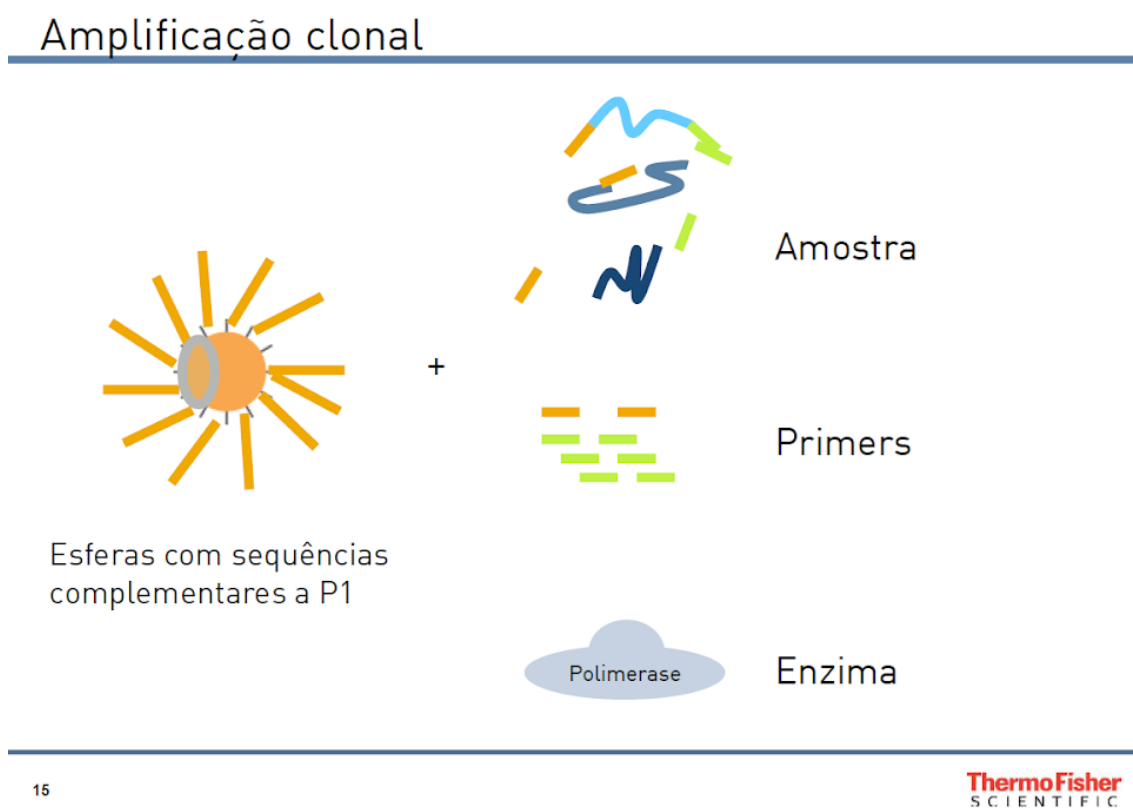
Uma vez incorporados os adaptadores, as amostras são misturadas e partem para o processo de amplificação de biblioteca.

A etapa de amplificação de biblioteca objetiva gerar um espaço físico contendo milhares de cópias de cada fragmento de DNA produzido na etapa de preparo de amostras. A amplificação aumenta a fonte de sinal luminoso para a maioria dos sequenciadores e, aumenta também o sinal iônico para o caso do sequenciador *Ion Torrent*. Esses sinais serão detectados na etapa de sequenciamento.

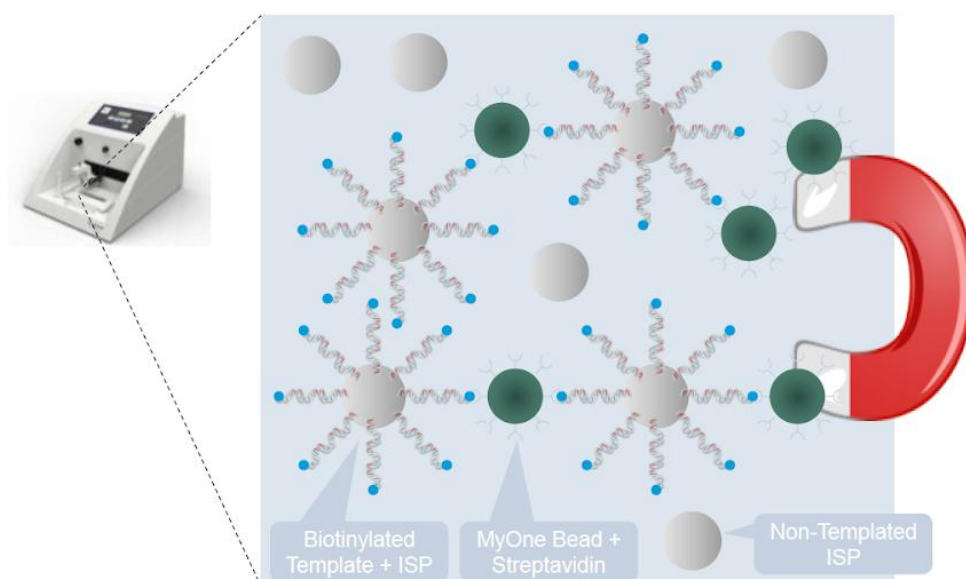
O primeiro processo de amplificação foi a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de emulsão onde são criados milhões de microrreatores em emulsão à óleo. É nesses reatores que estão contidos todos os reagentes necessários para uma reação de PCR, bem como pequenas esferas também conhecidas como *beads* magnéticas ou *IonSpheres* que, por sua vez, estão cobertas com sequências complementares às dos adaptadores que servem como primers para a reação de PCR. No final desse processo de amplificação de biblioteca as *beads* devem estar com um único fragmento incorporado a ela. Porém, outros cenários podem ocorrer como, por exemplo: a existência de *beads* policlonais (onde múltiplos fragmentos

foram incorporados à uma única esfera); *empty beads* (onde nenhum fragmento foi incorporado à uma esfera); *multiple beads* (onde mais de uma esfera está presente no microrreator). Todos os casos são contornáveis para que haja o menor número de policlonalidade possível e cada *bead* apresente somente um fragmento incorporado a ela como mostra a figura 2. Após a amplificação da biblioteca, segue-se para a próxima etapa que é o sequenciamento.

Figura 2 – Amplificação da Biblioteca e Enriquecimento das *Beads*



## Enriquecimento da Emulsão



18

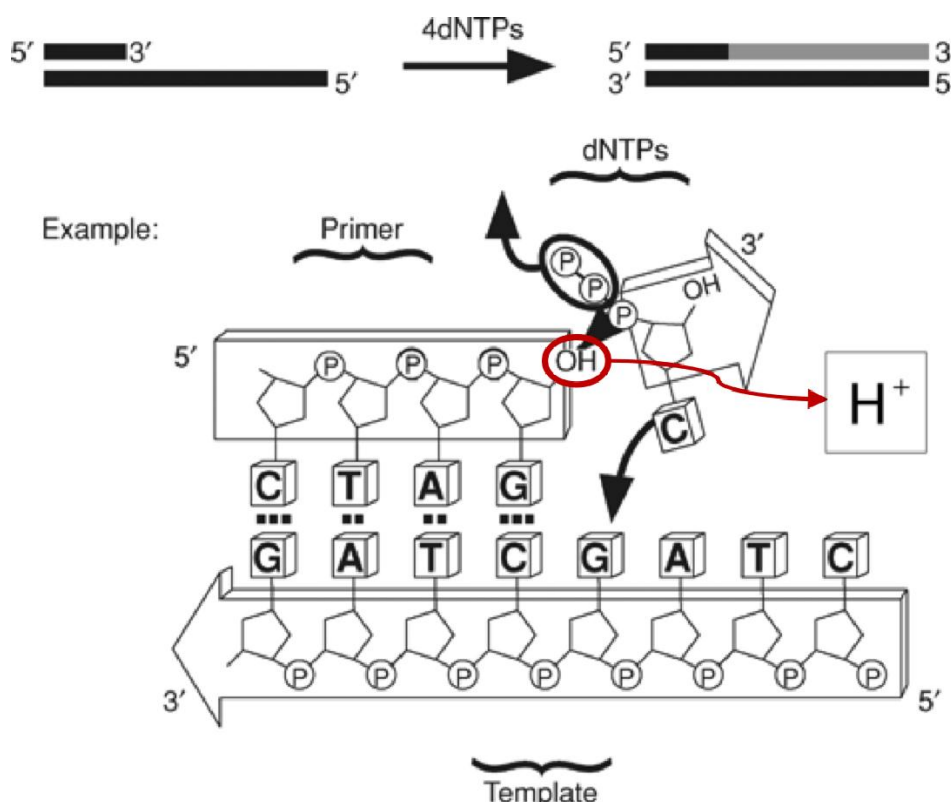
**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC

Fonte: adaptado de Thermo Fisher Scientific (2018)

O instrumento de sequenciamento executa uma série de reações químicas que geram sinais que, uma vez detectados, determinam a sequência de bases que estão sendo analisadas. Neste trabalho, o sequenciador utilizado foi o *Ion Torrent Personal Genome Machine* (PGM) acoplado ao *Ion Touch* da Thermo Fisher.

Diferente dos demais sequenciadores, o Ion PGM faz a detecção das bases diretamente uma vez que a reação de polimerização gera naturalmente um próton ( $H^{+3}$ ) que altera o pH do meio. Sendo assim, essa alteração é detectada e convertida em um sinal elétrico como mostra a figura 3.

Figura 3 – Reação de Incorporação de uma Base pela Polimerase



Fonte: adaptado de Thermo Fisher Scientific (2018)

O equipamento Ion PGM utiliza chips de silício que contém milhões de poços microscópicos, somente um pouco maiores do que as esferas contendo os fragmentos de DNA, o que garante que cada poço tenha apenas uma esfera. O chip também conta com a presença de transistores que fazem a detecção da mudança de pH. É através desta mudança de pH que o equipamento é capaz de fazer a detecção do sinal que irá indicar a sequência de bases (ROTHBERG *et al.*, 2011).

Diante de todo o exposto, é notório, portanto, que o número de aplicações do sequenciamento de nova geração é ilimitado. Ainda assim, existe um grupo de aplicações que continua sendo mais utilizado pela comunidade científica. São elas: ressequenciamento genômico que objetiva descobrir diferenças entre o genoma de referência e o genoma de interesse; *Target sequencing* onde a amostra é tratada para selecionar apenas as regiões de interesse; RNA Seq que faz uso do sequenciamento de nova geração para sequenciar cDNA visando capturar a informação do transcriptoma de um organismo; sequenciamento de novo que é utilizado quando não se tem um genoma de referência; e, por fim, metagenômica.

A metagenômica, descrita pela primeira vez por Jo Handelsman e colaboradores da Universidade de Wisconsin, EUA (HANDELSMAN *et al.*, 1998), é o estudo do material genético extraído diretamente do ambiente. Em grego a palavra *meta* significa transcendente, ou seja, essa abordagem vai além das análises genômicas. Ela, atualmente, é usada para caracterização de um conjunto de genomas microbianos e, devido a diversidade de microrganismos presentes no ambiente a ser estudado, torna-se impossível o sequenciamento individual dos mesmos. Sendo assim, faz-se notória a importância do estudo da metagenômica que contorna a necessidade de cultivo das bactérias em laboratório e é conduzida em larga escala devido a vasta diversidade microbiana (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005).

Dentre as técnicas abordadas na metagenômica, duas delas se destacam:

1) A primeira é baseada no sequenciamento do alvo gene que codifica para o Ácido Ribonucleico (RNA) ribossomal 16S que é um componente de pequena subunidade dos ribossomos procarióticos e, portanto, pode ser considerada uma técnica direcionada e focalizada (YERGEAU *et al.*, 2014). Neste tipo de estudo a sequência 16S amplificada por PCR é comparada à um banco de dados de bactérias conhecidas. Com isso, é possível avaliar a diversidade de bactérias presentes na amostra.

2) A segunda, *Shotgun Metagenomics*, onde todo o DNA extraído da amostra é fragmentado e sequenciado sem que haja nenhuma seleção prévia do alvo. A análise consiste em montar o “metagenoma” da amostra para tentar identificar, além da diversidade de genomas, novos genes.

Neste estudo, como nosso alvo era a análise do microbioma dormente presente no sangue dos pacientes com DC, foi utilizada a abordagem de sequenciamento 16S.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Investigar a existência de uma microbiota no sangue dos pacientes com DC, baseada na presença de DNA bacteriano circulante.

#### **3.2 Objetivo Secundário**

Investigar se a presença de uma microbiota no sangue dos pacientes com DC, baseada na presença de DNA bacteriano circulante, é um achado com potencial atuação como marcador inflamatório.

## 4 METODOLOGIA

- **Desenho do Estudo:**

Estudo observacional transversal para investigar a existência de microbiota no sangue de pacientes com DIIs e sua associação com a microbiota intestinal.

### 4.1 Pacientes

#### 4.1.1 Critérios de Inclusão

Foram selecionados pacientes com DII maiores de 18 anos, acompanhados regularmente no ambulatório do Serviço de Gastroenterologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF), com padrões fenotípicos distintos (padrão inflamatório, estenosante e penetrantes nos casos de DC e padrões de localizações distintos nos casos com retocolite), e controles saudáveis, maiores de 18 anos, dentre acompanhantes, familiares, ou membros da equipe de apoio ou tratamento, que tenham assinado o termo de consentimento informado para participação no estudo. O grupo controle foi pareado para idade e sexo com os grupos de DIIs.

#### 4.1.2 Critérios de Exclusão

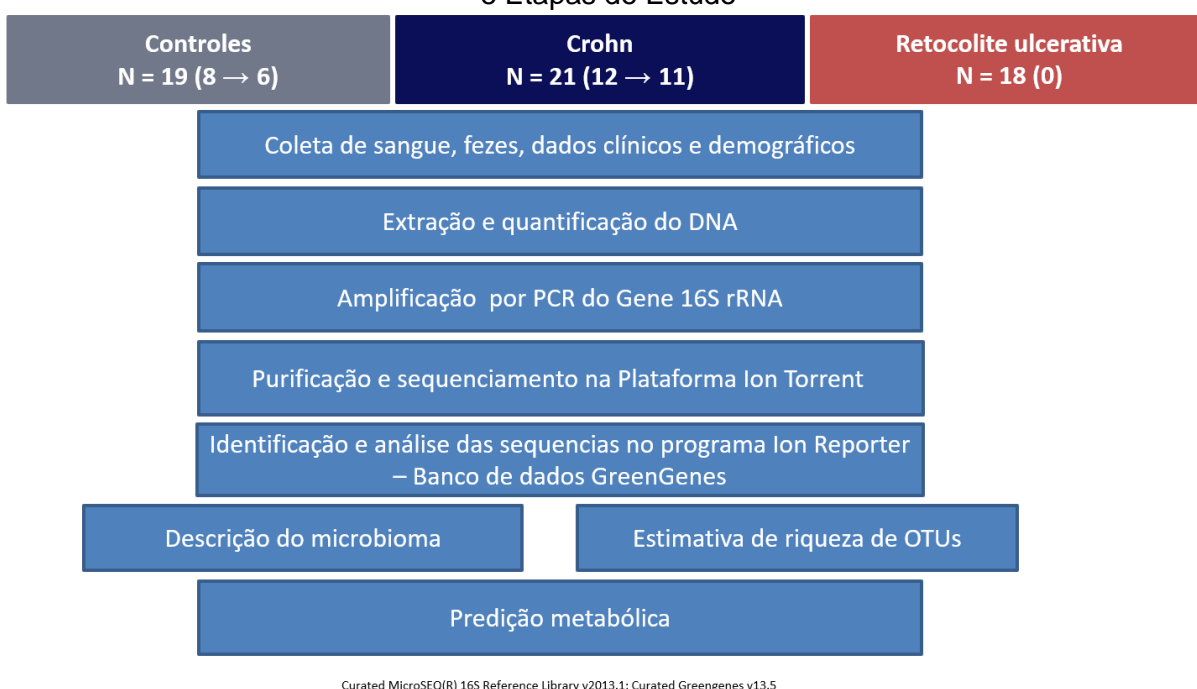
Foram excluídos os pacientes com DIIs que não puderam fornecer o material previsto no projeto, e aqueles submetidos previamente a colectomia total. Além disso, foram excluídos também pacientes com mais de 80 anos, com diagnóstico de câncer de qualquer origem, gestantes, lactantes, e pacientes em tratamento de insuficiência orgânica grave (renal, hepática ou cardíaca), ou uso de antibióticos nos últimos 3 meses antes da seleção para o estudo.

Originalmente, nosso banco de dados contou com amostras de sangue e fezes de 19 controles saudáveis, 21 pacientes com DC e 18 pacientes com RCU. Contudo, devido a inúmeras limitações secundárias à pandemia pelo Sars-Cov-2, abrangendo desde dificuldades de entrega de materiais e insumos, à falta de acesso aos materiais para manutenção dos equipamentos de sequenciamento e, finalmente,

à limitação temporal para finalização da presente tese. A estimativa atual é que o término das leituras pendentes ocorrerá no primeiro semestre de 2023.

Numa primeira etapa, objeto desta tese, foram avaliadas amostras de sangue de 12 pacientes com DC e 8 controles saudáveis. Dentre os pacientes e controles avaliados houve uma falha de leitura no grupo dos pacientes e duas no grupo dos controles.

Figura 4 – Algoritmo com Banco de Dados Global, Incluídos e Falhas de Leitura desta Tese e Etapas do Estudo



Fonte: elaborado pelo autor

## 4.2 Avaliação Clínica, Laboratorial e Complementar dos Pacientes

Foram selecionados pacientes acompanhados regularmente no ambulatório de Doenças Intestinais do HUCFF da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), com padrões fenotípicos distintos das DIIs (conforme a Classificação de Montreal – figuras 5 e 6), sendo coletada amostra de sangue e de fezes para análise quantitativa e qualitativa da microbiota através de métodos de biologia molecular. Os dados obtidos para a microbiota dos diferentes sítios foram analisados comparativamente, e frente aos resultados de avaliação clínica, laboratorial, endoscópica e histopatológica, realizados rotineiramente no acompanhamento dos pacientes.



Figura 5 – Classificação Montreal para Doença de Crohn

Idade	< 17 anos (A1)	entre 17 e 40 anos (A2)	> 40 anos (A3)	
Localização	ileal (L1)	colônica (L2)	ileocolônica (L3)	trato digestivo superior (L4)
Comportamento	não-estenosante, não-penetrante (B1)	estenosante (B2)	penetrante (B3)	perianal (B4)

Fonte: adaptado de J. bras. gastroenterol. (2009, p. 109)

Figura 6 – Classificação Montreal para RCU

S0 - remissão clínica	Sem sintomas
S1 - colite ulcerativa leve	Diarreia com até 4 evacuações/dia, com ou sem sangue, ausência de sintomas sistêmicos, exames sanguíneos normais
S2 - colite ulcerativa moderada	Diarreia com mais de 4 evacuações/dia, com mínimos sintomas sistêmicos
S3 - colite ulcerativa grave	Diarreia com mais de 6 evacuações/dia, com sangue, pulso acima de 90 bat/min, temperatura acima de 37,5°C, hemoglobina abaixo de 10,5g/100mL, e VHS acima de 30mm/h

Fonte: adaptado de J. bras. gastroenterol. (2009, p. 109)

O acompanhamento clínico e os procedimentos endoscópicos foram realizados no Serviço de Gastroenterologia, enquanto exames de sangue foram realizados no Laboratório Central, os métodos de imagem no Serviço de Radiologia, e o diagnóstico histopatológico, no Serviço de Patologia, todos no HUCFF da UFRJ.

Todos os dados clínicos e demográficos foram registrados, juntamente com resultados de exames laboratoriais executados no Serviço de Gastroenterologia quando clinicamente indicados independentemente da pesquisa em curso, tais como proteína C-reativa e calprotectina fecal. Das amostras de sangue previstas no estudo, uma fração foi centrifugada para a separação de plasma, que foi congelado a -80°C para preservação do material genético presente. As amostras de fezes serão alvo de análise na já citada complementação do estudo.

Os diagnósticos de DC foram estabelecidos com base nos critérios convencionais clínicos, radiológicos, endoscópicos e histopatológicos (NIKOLAUS; SCHREIBER, 2007). Além da avaliação clínica rotineira, a intensidade ou gravidade da doença foi classificada de acordo com os índices de *Harvey-Bradshaw* – figura 7 (HARVEY; BRADSHAW, 1980). Foram registrados resultados de exames complementares recentes obtidos dos prontuários, para comparação e análise de sub-grupos. O comportamento clínico dos pacientes com DII foi avaliado através do sistema de classificação de Montreal (SATSANGI *et al.*, 2006). Dados clínicos e

demográficos, e informações sobre o tratamento corrente dos pacientes com DIIs, foram registrados.

Figura 7 – Índice de *Harvey-Bradshaw* para Avaliação de Atividade Clínica da DC

Variável	Descrição	Escore
1	BEM ESTAR GERAL	0 = muito bom 1 = bom 2 = ruim 3 = muito ruim 4 = péssimo
2	DOR ABDOMINAL	0 = nenhum 1 = leve 2 = moderado 3 = severo
3	Nº EVACUAÇÕES LÍQUIDAS / DIA	1 = por nº evacuação
4	MASSA ABDOMINAL	0 = nenhuma 1 = duvidosa 2 = bem definida 3 = bem definida e dolorosa
5	COMPLICAÇÕES	1 ponto por item • artralgia • uveíte • eritema nodoso • úlcera aftóides • pioderma gangrenoso • fissura anal • fistula anal • abscesso

Remissão: ≤4 pontos  
Resposta: ≤3 pontos

Fonte: elaborado pelo autor

Uma parte do sangue coletado destinou-se a estudos de biologia molecular, no Laboratório de Biologia Molecular e Proteômica do Sangue (LABMOPS). Para tal, foi realizada inicialmente a extração de RNA total do sangue utilizando um *kit* comercial. O material biológico obtido foi inicialmente processado no HUCFF da UFRJ e posteriormente levado ao LABMOPS do Instituto de Química (IQ) da UFRJ, para a realização das técnicas de análise previstas. O transporte do material do HUCFF para o LABMOPS foi realizado, utilizando recursos próprios, mediante a contratação de empresa especializada do ramo, para guarda e conservação do material em temperatura apropriada e todos os cuidados necessários com relação à segurança do serviço

#### 4.3 Microbiologia e Análises Moleculares do Sangue e Fezes dos Pacientes

Os pacientes selecionados para o estudo foram submetidos, à entrada, a coleta de 2 hemoculturas em veias periféricas diferentes, além de 5 ml de sangue em um recipiente de coleta com EDTA, e de amostra de fezes em coletor específico (*FecalSwab* eNAT, Copan *Diagnostics, Inc. USA*), para posterior realização de

análises de Biologia Molecular.

No Laboratório Central do HUCFF da UFRJ foram realizadas as fases iniciais de cultura e isolamento de microrganismos. As amostras de sangue destinadas à realização das análises moleculares foram enviadas imediatamente para o Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa da UFRJ, onde foram aliquotadas e congeladas para posterior análise. As amostras foram transportadas em recipiente térmico adequado para o transporte de amostras biológicas.

#### 4.3.1 Microbiologia Clássica

Dois pares de hemoculturas para bactérias foram coletadas para posterior incubação em sistema automatizado *Bact Alert*® USA e, uma vez detectado crescimento bacteriano em até 7 dias, procedeu-se à identificação bacteriana e foram realizados testes de suscetibilidade aos antimicrobianos utilizando cartões para identificação de Gram-negativos e Gram-positivos no sistema automatizado VITEK®. Caso houvesse a suspeição de crescimento de microrganismos resistentes, a metodologia previu a realização de testes adicionais a fim de identificar as espécies, seguindo as recomendações do *Manual of American Society for Clinical Microbiology* (ASM), além de testes fenotípicos e genotípicos complementares para a caracterização da resistência aos antimicrobianos. Dentre os testes, poderiam ser incluídos, a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), a detecção da produção de  $\beta$ -Lactamases de Espectro Estendido (ESBL), a detecção da produção de Metallo-Beta-Lactamases (MBL), a detecção de *Staphylococcus Aureus* Resistente à Meticilina (MRSA), testes fenotípicos para identificação de fungos, e a detecção molecular de outros genes de resistência aos antimicrobianos.

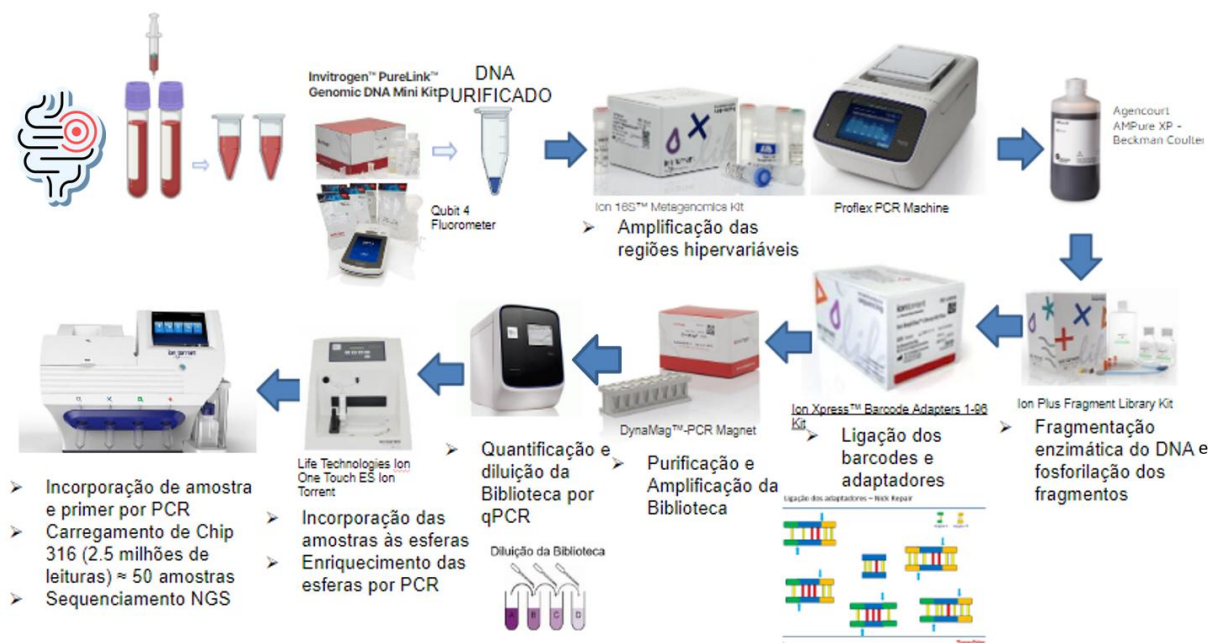
#### 4.3.2 Métodos Moleculares

A análise do microbioma dos pacientes, incluindo as amostras de sangue e fezes, foi realizada através de técnicas moleculares baseadas no sequenciamento do gene que codifica para o RNA ribossomal 16S bacteriano, utilizando-se os protocolos e orientações estabelecidos no projeto “Microbioma Humano” (<https://hmpdacc.org/>) (CREASY *et al.*, 2021). Inicialmente, o DNA foi extraído por

meio da utilização de *kits* específicos para as amostras, sendo, em seguida, armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Posteriormente, os genes foram sequenciados através da tecnologia NGS.

Figura 8 – Workflow do Sequenciamento 16S rRNA por NGS



Fonte: elaborado pelo autor

#### 4.3.2.1 Extração e Quantificação do DNA Metagenômico do Sangue dos Pacientes e Controles

Para a realização da extração de DNA foi utilizado um protocolo adaptado baseado no protocolo “Purelink *Genomic DNA Kits*” (*Invitrogen, Life Technologies, EUA*), com adição de tampão de lisozima para a extração também do microbioma dormente do sangue.

Como tampão de digestão, foi utilizado o tampão de Lisozima (*Lisozyme Digestion Buffer*) na concentração de 42.2 mg/ml. Foram adicionados 180  $\mu\text{l}$  de tampão de Lisozima (*Lisozyme Digestion Buffer*) aos 200  $\mu\text{l}$  de sangue de cada amostra. Para homogeneização as amostras foram vortexadas, seguindo para incubação a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos.

Após incubação foram adicionados 20 µl de RNase A nas amostras e as mesmas foram vortexadas e incubadas por 2 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, foram acrescentados 20 µl de Proteinase K e para homogeneização as amostras foram vortexadas. Foram acrescentados 200 µl de tampão de lise (*Purelink Genomics Lysing Binding Buffer*) às amostras, sendo depois vortexadas e seguindo para incubação a 55°C por 30 minutos. Finda a incubação, foram acrescentados 200 µl de etanol às amostras, seguindo para homogeneização em vortex.

As amostras foram aplicadas em colunas contidas no *kit* e centrifugadas a 10.000 g por 1 minuto para que o DNA de interesse ficasse preso nas colunas. Em seguida, foram acrescentados 500 µl de tampão de lavagem 1 seguido de centrifugação de 10.000 g por mais 1 minuto e, posteriormente foram acrescentados 500 µl de tampão de lavagem 2, seguido de centrifugação a 10.000 g por 3 minutos. Essas lavagens garantem que restos celulares se desliguem da coluna, ficando ligado a ela somente o DNA de interesse.

Para a eluição do DNA as colunas foram colocadas em tubos Eppendorff LoBind de 1,5 ml. Foram acrescentados nas colunas 50 µl de tampão de eluição (*Purelink Genomic Elution Buffer*, EUA), seguido de incubação de 5 minutos e centrifugação a 13.000 g por mais 5 minutos. Esse processo foi repetido por 3 vezes para obtenção do DNA de interesse. Para a maior concentração das amostras as mesmas foram secas no equipamento *Savant DNA 20 Speed Vac Concentrator* e ressuspensas em 20 µl de água nuclease free (Thermo Fisher, EUA) e desses 20 µl, 2 µl foram retirados para a quantificação no fluorômetro Qubit 3.0 (*Invitrogen, Life Technologies*, EUA) utilizando o *Kit Qubit dsDNA HS Assay Kit, 500 assays* (*Invitrogen, Life Technologies*, EUA).

#### 4.3.2.2 Amplificação do Gene 16S rRNA Através da Técnica de PCR e Purificação dos Produtos da PCR

Foi utilizado o *Kit Ion 16S Metagenomics Kit*, para a amplificação por PCR das regiões V2-4-8 e V3-6, 7-9 do DNA bacteriano 16S. Foram utilizados cerca de 250 ng de cada amostra e 3 ng de *E. coli* como controle positivo. Os produtos da PCR foram purificados em estante magnética (DynaMag, EUA) com *beads* Agentcourt

AMpure XP e o DNA bacteriano contido nas *beads* foi eluído com água nucleasse *free* e colocado em tubo Eppendorff LoBind de 1,5 ml.

#### 4.3.2.3 Quantificação do DNA Bacteriano

Foram utilizados 2 µl de amostra para a quantificação do DNA bacteriano utilizando o fluorômetro Qubit 3.0 (Invitrogen, *Life Technologies*, EUA) e o *kit* Qubit HS DNA, EUA. Após a quantificação, as amostras apresentaram entre 2,5–8,8 ng/µl.

#### 4.3.2.4 Construção da Biblioteca

Foram usados 2 *kits* para a construção da biblioteca: *Ion Plus Fragment Library Kit* e *Ion Xpress Barcode Adapters*. Primeiramente os fragmentos de DNA são fosforilados pela enzima “*end repair*” contida no *kit* para que, posteriormente, ocorra a ligação dos adaptadores e *barcodes* em uma etapa chamada “*nick repair*”. Depois disso, os fragmentos foram purificados com Agentcourt AMPure XP em estante magnética DynaMag, EUA. Para a eluição das amostras, foram usados 20 µl de *Low TE* e o sobrenadante foi transferido para um tubo de PCR de 0,2 ml. Como o *input* inicial de DNA era sabidamente pouco e, por essa razão, foi feita amplificação do material por PCR no equipamento Proflex (Thermo Fisher, EUA) antes da determinação da concentração da biblioteca. Posteriormente, os produtos de PCR foram purificados com Agentcourt e depois foi feita a Quantificação em PCR em Tempo Real (qPCR) no equipamento Quantstudio 12K (Thermo Fisher, EUA) utilizando o *kit Ion Universal Library Quantitation Kit*, EUA. Para a quantificação em qPCR foram feitas duas diluições da biblioteca (1:1000 e 1:10000) devido à sua alta concentração. Entretanto, foi utilizada a diluição de 1:1000 já que as duplicatas da diluição de 1:10000 estavam muito díspares.

Todos os *kits* e reagentes são da Thermo Fisher Scientific, EUA.

#### 4.3.2.5 Preparo do *Template* no Ion PGM e Recuperação das Esferas

Para o preparo do *template* foram utilizados 3 *kits*: *Ion PGM HiQ View OT2 Reagentes*; *Ion PGM HiQ View OT2 Solutions* e *Ion OGM HiQ View OT2 Supplies*,

EUA. Para o preparo do *template* foi feita a diluição da biblioteca previamente quantificada por qPCR para a concentração final de 100 pm estabelecida pelo protocolo. Após essa diluição, foi preparado um *pool* concentrado de 10 µl de cada uma das bibliotecas e o mesmo foi preservado a 4°C para aguardar a inicialização do equipamento. Após a inicialização do equipamento foi feita uma solução de amplificação onde aconteceu a amplificação por emulsão dentro de esferas utilizando o *kit Ion PGM HiQ View OT2 Reagentes*, EUA. Para o preparo desta solução de amplificação, foram usados 6,5 µl do *pool* de biblioteca diluída a 100 pm. Findo o preparo da solução contendo todos os reagentes discriminados no protocolo mais 6,5 µl do *pool* de biblioteca diluída, foram aplicados 1000 µl da solução de amplificação + 1700 µl de *Ion One Touch Reaction Oil*, EUA em um filtro que foi inserido no equipamento *Ion One Touch*, complementar ao *Ion PGM*, onde as esferas foram preenchidas com amostras. Nesta etapa, a reação se dá *overnight* e as amostras precisam ser removidas do equipamento em até 16h após o início da corrida.

Finda a corrida, foram obtidas esferas preenchidas e esferas vazias e foi feita a recuperação apenas das esferas preenchidas através de centrifugação da solução pós corrida, lavagem com 500 µl de *Ion One Touch Wash Solution*, EUA, centrifugação a 15.500 g por 3 minutos, descarte do sobrenadante deixando apenas 100 µl acima do pellet no tubo.

#### 4.3.2.6 Enriquecimento e Determinação da Qualidade das Esferas

Foi utilizado o *kit Ion PGM Enrichment Beads* para o enriquecimento das esferas. Primeiro foi preparada a solução de *Melt off* contendo *Teewn Solution* e NaOH 1M em um tubo Eppendorff LoBind de 1,5 ml, depois foram preparadas as *beads MyOne Streptavidin C1* e pipetadas em uma tira com 8 poços, do poço 1 ao 8 respectivamente, os seguintes reagentes: 1) Toda a solução contendo os 100 µl das esferas positivas, ou seja, recuperadas de amostra, 2) 130 µl das *beads MyOne Streptavidin C1*, 3) 300 µl de *Ion Touch Was Solution* 4) 300 µl de *Ion Touch Was Solution* 5) 300 µl de *Ion Touch Was Solution* 6) poço vazio 7) 300 µl de Solução de *Melt off* e 8) Poço vazio. Para o preparo do equipamento *Ion One Touch ES*, complementar ao *Ion PGM*, foi adicionado em um tubo de 0,2 ml de PCR 10 µl de *Neutralization Solution* presente no *kit*. A tira e o tubo de PCR com a solução de

neutralização foram inseridos no equipamento e, após 35 minutos aproximadamente, o tubo de PCR continha a amostra enriquecida. Deste tubo foram retirados 2 µl para a determinação da qualidade das esferas no fluorômetro Qubit 3.0 (Invitrogen, Life Technologies, EUA) utilizando o *kit* Ion Sphere Assay. Foi feita a leitura em dois comprimentos de onda: AF488 e AF647. Depois disso, a amostra foi armazenada a 4°C até a próxima etapa.

#### 4.3.2.7 Preparo do Ion Torrent PGM, do Chip e Sequenciamento

Foram utilizados os *kits Ion PGM HiQ View Sequencing Reagents* e *Ion PGM HiQ View Sequencing Kit*. Foi feita a limpeza do equipamento e de seus acessórios com água e cloro diluído e filtrado em filtro de 0,22 µm. Após a limpeza, o equipamento foi preenchido com os devidos reagentes (dNTP, NaOH diluído em água *nuclease free*, *Wash Solution* e *Sequencing Solution*). Para o carregamento do chip foram pipetados diretamente no volume total de amostras 5 µl de *Control Ion Sphere Particles*, 12 µl de *primer*, avolumando para 27 µl com *Annealing Buffer*. Em seguida, o tubo foi levado ao termociclador Proflex (Thermo Fisher, EUA) a 95°C por 2 minutos e, em seguida, 37°C por 2 minutos. Após esse procedimento as amostras foram mantidas dentro do termociclador em temperatura ambiente até que a corrida de sequenciamento fosse preparada.

No menu do equipamento *Ion PGM* o chip a ser utilizado na corrida foi checado para averiguar possível vazamento em uma etapa chamada "*Chip Check*".

Para a ligação da polimerase nas esferas, a amostra foi removida do termociclador e foram adicionados 3 µl de *Ion PGM HiQ View Sequencing Polymerase* para um volume final de 30 µl seguido de incubação de 5 minutos em temperatura ambiente.

Depois da verificação do chip o mesmo foi centrifugado em mini centrífuga (*Heraeus Megafuge Thermo Scientific*, EUA) para que fosse removido o excesso de líquido que ainda pudesse estar remanescente e para ser preenchido adequadamente com o volume de amostra. Idealmente, amostras de média e alta complexidade necessitam de 50.000 leituras cada, portanto, utilizamos o Chip 316 com capacidade para 50 amostras com 50.000 leituras cada, o que totaliza, 2.5 milhões de leituras. Como as amostras utilizadas foram *amplicons* de aproximadamente 400 pb, a química utilizada para o sequenciamento 16S foi a de



400 pb que, com a ligação de adaptadores e *barcodes* gera *amplicons* de 480 pb no máximo.

A corrida foi programada e o chip com as amostras foi inserido no equipamento para o sequenciamento.

#### 4.3.2.8 Análises das Sequências Obtidas pela Plataforma *Ion Torrent* PGM

Após a obtenção e purificação do produto da PCR, foi realizado o sequenciamento de nova geração na plataforma *Ion PGM Torrent* da empresa Thermo Fisher no LABMOPS do Laboratório de desenvolvimento tecnológico do IQ da UFRJ.

As sequências geradas em arquivo *IonXpress\_029\_rawlib.basecaller.bam* pelo software *Ion Reporter* versão 5.12 foram analisadas contra os bancos de dados *Curated MicroSEQ® 16S Reference Library* versão 2013.1 e *Curated Greengenes* versão 13.5.

As análises das sequências foram realizadas de acordo com o *workflow Metagenomics 16S w1.1*, onde os parâmetros são: *primers* estão presentes nas duas extremidades de cada fragmento; a porcentagem mínima de cobertura de alinhamento de cada sequência é de 90%; o número de leitura necessário é de 10 leituras de cada fragmento para que seja considerado válido e, o valor da porcentagem válida para criar uma identidade para o gênero identificado é de 97%.

As análises de bioinformática das sequências foram realizadas com as bases de dados dos programas *Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States* (PICRUST) (<https://picrust.github.io/picrust/>) e *Statistical Analysis of Metagenomic Profiles* (STAMP) (<https://beikolab.cs.dal.ca/software/STAMP>) (PARKS *et al.* 2014).

## **5 RESULTADOS**

Nosso banco de dados original conta com amostra de sangue e fezes de 19 controles saudáveis, 21 pacientes com DC e 18 pacientes com RCU.

Os resultados aqui apresentados configuram uma avaliação inicial de parte dos pacientes incluídos no estudo; até o presente momento, foi realizada a avaliação da composição taxonômica em amostras de sangue de um total de oito (N = 08) pacientes controle e doze (N = 12) casos de pacientes com DC.

Ao observarmos os resultados preliminares, é importante ressaltar a inesperada presença de microrganismos da microbiota do sangue de indivíduos saudáveis. Além disso, convém novamente destacar que estes resultados são preliminares de uma amostragem maior que cursou com pareamento fecal e amostragem de pacientes com RCU.

### **5.1 Resultados em Relação Filos, Gêneros, Vias de Sinalização e Características Fenotípicas de DC**

#### **5.1.1 Características de Pacientes e controles incluídos**

No presente momento foram analisados dados de 12 pacientes com DC e 8 controles saudáveis. As características etárias e fenotípicas dos pacientes constam na tabela 1. A tabela 2 apresenta as características etárias dos controles.

Tabela 1 – características etárias, fenotípicas, terapêuticas e de estágio inflamatório de doença dos pacientes analisados. A despeito da inclusão de 12 pacientes, houve falha no sequenciamento de um deles o que justifica a presença de apenas 11 análises

TABELA DE CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES							
Paciente	Idade	Atividade endoscópica	Localização	Comportamento	Cirurgia	Manifestação Extraintestinal	Tratamento com antiTNF
DCPC11	18	Sim	L3	B3	Sim	Não	Sim
DCPC12	51	Não	L3	B2	Sim	Não	Sim
DCPC3	61	Sim	L2	B3	Não	Sim	Sim
DCPC2	59	Não	L1	B2	Não	Sim	Não
DCPC8	24	Sim	L2	B3	Não	Não	Sim
DCPC5	33	Não	L3	B2	Não	Não	Sim
DCPC9	21	Sim	L3	B1	Não	Não	Sim
DCPC1	56	Sim	L1	B3	Sim	Sim	Sim
DCPC13	25	Sim	L3	B1	Não	Sim	Sim
DCPC7	52	Não	L2	B1	Não	Não	Não
DCPC10	28	Sim	L1	B1	Não	Não	Sim

Fonte: elaborado pelo autor

Tabela 2 – características etárias dos controles saudáveis. A despeito da inclusão de 8 controles, houve falha no sequenciamento de dois deles o que justifica a presença de apenas 6 análises

TABELA DE CONTROLES	
Controles	Idades
DCCT5	56
DCCT4	32
DCCT2	54
DCCT6	30
DCCT7	20
DCCT8	19

Fonte: elaborado pelo autor

Todos os pacientes e controles saudáveis foram submetidos à coleta de 04 frascos de hemocultura (dois para germes aeróbios e dois para germes anaeróbios) no mesmo momento da coleta da amostra para sequenciamento. Nenhum deste

apresentou positividade na análise convencional de crescimento microbiano em meios de cultura.

### 5.1.2 Resultados por Filo

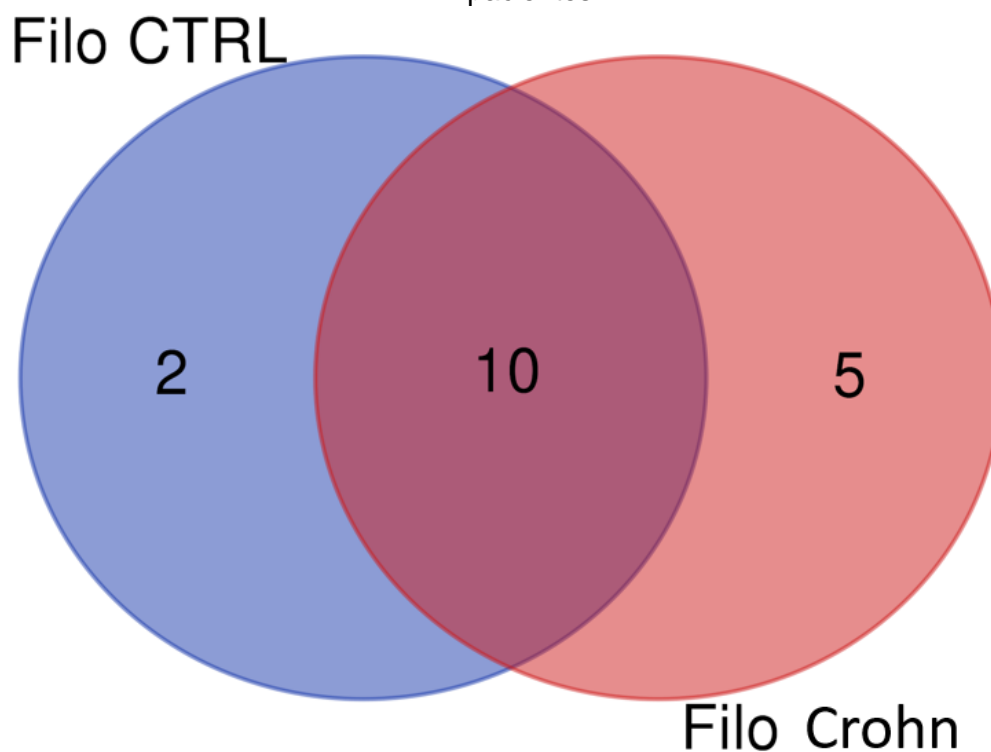
Nossa análise identificou a presença de DNA bacteriano circulante no sangue contemplando um total de 17 diferentes filios. Destes 10 foram identificados em pacientes e controle, 5 apenas em pacientes e 2 apenas nos controles (tabela 3 e figura 9).

Tabela 3 – Representatividade de Todos os Filos Descritos nos Pacientes com DC e nos Controles (CTRL) Saudáveis

TABELA COM FILOS IDENTIFICADOS ENTRE CONTROLES (CTRL) E PACIENTES COM CROHN			
	Total	Filos	Gênero
<b>Filos CTRL &amp; Crohn</b>	<b>10</b>	Cyanobacteria	
		Tenericutes	
		Acidobacteria	
		Fusobacteria	
		Bacteroidetes	
		Actinobacteria	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Propionibacterium (classe <i>Actinomycetia</i>; ordem <i>Propionibacteriales</i>)</li> <li>• Actinomyces (classe <i>Actinomycetia</i>; ordem <i>Actinomycetales</i>)</li> </ul>
		Proteobacteria	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neisseria (classe <i>Betaproteobacteria</i>; ordem <i>Neisseriales</i>)</li> <li>• Pseudomonas (classe <i>Gammaproteobacteria</i>; ordem <i>Pseudomonadales</i>)</li> </ul>
		Firmicutes	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Staphylococcus (classe <i>Bacilli</i>; ordem <i>Bacillales</i>)</li> <li>• Anaerococcus (classe <i>Clostridia</i>; ordem <i>Clostridiales</i>)</li> <li>• Streptococcus (classe <i>Bacilli</i>; ordem <i>Lactobacillales</i>)</li> <li>• Abiotrophia (classe <i>Bacilli</i>; ordem <i>Lactobacillales</i>)</li> </ul>
		Chloroflexi	
		Deinococcus-Thermus	
<b>Filos CTRL</b>	<b>2</b>	Gemmatimonadetes	
		Chlamydiae	
<b>Filos Crohn</b>	<b>5</b>	Nitrospirae	
		Nitrospinae	
		Planctomycetes	
		Lentisphaerae	
		Verrucomicrobia	

Fonte: elaborado pelo autor

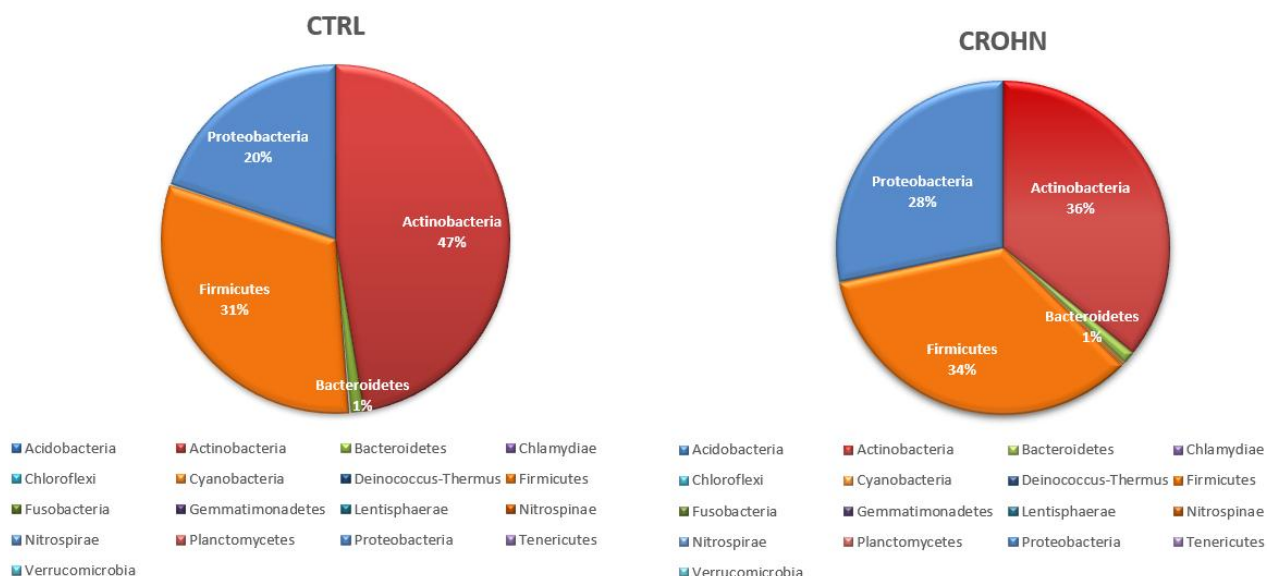
Figura 9 – diagrama de Venn qualitativo analisado com os filios presentes em controles e em pacientes



Fonte: elaborado pelo autor

Importante destacar ainda que, diferentemente do descrito em alguns trabalhos da literatura, não houve um aumento de *Bacteroidetes* e *Proteobacteria* juntamente com uma diminuição na abundância de *Firmicutes* (MAN; KAAKOUSH; MITCHELL, 2011). Este achado está melhor ilustrado visualmente na figura 10 que contempla os principais filios identificados (levados em consideração apenas os filios representativos de mais de 1% em cada grupo).

Figura 10 – Análise Percentual dos Filos mais Prevalentes na Análise do Sangue de Pacientes com Crohn e Controles Saudáveis

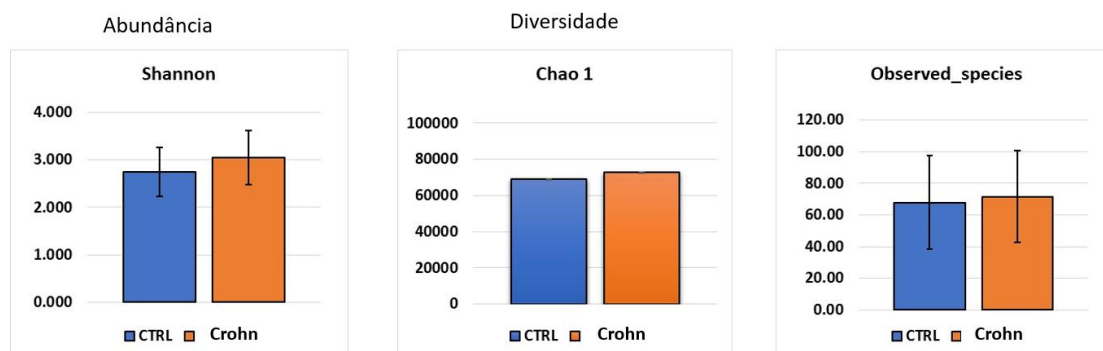


Fonte: elaborado pelo autor

### 5.1.3 Resultados por Gêneros

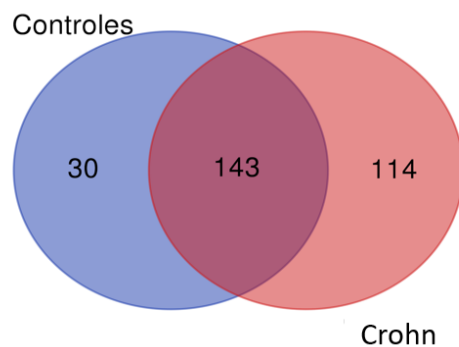
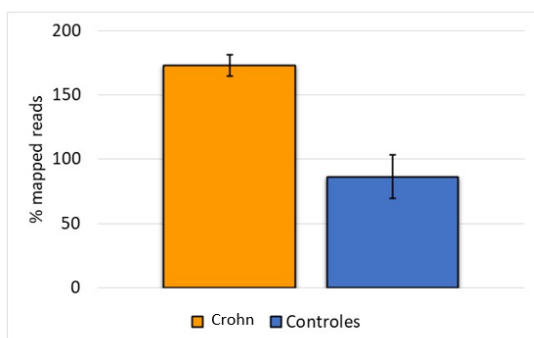
No que tange a análise de DNA circulante representativo de gêneros bacterianos no sangue convém destacar que a abundância e a diversidade foram semelhantes entre pacientes e controles saudáveis. Entretanto, impõe-se a observação de maior quantidade de DNA bacteriano presente no sangue de pacientes do que dos controles saudáveis (figuras 11 a 14).

Figura 11 – a Alpha diversidade descreve a diversidade taxonômica (espécie, gênero, família, etc.) dentro de uma única amostra. A Beta diversidade descreve a diversidade taxonômica (espécie, gênero, família, etc.) entre múltiplas amostras. Os dados mostram que a abundância e diversidade de espécies identificadas dentro de cada grupo (controles e DC) é semelhante. Assim como as espécies observadas entre os grupos



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 12 – a) denota a porcentagem de leituras mapeadas em pacientes e controles saudáveis. Estes dados corroboram que a quantidade de bactérias nas amostras de pacientes foi superior à das amostras de controles saudáveis; b) diagrama de Venn com avaliação qualitativa entre os gêneros entre pacientes, controles e que são coincidentes em ambos os grupos

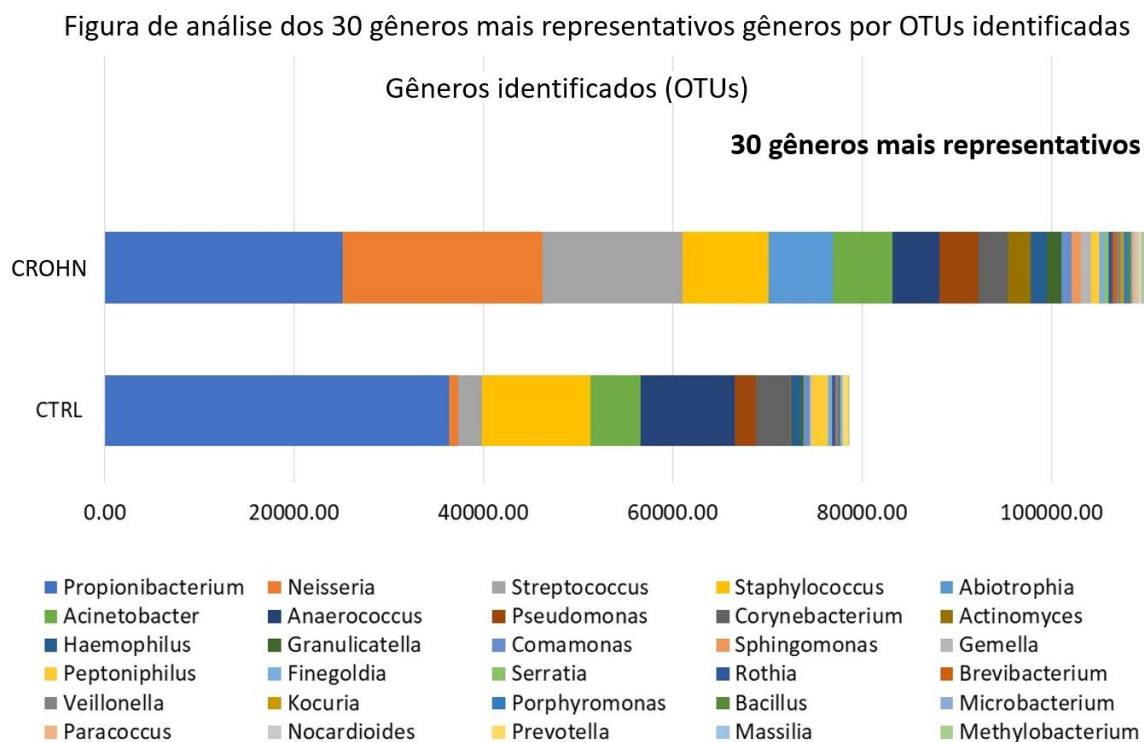


Fonte: elaborado pelo autor





Figura 14 – nesta análise, para melhorar a possibilidade de avaliação dos gêneros mais prevalentes, foi arbitrada a inclusão apenas dos 30 gêneros mais representativos. Tal mensuração manteve a consideração de OTUs



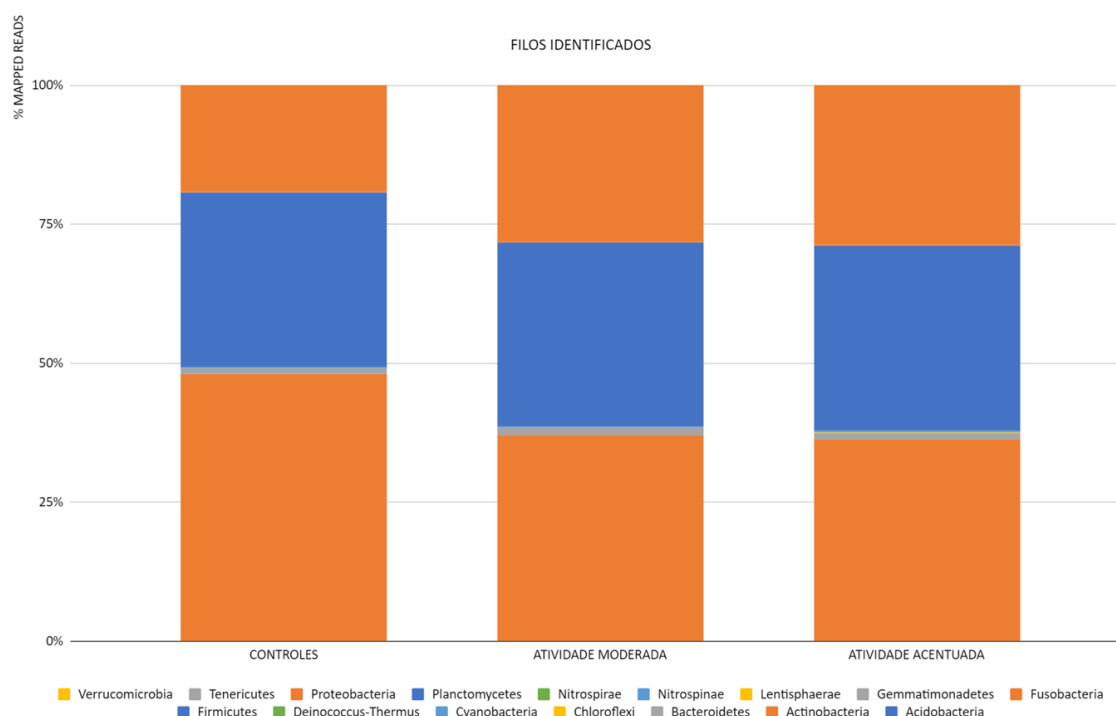
Fonte: elaborado pelo autor

#### 5.1.4 Resultados por Atividade de Doença

Conforme estabelecido na literatura vigente, a atividade de doença foi definida através de critérios de avaliação clínica (índice de *Harvey-Bradshaw*) e endoscópica (classificação de SES-CD). Neste contexto, a avaliação taxonômica para filos, não apresentou diferentes percentuais significativas em pacientes com Crohn em atividade moderada ou em atividade acentuada (figura 10).

Figura 15 – análise taxonômica para filios em percentual de *mapped reads* evidenciando padrão de filios semelhantes entre pacientes com Crohn em atividade moderada ou atividade acentuada

ANÁLISE EM PORCENTAGEM DO PERFIL BACTERIANO POR FILO ENTRE CONTROLES E PACIENTES COM DIFERENTES ATIVIDADES ENDOSCÓPICAS



Fonte: elaborado pelo autor

### 5.1.5 Resultados por Vias de Sinalização

A tabela abaixo contempla as principais vias de sinalização com diferença significativa entre pacientes com Crohn e controles saudáveis. Este achado foi alcançado após análise da média de prevalência entre as principais vias entre pacientes com Crohn e os controles saudáveis (tabela 4).

Tabela 4 – representatividade das vias de sinalização mais representativas expressas nos pacientes com Crohn e nos controles (CTRL) saudáveis

<b>TABELA COM DIFERENÇA NAS VIAS DE SINALIZAÇÃO ENTRE CONTROLES E PACIENTES</b>			
Via de sinalização	Média Crohn	Média CTRL	Razão Crohn/CRTL
<b>p53 signaling pathway</b>	1759,461538	351,5714286	5,004563498
<b>Colorectal cancer</b>	1741,692308	350,4285714	4,970177804
<b>Glycan biosynthesis and metabolism</b>	40019	8460,142857	4,730298374
<b>Lipopolysaccharide biosynthesis</b>	185386,8462	42830,71429	4,328362234
<b>Bile secretion</b>	530,2307692	131,2857143	4,038754499
<b>MAPK signaling pathway</b>	21144,46154	5681,714286	3,721493281
<b>Apoptosis</b>	6567,461538	2085	3,149861649
<b>Adherens junction</b>	0	140943,8571	0
<b>Glycosaminoglycan biosynthesis - chondroitin sulfate</b>	0	57369,42857	0
<b>TGF-beta signaling pathway</b>	0	38,71428571	0
<b>Tight junction</b>	0	21140,28571	0
<b>Focal adhesion</b>	0	690,2857143	0
<b>G protein-coupled receptors</b>	2,307692308	47796,42857	4,828170005
<b>Cytochrome P450</b>	137,1538462	34268,57143	0,004002322

Fonte: elaborado pelo autor

Tendo em vista os resultados desta análise é possível observar que as vias associadas à carcinogênese e à inflamação apresentam maior prevalência nos pacientes com Crohn (como a via de sinalização do p53 e a via do câncer colorretal). Além disso, é notório do aumento na via de LPSs.

## 6 DISCUSSÃO

A patogênese das DIIs é complexa e, nos últimos anos, o conceito de *interactoma* se estabeleceu como forma mais completa de designar a complexa rede de interações entre as diferentes vias que contribuem para o desenvolvimento destas patologias (SOUZA; FIOCCHI; ILIOPOULOS, 2017). Essas interações entre os diferentes “omas” – globalmente considerados os fatores ambientais (*exposoma*), os fatores genéticos (genoma), os fatores imunológicos (*imunoma*) e os fatores relacionados à microbiota intestinal (*microbioma*) –, há uma grande complexidade que não poderá ser plenamente compreendida estudando de forma isolada cada um dos grupos. O resultado final desta rede de complexas interações é a inflamação intestinal mediada por disfunções moleculares. Para postular e definir o *interactoma* das DIIs são necessários novos conceitos e ferramentas com o objetivo de implementar avaliação sistemática. Assim sendo, almeja-se uma estratégia de integração imparcial orientada por dados que revela os principais participantes do sistema, identifica os principais impulsionadores da inflamação e permite o desenvolvimento de terapias direcionadas. Ferramentas de bioinformática poderosas capazes de consultar e integrar vários –omas estão disponíveis, permitindo a integração de informações genômicas, epigenômicas, transcriptômicas, proteômicas, metabolômicas e de microbiomas para construir um mapa molecular abrangente de DIIs. Esta abordagem permitirá a identificação de subtipos moleculares de DIIs, correlações com fenótipos clínicos e elucidação dos *hubs* centrais do *interactoma* de DIIs que auxiliarão na descoberta de compostos que podem direcionar especificamente os *hubs* que controlam a doença (SOUZA; FIOCCHI; ILIOPOULOS, 2017).

Ainda no que se refere ao processo que culmina em inflamação crônica e inapropriada intestinal há o conceito de DAMPs (padrões moleculares associados a danos). DAMPs são moléculas endógenas que, em condições de lesão celular, são liberadas no meio extracelular por células necróticas e matriz extracelular, e desencadeiam resposta inflamatória através da ativação do sistema imune (RANI, 2017). Tendo em vista o ineditismo da observação de DNA bacteriano circulante no sangue de pacientes com doença de Crohn, pode-se postular um possível papel destes como DAMPs e, com isso, atividade na perpetuação de resposta imunológica inadequada.

Além das hipóteses associadas à maior perpetuação e ativação da resposta inflamatória, nossos resultados denotam e corroboram a premissa inicial de maior permeabilidade intestinal nos pacientes com DIIs já que foi evidenciada maior quantidade de bactérias no sangue. Por outro lado, é importante destacar que este achado de maior quantidade de DNA bacteriano circulante no sangue de pacientes com DII não apresentou diferença entre pacientes com atividade moderada ou acentuada da doença. Neste contexto, a teoria inicial de que tal achado pudesse contribuir como um novo biomarcador de “atividade inflamatória” não se configurou verdadeiro nesta amostra (figura 10).

Em relação à análise taxonômica para filo, diferentemente do descrito em alguns trabalhos da literatura de sangue e fezes, não houve um aumento de *Bacteroidetes* e *Proteobacteria* juntamente com uma diminuição na abundância de *Firmicutes* (MAN; KAAKOUSH; MITCHELL, 2011). Nossa amostra cursou com aumento percentual de Firmicutes, aumento de Proteobacteria e diminuição de Actinobacteria. Esta última é especialmente relevante se considerarmos que neste filo estão contempladas as bactérias do gênero *Bifidobacterium*. Este é um gênero de bactérias anaeróbicas e atua como probiótico benéfico para a saúde humana. As Bifidobactérias são uns dos maiores grupos de bactérias que compõe a microbiota intestinal. Estas residem no cólon e promovem benefícios para a saúde de seus hospedeiros. Bifidobactérias estão associadas a uma menor incidência de alergias (BJÖRKSTÉN *et al.*, 2001) e também com a prevenção do crescimento de algumas formas de tumores (GUARNER; MALAGELADA, 2003).

Além disso, houve aumento percentual do filo Proteobacteria no grupo de pacientes com Crohn. Este achado pode ser relevante justamente pelo sentido de incluir um gênero de bactérias com possível atividade patogênica aos seres humanos e que culmina em maior atividade inflamatória. Para exemplificar uma das principais classes patogênicas incluída neste filo, convém destacar a classe *Gammaproteobacteria*. A classe possui vários grupos de bactérias de importância médica e científica, como as famílias *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae* e *Pseudomonadaceae*. Um grande número de agentes patogênicos para o homem e animais integram a classe, entre eles, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae* e *Pseudomonas aeruginosa* (GARRITY; BELL; LILBURN, 2005). O aumento deste filo em pacientes com DIIs já foi extensamente evidenciado na literatura (ALDARS-GARCÍA; CHAPARRO; GISBERT, 2021).

Em relação a análise taxonômica de gêneros, algumas diferenças principais mereceram maior destaque e pesquisa na literatura, a saber: aumento nos pacientes de *Neisseria*, aumento nos pacientes de *Pseudomonas*, aumento nos pacientes de *Streptococcus*, aumento nos pacientes de *Abiotrophia*, diminuição nos pacientes de *Staphylococcus* e diminuição nos pacientes de *Propionibacterium*. Estas diferenças tornam-se importantes não apenas pelas especificidades de aumento e/ou diminuição, como também pela quantidade de bactérias ter sido maior em pacientes do que em controles sem alterar de forma significativa a abundância e a diversidade. Este último para o sangue difere do conceito já bem estabelecido na literatura para fezes e amostras teciduais. Nestas há diferenças significativas de quantidade e diversidade entre a microbiota intestinal de pacientes e controles saudáveis. O padrão de disbiose mais associado às DIIs evidencia diminuição de bactérias comensais, particularmente, *Firmicutes* e *Bacteroidetes* e aumento relativo de espécies bacterianas da família *Enterobacteriaceae* (filo *Proteobacteria*).

No que se refere à variabilidade nos resultados encontrados na literatura, esta pode ser, em parte, devido aos requisitos de cultura exigentes das formas deficientes da parede celular ("formas L") de *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis* (MAP), que estão presentes na DC. As taxas de detecção de DNA de MAP em tecidos de pacientes com DC usando uma PCR específica variam de 0% a 100%. Numerosas outras bactérias específicas foram propostas como agentes causadores de DC, incluindo *Pseudomonas maltophilia*, *Mycobacterium kansasii*, *Chlamydia trachomatis*, *Bacteroides fragilis* e *Listeria monocytogenes*. Assim como a MAP, *P. maltophilia* e *M. kansasii* foram identificados inicialmente nos tecidos de pacientes de Crohn como "formas L". Este não é de forma alguma um fenômeno raro, pois uma variedade de outras bactérias, como *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcaceae* e *Streptococcaceae*, foram cultivadas a partir de tecidos de pacientes com DII (mas não de indivíduos de controle) também como "formas L". (HERTOGH *et al.* 2008). Assim sendo, de forma comparativa com nossos achados para o sangue, estes resultados são consistentes se considerarmos o gênero *Streptococcaceae* e inconsistentes para o gênero *Staphylococcaceae*.

Em estudo de avaliação transversal do perfil de microbiota intestinal na população italiana, os autores identificaram os seguintes achados: em nível de gênero, *Escherichia*, *Faecalibacterium*, *Streptococcus*, *Sutterella* e *Veillonella* todos aumentaram significativamente no grupo DII, enquanto *Bacteroides*, *Flavobacterium*

e *Oscillospira geni* todos diminuíram. Nos pacientes com DC, apenas *Escherichia* e *Veillonella* aumentaram significativamente e, entre os gêneros que diminuíram, também *Prevotella* diminuiu significativamente. Curiosamente, neste grupo o gênero *Faecalibacterium* diminuiu em relação ao grupo controle, ao contrário do observado na DII como um todo e na RCU grupo (SANTORU *et al.*, 2017). Considerando-se o gênero *Streptococcus*, tais achados são compatíveis com nossa análise.

Convém destacar ainda o possível papel do gênero *Pseudomonas*. Estudos mostram que, assim como a *Yersinia*, *Pseudomonas* supostamente atua como gatilho na DC doença (NAGALINGAM; LYNCH, 2012; SCALDAFERRI *et al.*, 2013; WANG; GARRITY; TIEDJE; COLE, 2007). Este achado é compatível com nossa análise para o sangue. Considerando-se que a quantidade de DNA bacteriano sanguíneo presente pode ou não vir a ter papel crucial na ativação da resposta imunológica, este gênero surge como possível diferencial de gatilho para a resposta inflamatória inapropriada.

No que tange à ativação de vias da resposta imunológica, dois gêneros bacterianos identificados surgem como potenciais gatilhos em análises multi-ômicas (PRIYA *et al.*, 2022). Neste aspecto, considerando-se apenas redes multi-ômicas para as DIIs, os gêneros *Peptostreptococcus* e *Granulicatella* (ambos do filo *Firmicutes*) são marcadamente mais presentes (pelo menos cinco vezes mais) nos pacientes com DC do que no sangue de controles saudáveis. Estes, em análise multi-ômica, ativam as vias de sinalização integrina beta1 e celular RAC1, respectivamente. Com isso, podem contribuir para a resposta imunológica exacerbada que culmina nos sintomas da DII.

Tendo em vista os resultados sobre as vias de sinalização, é possível observar que as vias associadas à carcinogênese e à inflamação apresentam maior prevalência nos pacientes com Crohn (como a via de sinalização do p53 e a via do câncer colorretal). Além disso, é notório o aumento na via de LPSs. Estes achados nos parecem interessantes pois, conforme previamente mencionado anteriormente, a liberação da endotoxina LPS constituinte de bactérias Gram-negativas desempenha papel importante na homeostase intestinal, incluindo o controle da morte celular na mucosa, que permite a translocação entre o intestino, o sangue e outros tecidos (RHEE, 2014).

Ademais, além do ineditismo na identificação DNA bacteriano circulante, no sangue de pacientes com Crohn, também nos parecem muito relevantes as

hipóteses correlatas daí advindas, que nos fazem inferir a existência de alterações na permeabilidade de mucosa. A Ausência das vias de sinalização *Adherens junction* e *Tight junction* poderiam contribuir para este aumento de permeabilidade.

Assim sendo, nossa análise sobre vias de sinalização denotou duas circunstâncias distintas e que culminam em uma premissa clínica de correlação absolutamente plausível. Apesar desta plausibilidade, careceremos de mais pacientes e da continuidade de análise dos nossos dados para melhor esclarecimento se tais correlações poderiam ou não vir a ser se configurar causalidades. O primeiro grande grupo de circunstâncias que identificamos com razão aumentada em pacientes com DC são as vias de sinalização para câncer colorretal e do p53. Sabidamente estas vias estão associadas a maior risco de desenvolvimento de neoplasias de trato gastrointestinal e a maior resposta inflamatória. Ambos são fenômenos absolutamente presentes em pacientes com DII. Ademais, o segundo grande grupo de alterações culmina em alterações multiômicas teóricas que expressam a maior permeabilidade da mucosa intestinal, a maior quantidade de defeitos da mucosa gastrointestinal e a maior dificuldade de inibir a resposta inflamatória. Este segundo grande grupo se manifesta pela quantidade extremamente baixa da expressão das vias de sinalização de *Adherens junction*, *Tight junction*, *Focal adhesion*, *Glycosaminoglycan biosynthesis - chondroitin sulfate* e *TGF-beta signaling pathway* nos pacientes com Crohn, quando comparados aos controles saudáveis (vide tabela 4).



## **7 PERSPECTIVAS FUTURAS**

De uma maneira geral, o projeto teve por objetivo evoluir na compreensão da patogênese das DII, doenças crônicas de elevada morbidade e de alto custo social. Todos os dados do estudo serão prontamente disponibilizados e os resultados do trabalho serão submetidos à publicação em periódicos indexados de circulação internacional.

Com a complementação do projeto, pretendemos fortalecer as colaborações locais, dentro da própria instituição, viabilizando a interação de diferentes laboratórios e departamentos, o que configura e concretiza o caráter multidisciplinar da pesquisa. Com o apoio do LABMOPS do IQ e o Laboratório de Imunologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da UFRJ, faremos as análises de mediadores inflamatórios e todos os métodos moleculares envolvidos na proposta.

## 8 CONCLUSÃO

Nossos resultados indicaram dados inéditos na avaliação da existência de maior quantidade de DNA bacteriano circulante no sangue de pacientes com doença de Crohn. Através de análise taxonômica no sangue de pacientes com Crohn e controles ficou comprovada a maior presença de DNA bacteriano circulante no sangue dos pacientes com a doença inflamatória intestinal (DII).

Contudo, a presença de maior quantidade de DNA circulante evidenciada não demonstrou correlação com o grau de atividade da DII. Assim sendo, estes resultados iniciais não sugerem que o DNA circulante tenha papel como marcador inflamatório para atividade de doença.

**BIBLIOGRAFIA**

ALDARS-GARCÍA, L.; CHAPARRO, M.; GISBERT, J. P. Systematic Review: The Gut Microbiome and Its Potential Clinical Application in Inflammatory Bowel Disease. **Microorganisms**, [Basel], v. 9, n. 5, 30 Apr. 2021. DOI: 10.3390/microorganisms9050977. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/5/977>. Acesso em: 19 fev. 2023.

AMAR, J. *et al.* Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment. **EMBO Mol Med**, [United Kingdom], v. 3, n. 9, p. 559-572, Sep. 2011. DOI 10.1002/emmm.201100159. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3265717/>. Acesso em: 19 fev. 2023.

AMAR, J. *et al.* Blood microbiota dysbiosis is associated with the onset of cardiovascular events in a large general population: the D.E.S.I.R. study. **PLoS One**, [San Francisco], v. 8, n. 1, p. 1-8, 2013. DOI 10.1371/journal.pone.0054461. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0054461>. Acesso em: 19 fev. 2023.

AMAR, S.; ENGELKE, M. Periodontal innate immune mechanisms relevant to atherosclerosis. **Mol Oral Microbiol**, [United Kingdom], v. 30, n. 3, p. 171-185, Jun. 2015. DOI 10.1111/omi.12087. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/omi.12087>. Acesso em: 19 fev. 2023.

ANDOH, A. *et al.* Comparison of the fecal microbiota profiles between ulcerative colitis and Crohn's disease using terminal restriction fragment length polymorphism analysis. **J Gastroenterol.**, [Japan], v. 46, n. 4, p. 479-486, Apr. 2011. Comparative Study. DOI: 10.1007/s00535-010-0368-4. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00535-010-0368-4>. Acesso em: 19 fev. 2023.

BAUMGART, D. C.; CARDING, S. R. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. **Lancet**, [London], v. 369, n. 9573, p. 1627-1640, 12 May 2007. DOI 10.1016/S0140-6736(07)60750-8. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(07\)60750-8/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(07)60750-8/fulltext). Acesso em: 19 fev. 2023.

BERER, K. *et al.* Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. **Nature**, [London], v. 479, n. 7374, p. 538-541, 26 Oct. 2011. DOI 10.1038/nature10554. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature10554>. Acesso em: 19 fev. 2023.

BILLMANN-BORN, S. *et al.* The complex interplay of NOD-like receptors and the autophagy machinery in the pathophysiology of Crohn disease. **Eur J Cell Biol**, [München], v. 90, n. 6-7, p. 593-602, June-July 2011. DOI 10.1016/j.ejcb.2010.10.015. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0171933510002347?via%3Di> hub. Acesso em: 19 fev. 2023.

BJÖRKSTÉN, B. *et al.* Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. **J Allergy Clin Immunol**, [United States], v. 108, n. 4, p. 516-520, Oct. 2001. DOI 10.1067/mai.2001.118130. Disponível em: [https://www.jacionline.org/article/S0091-6749\(01\)96140-8/fulltext](https://www.jacionline.org/article/S0091-6749(01)96140-8/fulltext). Acesso em: 19 fev. 2023.

CAMILLERI, M. *et al.* Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. **Neurogastroenterol Motil**, [United Kingdom], v. 24, n. 6, p. 503-512, June 2012. DOI: 10.1111/j.1365-2982.2012.01921.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2982.2012.01921.x>. Acesso em: 19 fev. 2023.

CATALIOTO, R. M.; GIULIANI, S ; MAGGI, C. A.. Intestinal epithelial barrier dysfunction in disease and possible therapeutical interventions. **Curr Med Chem**, [Netherlands], v. 18, n. 3, p. 398-426, 2011. DOI: 10.2174/092986711794839179. Disponível em: <https://www.eurekaselect.com/article/18060>. Acesso em: 19 fev. 2023.

CATRINA, A. I.; DEANE, K. D.; SCHER, J. U. Gene, environment, microbiome and mucosal immune tolerance in rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford)**, [Oxford], v. 55, n. 3, p. 391-402, Mar. 2016. DOI 10.1093/rheumatology/keu469. Disponível em: <https://academic.oup.com/rheumatology/article/55/3/391/1792864?login=false>. Acesso em: 19 fev. 2023.

CHASSAING, B.; DARFEUILLE-MICHAUD, A. The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, [United States], 140, n. 6, p. 1720-1728, May 2011. DOI: 10.1053/j.gastro.2011.01.054. Disponível em: [https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085\(11\)00161-2/fulltext?referrer=https%3A%2F%2Fpubmed.ncbi.nlm.nih.gov%2F](https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085(11)00161-2/fulltext?referrer=https%3A%2F%2Fpubmed.ncbi.nlm.nih.gov%2F). Acesso em: 19 fev. 2023.

CHO, J. H. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nat Rev Immunol**, [United Kingdom], v. 8, n. 6, p. 458-466, June 2008. DOI 10.1038/nri2340. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nri2340>. Acesso em: 19 fev. 2023.

COONEY, R. *et al.* NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. **Nat Med**, [United States], 16, n. 1, p. 90-97, Jan 2010. DOI 10.1038/nm.2069. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nm.2069>. Acesso em: 19 fev. 2023.

CREASY, H. H. *et al.* HMPDACC: a Human Microbiome Project Multi-omic data resource. **Nucleic Acids Research**, [United Kingdom], v. 49, n. D1, 2021. DOI 10.1093/nar/gkaa996. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7778886/>. Acesso em: 19 fev. 2023.

EPSTEIN, S. S. The phenomenon of microbial uncultivability. **Curr Opin Microbiol**, [United Kingdom], v. 16, n. 5, p. 636-642, Oct. 2013. DOI: 10.1016/j.mib.2013.08.003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369527413001458?via%3Dihub>. Acesso em: 19 fev. 2023.

FONSECA, D. M.; HAND, T. W.; HAN, S. J. *et al.* Microbiota-Dependent Sequelae of Acute Infection Compromise Tissue-Specific Immunity. **Cell**, [Cambridge, MA], v. 163, n. 2, p. 354-366, 8 Oct. 2015. DOI 10.1016/j.cell.2015.08.030. Disponível em: [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(15\)01044-2?\\_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867415010442%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(15)01044-2?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867415010442%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 19 fev. 2023.

FRANK, D. N. *et al.* Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. **Proc Natl Acad Sci U S A**, [Washington, DC], v. 104, n. 34, p. 13780-13785, 21 Aug. 2007. DOI 10.1073/pnas.0706625104. Disponível em: [https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.0706625104?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub++0pubmed](https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.0706625104?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed). Acesso em: 19 fev. 2023.

FRITZ, T. *et al.* Crohn's disease: NOD2, autophagy and ER stress converge. **Gut**, [London], v. 60, n. 11, p. 1580-1588, Nov. 2011. DOI 10.1136/gut.2009.206466. Disponível em: <https://gut.bmj.com/content/60/11/1580.long>. Acesso em: 19 fev. 2023.

FUKUDA, S.; HASE, K.; OHNO, H. Application of a mouse ligated Peyer's patch intestinal loop assay to evaluate bacterial uptake by M cells. **J Vis Exp**, [United States], v. 17, n. 58, 17 Dec. 2011. DOI 10.3791/3225. Disponível em: <https://www.jove.com/t/3225>. Acesso em: 19 fev. 2023.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. The revised road map to the manual. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. New York: Springer, 2005. v. 2, Part A.

GEVERS, D. *et al.* The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease. **Cell Host Microbe**, [United States], v. 15, n. 3, p. 382-392, 12 Mar. 2014. DOI 10.1016/j.chom.2014.02.005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4059512/>. Acesso em: 20 fev. 2023.

GLAROS, T. G. *et al.* Causes and consequences of low grade endotoxemia and inflammatory diseases. **Front Biosci (Schol Ed)**, [Singapore], v. 5, n. 2, p. 754-765, 01 Jan. 2013. DOI 10.2741/s405. Disponível em: <https://www.imrpress.com/journal/FBS/5/2/10.2741/s405>. Acesso em: 20 fev. 2023.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. **Lancet**, [London], v. 361, n. 9356, p. 512-519, 8 Feb. 2003. DOI 10.1016/S0140-6736(03)12489-0. Disponível em:

[https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(03\)12489-0/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(03)12489-0/fulltext). Acesso em: 19 fev. 2023.

HANDELSMAN, J. *et al.* Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & biology**, [United States], v. 5, n. 10, p. 245-249, 1998. DOI 10.1016/s1074-5521(98)90108-9. Disponível em: [https://www.cell.com/cell-chemical-biology/pdf/S1074-5521\(98\)90108-9.pdf?\\_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1074552198901089%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell-chemical-biology/pdf/S1074-5521(98)90108-9.pdf?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1074552198901089%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 26 fev. 2023.

HANSEN, R. *et al.* Microbiota of de-novo pediatric IBD: increased *Faecalibacterium prausnitzii* and reduced bacterial diversity in Crohn's but not in ulcerative colitis. **Am J Gastroenterol**, [Philadelphia], v. 107, n. 12, p. 1913-1922, Dec. 2012. DOI 10.1038/ajg.2012.335. Disponível em: [https://journals.lww.com/ajg/Fulltext/2012/12000/Microbiota\\_ofDe\\_NovoPediatric\\_IBD\\_.26.aspx](https://journals.lww.com/ajg/Fulltext/2012/12000/Microbiota_ofDe_NovoPediatric_IBD_.26.aspx). Acesso em: 20 fev. 2023.

HARVEY, R. F.; BRADSHAW, J. M. A simple index of Crohn's-disease activity. **Lancet**, [London], v. 315, n. 8167, p. 514, 8 Mar. 1980. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(80\)92767-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(80)92767-1). Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(80\)92767-1/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(80)92767-1/fulltext). Acesso em: 20 fev. 2023.

HERTOGH, G. de *et al.* Evidence for the involvement of infectious agents in the pathogenesis of Crohn's disease. **World J Gastroenterol**, [United States], v. 14, n. 6, p. 845-852, 14 Feb. 2008. DOI 10.3748/wjg.14.845. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2687051/>. Acesso em: 19 fev. 2023.

HOEFKENS, E. *et al.* Genetic association and functional role of Crohn disease risk alleles involved in microbial sensing, autophagy, and endoplasmic reticulum (ER) stress. **Autophagy**, [United States], v. 9, n. 12, p. 2046-2055, Dec. 2013. DOI: <https://doi.org/10.4161/auto.26337>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.4161/auto.26337?needAccess=true&role=button>. Acesso em: 21 fev. 2023.

HOLLANDER, D. *et al.* Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor. **Ann Intern Med.**, [Philadelphia], v. 105, n. 6, p. 883-885, Dec. 1986. DOI 10.7326/0003-4819-105-6-883. Disponível em: <https://www.acpjournals.org/doi/epdf/10.7326/0003-4819-105-6-883>. Acesso em: 21 fev. 2023.

HOSOMI, S.; KASER, A.; BLUMBERG, R. S. Role of endoplasmic reticulum stress and autophagy as interlinking pathways in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Curr Opin Gastroenterol**, [United States], 31, n. 1, p. 81-88, Jan. 2015. DOI 10.1097/MOG.000000000000144. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4592163/>. Acesso em: 21 fev. 2023.

HUANG, Y. *et al.* Detection of *Helicobacter pylori* DNA in peripheral blood from patients with peptic ulcer or gastritis. **APMIS**, [Copenhagen], v. 114, n. 12, p. 851-856, Dec. 2006. DOI: [https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2006.apm\\_425.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2006.apm_425.x).

Disponível em:

[https://www.researchgate.net/publication/6594290\\_Detection\\_of\\_Helicobacter\\_pylori\\_DNA\\_in\\_peripheral\\_blood\\_from\\_patients\\_with\\_peptic\\_ulcer\\_or\\_gastritis](https://www.researchgate.net/publication/6594290_Detection_of_Helicobacter_pylori_DNA_in_peripheral_blood_from_patients_with_peptic_ulcer_or_gastritis). Acesso em: 21 fev. 2023.

JOHN, L. J.; FROMM, M.; SCHULZKE, J. D. Epithelial barriers in intestinal inflammation. **Antioxid Redox Signal**, [New Rochelle], v. 15, n. 5, p. 1255-1270, July 2011. DOI: <https://doi.org/10.1089/ars.2011.3892>. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/pdf/10.1089/ars.2011.3892?download=true>. Acesso em: 21 fev. 2023.

JUNG, C.; HUGOT, J. P.; BARREAU, F. Peyer's Patches: The Immune Sensors of the Intestine. **Int J Inflam**, [London], v. 2010, ID 823710, 12 pages, Sep. 2010. Special issue. DOI 10.4061/2010/823710. Disponível em: <https://downloads.hindawi.com/journals/iji/2010/823710.pdf>. Acesso em: 21 fev. 2023.

KAPRELYANTS, A. S.; KELL, D. B. Dormancy in Stationary-Phase Cultures of *Micrococcus luteus*: Flow Cytometric Analysis of Starvation and Resuscitation. **Appl Environ Microbiol**, [Washington, DC], v. 59, n. 10, p. 3187-3196, Oct. 1993. DOI: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16349059/#:~:text=10.1128/aem.59.10.3187%2D3196.1993>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC182436/pdf/aem00039-0031.pdf>. Acesso em: 21 fev. 2023.

KASER, A.; MARTINEZ-NAVES, E.; BLUMBERG, R. S. Endoplasmic reticulum stress: implications for inflammatory bowel disease pathogenesis. **Curr Opin Gastroenterol**, [London], v. 26, n. 4, p. 318-326, July 2010. DOI 10.1097/MOG.0b013e32833a9ff1. Disponível em: [https://journals.lww.com/co-gastroenterology/Abstract/2010/07000/Endoplasmic\\_reticulum\\_stress\\_\\_implications\\_for.5.aspx](https://journals.lww.com/co-gastroenterology/Abstract/2010/07000/Endoplasmic_reticulum_stress__implications_for.5.aspx). Acesso em: 21 fev. 2023.

KIBRU, D. *et al.* *Helicobacter pylori* infection and its association with anemia among adult dyspeptic patients attending Butajira Hospital, Ethiopia. **BMC Infect Dis**, [United Kingdom], v. 14, p. 656, Dec. 2014. DOI: 10.1186/s12879-014-0656-3. Disponível em: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/counter/pdf/10.1186/s12879-014-0656-3.pdf>. Acesso em: 21 fev. 2023.

KINOSHITA, M.; TAKEDA, K. Microbial and dietary factors modulating intestinal regulatory T cell homeostasis. **FEBS Lett**, [Amsterdã], v. 588, n. 22, p. 4182-4187, Nov. 2014. DOI: 10.1016/j.febslet.2014.03.018. Disponível em: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/j.febslet.2014.03.018>. Acesso em:

KOREN, O. *et al.* Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, [United States], v. 108 Suppl 1, p. 4592-4598, Oct. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1011383107>. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.1011383107>. Acesso em: 21 fev. 2023.

KOSTIC, A. D.; XAVIER, R. J.; GEVERS, D. The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. **Gastroenterology**, [United States],

v.146, n. 6, p. 1489-1499, May 2014. DOI: 10.1053/j.gastro.2014.02.009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/journal/gastroenterology/vol/146/issue/6>. Acesso em: 21 fev. 2023.

LE BAUT, G. *et al.* Prevalence of Yersinia Species in the Ileum of Crohn's Disease Patients and Controls. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, [Lausanne], v. 8, p. 336, Sept. 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00336>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2018.00336/full>. Acesso em: 21 fev. 2023.

LELOUARD, H. *et al.* Pathogenic bacteria and dead cells are internalized by a unique subset of Peyer's patch dendritic cells that express lysozyme. **Gastroenterology**, [United States], v. 138, n. 1, p. 173-184, Jan. 2010. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.09.051. Disponível em: [https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085\(09\)01746-6/pdf](https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085(09)01746-6/pdf). Acesso em: 21 fev. 2023.

LI, K. Y. *et al.* Fecal microbiota in pouchitis and ulcerative colitis. **World J Gastroenterol**, [United States], v. 22, n. 40, p. 8929-8939, Oct. 28 2016. DOI: <https://doi.org/10.3748%2Fwjg.v22.i40.8929>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5083798/>. Acesso em: 21 fev. 2023.

MA, H. D. *et al.* The intestinal microbiota and microenvironment in liver. **Autoimmun Rev**, [Netherlands], v. 14, n. 3, p. 183-191, Mar. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2014.10.013>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1568997214002250?via%3Di%3Dhub>. Acesso em: 21 fev. 2023.

MAN, S. M.; KAAKOUSH, N. O.; MITCHELL, H. M. The role of bacteria and pattern-recognition receptors in Crohn's disease. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, [London], v. 8, n. 3, p. 152-168, Mar. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2011.3>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrgastro.2011.3#change-history>. Acesso em: 21 fev. 2023.

MARKS, D. J. *et al.* Defective acute inflammation in Crohn's disease: a clinical investigation. **Lancet**, [London], v. 367, n. 9511, p. 668-678, Feb. 25 2006. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68265-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68265-2). Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(06\)68265-2/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(06)68265-2/fulltext). Acesso em: 21 fev. 2023.

MARSHALL, B. J.; WARREN, J. R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **Lancet**, [London], v. 1, n. 8390, p. 1311-1315, June 16 1984. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(84\)91816-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(84)91816-6). Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(84\)91816-6/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(84)91816-6/fulltext). Acesso em: 21 fev. 2023.

MAY, G. R.; SUTHERLAND, L. R.; MEDDINGS, J. B. Is small intestinal permeability really increased in relatives of patients with Crohn's disease? **Gastroenterology**, [United States], v. 104, n. 6, p. 1627-1632, June 1993. DOI: <https://doi.org/10.5555/uri:pii:001650859390638S>. Disponível em:



<https://www.gastrojournal.org/action/showPdf?pii=0016-5085%2893%2990638-S>. Acesso em: 21 fev. 2023.

MIELE, E. *et al.* Altered intestinal permeability is predictive of early relapse in children with steroid-responsive ulcerative colitis. **Aliment Pharmacol Ther**, [United Kingdom], v. 25, n. 8, p. 933-939, Apr.15 2007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03291.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1365-2036.2007.03291.x>. Acesso em: 21 fev. 2023.

NAGALINGAM, N. A.; LYNCH, S. V. Role of the microbiota in inflammatory bowel diseases. **Inflamm Bowel Dis**, [United States], v. 18, n. 5, p. 968-984, May 2012. DOI: <https://doi.org/10.1002/ibd.21866>. Disponível em: <https://academic.oup.com/ibdjournal/article/18/5/968/4608110>. Acesso em: 21 fev. 2023.

NIELSEN, H. H. *et al.* Treatment for Helicobacter pylori infection and risk of Parkinson's disease in Denmark. **Eur J Neurol**, [Oxford], v. 19, n. 6, p. 864-869, June 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2011.03643.x>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3330170/pdf/nihms343768.pdf>. Acesso em: 21 fev. 2023.

NIKOLAUS, S.; SCHREIBER, S. Diagnostics of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, [United States], v. 133, n. 5, p. 1670-1689, Nov. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.09.001>. Disponível em: <https://www.gastrojournal.org/action/showPdf?pii=S0016-5085%2807%2901642-3>. Acesso em: 21 fev. 2023.

OWYANG, C.; WU, G. D. The gut microbiome in health and disease. **Gastroenterology**, [United States], v. 146, n. 6, p. 1433-1436, May 2014. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.03.032>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/sdfe/pdf/download/eid/1-s2.0-S0016508514003813/first-page-pdf>. Acesso em: 21 fev. 2023.

PARKS, D. H. *et al.* STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. **Bioinformatics**, [Oxford], v. 30, n. 21, p. 3123-3124, Nov. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu494>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4609014/>. Acesso: 21 fev. 2023.

PASCAL, V. *et al.* A microbial signature for Crohn's disease. **Gut**, [London], v. 66, n. 5, p. 813-822, May 2017. DOI: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-313235>. Disponível em: <https://gut.bmj.com/content/gutjnl/66/5/813.full.pdf>. Acesso em: 21 fev. 2023.

PEDAMALLU, C. *et al.* Metagenomic Characterization of Microbial Communities In Situ Within the Deeper Layers of the Ileum in Crohn's Disease. **Cell Mol Gastroenterol Hepatol**, [New York], v. 2, n. 5, p. 563-566 e5, Sept. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2016.05.011>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5042890/>. Acesso em: 21 fev. 2023.

PEETERS, M. *et al.* Clustering of increased small intestinal permeability in families with Crohn's disease. **Gastroenterology**, [United States], v. 113, n. 3, p. 802-807, Sept. 1997. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(97\)70174-4](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(97)70174-4). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9287971/>. Acesso em: 21 fev. 2023.

PRAJSNAR, T. K. *et al.* A privileged intraphagocyte niche is responsible for disseminated infection of *Staphylococcus aureus* in a zebrafish model. **Cell Microbiol**, [United Kingdom], v. 14, n. 10, p. 1600-1619, Oct. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01826.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1462-5822.2012.01826.x>. Acesso em: 21 fev. 2023.

PRIYA, S. *et al.* Identification of shared and disease-specific host gene-microbiome associations across human diseases using multi-omic integration. **Nat Microbiol**, [London], v. 7, n. 6, p. 780-795, June 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01121-z>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41564-022-01121-z>. Acesso em: 21 fev. 2023.

PROAL, A. D.; ALBERT, P. J.; MARSHALL, T. G. Inflammatory disease and the human microbiome. **Discov Med**, [United States], v. 17, n. 95, p. 257-265, May 2014. Disponível em: <https://www.discoverymedicine.com/Amy-D-Proal/2014/05/22/inflammatory-disease-and-the-human-microbiome/>. Acesso em: 21 fev. 2023.

QUIGLEY, E. M. Commensal bacteria: the link between IBS and IBD? **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, [United States], v. 14, n. 5, p. 497-503, Sept. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1097/mco.0b013e328348c033>. Disponível em: [https://journals.lww.com/co-clinicalnutrition/Abstract/2011/09000/Commensal\\_bacteria\\_\\_the\\_link\\_between\\_IBS\\_and\\_IBD\\_.15.aspx](https://journals.lww.com/co-clinicalnutrition/Abstract/2011/09000/Commensal_bacteria__the_link_between_IBS_and_IBD_.15.aspx). Acesso em: 21 fev. 2023.

RAMIREZ, J. H. *et al.* Biomarkers of cardiovascular disease are increased in untreated chronic periodontitis: a case control study. **Aust Dent J**, [Sydney], v. 59, n. 1, p. 29-36, Mar 2014. DOI: <https://doi.org/10.1111/adj.12139>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/adj.12139>. Acesso em: 21 fev. 2023.

RANI, M. *et al.* Damage-associated molecular patterns (DAMPs) released after burn are associated with inflammation and monocyte activation. **Burns**, [Netherlands], v. 43, n. 2, p. 297-303, Mar 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016%2Fj.burns.2016.10.001>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5373089/>. Acesso em: 21 fev. 2023.

RAUSCH, P. *et al.* Colonic mucosa-associated microbiota is influenced by an interaction of Crohn disease and FUT2 (Secretor) genotype. **Proc Natl Acad Sci U S A**, [United States], v. 108, n. 47, p. 19030-19035, Nov. 22 2011. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1106408108>. Disponível em: [https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.1106408108?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub++0pubmed](https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.1106408108?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed). Acesso em: 21 fev. 2023.

REHMAN, A. *et al.* Geographical patterns of the standing and active human gut microbiome in health and IBD. **Gut**, [London], v. 65, n. 2, p. 238-248, Feb. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308341>. Disponível em: <https://gut.bmj.com/content/65/2/238.long>. Acesso em: 21 fev. 2023.

REHMAN, A. *et al.* Nod2 is essential for temporal development of intestinal microbial communities. **Gut**, [London], v. 60, n. 10, p. 1354-1362, Oct. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1136/gut.2010.216259>. Disponível em: <https://gut.bmj.com/content/60/10/1354.long>. Acesso em: 21 fev. 2023.

RHEE, S. H. Lipopolysaccharide: basic biochemistry, intracellular signaling, and physiological impacts in the gut. **Intest Res**, [Seoul], v. 12, n. 2, p. 90-95, Apr. 2014. DOI: <https://doi.org/10.5217%2Fir.2014.12.2.90>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4204704/pdf/ir-12-90.pdf>. Acesso em 21 fev. 2023.

RONCO, C. Endotoxin removal: history of a mission. **Blood Purif**, [Switzerland], v. 37, p. 5-8, 2014. Suppl 1. DOI: <https://doi.org/10.1159/000356831>. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/Abstract/356831>. Acesso em: 21 fev. 2023.

ROTHBERG, J. M. *et al.* An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. **Nature**, [London], v. 475, n. 7356, p. 348-352, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature10242>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature10242>. Acesso em: 21 fev. 2023.

ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. **Nat Rev Immunol**, [London], v. 9, n. 5, p. 313-323, May 2009. DOI: <https://doi.org/10.1038/nri2515>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4095778/>. Acesso em: 21 fev. 2023.

SAIDEL-ODES, L.; ODES, S. Hygiene hypothesis in inflammatory bowel disease. **Ann Gastroenterol**, [Athens], v. 27, n. 3, p. 189-190, 2014. PMID 24975779. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4073011/>. Acesso em: 21 fev. 2023.

SALEM, M. *et al.* ATG16L1: A multifunctional susceptibility factor in Crohn disease. **Autophagy**, [United States], v. 11, n. 4, p. 585-594, Apr. 03 2015. DOI: <https://doi.org/10.1080%2F15548627.2015.1017187>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4502774/>. Acesso em: 21 fev. 2023.

SANTORU, M. L. *et al.* Cross sectional evaluation of the gut-microbiome metabolome axis in an Italian cohort of IBD patients. **Sci Rep**, [London], v. 7, n. 1, p. 9523, Aug. 25 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10034-5>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5573342/>. Acesso em: 21 fev. 2023.

SATO, J. *et al.* Gut dysbiosis and detection of "live gut bacteria" in blood of Japanese patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, [United States], v. 37, n. 8, p. 2343-2350, Aug. 2014. DOI: <https://doi.org/10.2337/dc13-2817>. Disponível em:

<https://diabetesjournals.org/care/article/37/8/2343/29540/Gut-Dysbiosis-and-Detection-of-Live-Gut-Bacteria>. Acesso em: 21 fev. 2023.

SATO, S.; KIYONO, H.; FUJIHASHI, K. Mucosal Immunosenescence in the Gastrointestinal Tract: A Mini-Review. **Gerontology**, [Switzerland], v. 61, n. 4, p. 336-342, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1159/000368897>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4475504/>. Acesso em: 21 fev. 2023.

SATSANGI, J. *et al.* The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. **Gut**, [London], v. 55, n. 6, p. 749-753, June 2006. DOI: <https://doi.org/10.1136/gut.2005.082909>. Disponível em: <https://gut.bmj.com/content/55/6/749.1.long>. Acesso em: 21 fev. 2023.

SCALDAFERRI, F. *et al.* Gut microbial flora, prebiotics, and probiotics in IBD: their current usage and utility. **Biomed Res Int**, [London], v. 2013, ID 435268, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1155/2013/435268>. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/435268/>. Acesso em: 21 fev. 2023.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Metagenomics for studying unculturable microorganisms: cutting the Gordian knot. **Genome biology**, [London], v. 6, n. 8, p. 1-4, 2005. Disponível em: <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2005-6-8-229>. Acesso em: 21 fev. 2003.

SCHMITZ, H. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. **J Cell Sci**, [England], 112 ( Pt 1), p. 137-146, Jan. 1999. DOI: <https://doi.org/10.1242/jcs.112.1.137>. Disponível em: <https://journals.biologists.com/jcs/article/112/1/137/25598/Tumor-necrosis-factor-alpha-TNFalpha-regulates-the>. Acesso em: 21 fev. 2023.

SCIENTIFIC, T. F. Luciferase Reporters. **Thermofisher.com**, 2018. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/sequencing/rna-sequencing.html>. Acesso em 26 fev. 2023.

SERINGEC, N. *et al.* Investigation of hemorheological parameters in periodontal diseases. **Clin Hemorheol Microcirc**, [Netherlands], v. 61, n. 1, p. 47-58, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3233/ch-141892>. Disponível em: <https://content.iospress.com/articles/clinical-hemorheology-and-microcirculation/ch1892>. Acesso em: 21 fev. 2023.

SEWELL, G. W.; MARKS, D. J.; SEGAL, A. W. The immunopathogenesis of Crohn's disease: a three-stage model. **Curr Opin Immunol**, [United Kingdom], v. 21, n. 5, p. 506-513, Oct. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016%2Fj.coi.2009.06.003>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4529487/>. Acesso em: 21 fev. 2023.

SHANAHAN, F. Irritable bowel syndrome: shifting the focus toward the gut microbiota. **Gastroenterology**, [United States], v. 133, n. 1, p. 340-342, July 2007. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.05.030>. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.05.030>. Acesso em: 21 fev. 2023.

SHARMA, H. S.; ZIMMERMANN-MEINZINGEN, S.; JOHANSON, C. E. Cerebrolysin reduces blood-cerebrospinal fluid barrier permeability change, brain pathology, and functional deficits following traumatic brain injury in the rat. **Ann N Y Acad Sci**, [United Kingdom], v. 1199, n. 1, p. 125-137, June 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05329.x>. Disponível em: <https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1749-6632.2009.05329.x>. Acesso em: 21 fev. 2023.

SHAW, M. H. *et al.* The ever-expanding function of NOD2: autophagy, viral recognition, and T cell activation. **Trends Immunol**, [Oxford], v. 32, n. 2, p. 73-79, Feb. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.it.2010.12.007>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3056277/>. Acesso em: 21 fev. 2023.

SMITH, A. M. *et al.* Disordered macrophage cytokine secretion underlies impaired acute inflammation and bacterial clearance in Crohn's disease. **J Exp Med**, [New York], v. 206, n. 9, p. 1883-1897, Aug. 31 2009. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.20091233>. Disponível em: <https://rupress.org/jem/article/206/9/1883/40446/Disordered-macrophage-cytokine-secretion-underlies>. Acesso em: 22 fev. 2023.

SOUZA, H. S. P. de; FIOCCHI, C. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, [United Kingdom], v. 13, n. 1, p. 13-27, Jan. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.186>. Disponível em: <https://go.gale.com/ps/i.do?id=GALE%7CA439634349&sid=googleScholar&v=2.1&it=r&linkaccess=abs&issn=17595045&p=AONE&sw=w&userGroupName=anon%7E15e79fb7>. Acesso em: 19 fev. 2023.

SOUZA, H. S. P. de; FIOCCHI, C.; ILIOPOULOS, D. The IBD interactome: an integrated view of aetiology, pathogenesis and therapy. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, [United Kingdom], v. 14, n. 12, p. 739-749, Dec. 2017. DOI: [10.1038/nrgastro.2017.110](https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.110). Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrgastro.2017.110>. Acesso em: 19 fev. 2023.

SWIDSINSKI, A. *et al.* Biostructure of fecal microbiota in healthy subjects and patients with chronic idiopathic diarrhea. **Gastroenterology**, [United States], v. 135, n. 2, p. 568-579, Aug. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.04.017>. Disponível em: <https://www.gastrojournal.org/action/showPdf?pii=S0016-5085%2808%2900669-0>. Acesso em: 22 fev. 2023.

TAKESHITA, K. *et al.* A Single Species of Clostridium Subcluster XIVa Decreased in Ulcerative Colitis Patients. **Inflamm Bowel Dis**, [United States], v. 22, n. 12, p. 2802-2810, Dec. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1097/mib.0000000000000972>. Disponível em: <https://academic.oup.com/ibdjournal/article/22/12/2802/4561889>. Acesso em: 22 fev. 2023.

TANEJA, V. Arthritis susceptibility and the gut microbiome. **FEBS Lett**, [Netherlands], v. 588, n. 22, p. 4244-4249, Nov. 17 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.05.034>. Disponível em:

<https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1016/j.febslet.2014.05.034>. Acesso em: 22 fev. 2023.

THJODLEIFSSON, B. *et al.* Subclinical intestinal inflammation: an inherited abnormality in Crohn's disease relatives? **Gastroenterology**, [United States], 124, n. 7, p. 1728-1737, June 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(03\)00383-4](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(03)00383-4). Disponível em: <https://www.gastrojournal.org/action/showPdf?pii=S0016-5085%2803%2900383-4>. Acesso em: 22 fev. 2023.

THWAITES, G. E.; GANT, V. Are bloodstream leukocytes Trojan Horses for the metastasis of *Staphylococcus aureus*? **Nat Rev Microbiol**, [United Kingdom], v. 9, n. 3, p. 215-222, Mar. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2508>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrmicro2508>. Acesso em: 22 fev. 2023.

WANG, J. *et al.* Dietary history contributes to enterotype-like clustering and functional metagenomic content in the intestinal microbiome of wild mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, [United States], v. 111, n. 26, p. E2703-E2710, July 01 2014. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1402342111>. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.1402342111>. Acesso em: 22 fev. 2023.

WANG, Q.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M.; COLE, J. R. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Appl Environ Microbiol**, [United States], v. 73, n. 16, p. 5261-5267, Aug. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.00062-07>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1950982/>. Acesso em: 22 fev. 2023.

WANG, Z. *et al.* Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. **Nature**, [United Kingdom], v. 472, n. 7341, p. 57-63, Apr. 07 2011. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature09922>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature09922#citeas>. Acesso em: 22 fev. 2023.

WANG, Z. W. *et al.* *Helicobacter pylori* infection contributes to high risk of ischemic stroke: evidence from a meta-analysis. **J Neurol**, [s. l.], v. 259, n. 12, p. 2527-2537, Dec. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00415-012-6558-7>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00415-012-6558-7>. Acesso em: 22 fev. 2023.

WEHKAMP, J. *et al.* Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, [United States], v. 102, n. 50, p. 18129-18134, Dec. 13 2005. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0505256102>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1306791/>. Acesso em: 22 fev. 2023.

WEN, L. *et al.* Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. **Nature**, [London], v. 455, n. 7216, p. 1109-1113, Oct. 23 2008. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature07336>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2574766/>. Acesso em: 22 fev. 2023.

WRIGHT, E. K. *et al.* Recent advances in characterizing the gastrointestinal microbiome in Crohn's disease: a systematic review. **Inflamm Bowel Dis**, [United States], v. 21, n. 6, p. 1219-1228, Jun 2015. DOI:

<https://doi.org/10.1097/mib.0000000000000382>. Disponível em:  
<https://academic.oup.com/ibdjournal/article/21/6/1219/4579284?login=false>. Acesso em: 22 fev. 2023.

WYATT, J. *et al.* Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. **Lancet**, [London], v. 341, n. 8858, p. 1437-1439, June 5 1993. DOI: [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)90882-h](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)90882-h). Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PII0140-6736\(93\)90882-H/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PII0140-6736(93)90882-H/fulltext). Acesso em: 22 fev. 2023.

XAVIER, R. J.; PODOLSKY, D. K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**, [London], v. 448, n. 7152, p. 427-434, July 26 2007. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature06005>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature06005>. Acesso em: 22 fev. 2023.

YACYSHYN, B. R.; MEDDINGS, J. B. CD45RO expression on circulating CD19+ B cells in Crohn's disease correlates with intestinal permeability. **Gastroenterology**, [United States], v. 108, n. 1, p. 132-137, Jan. 1995. DOI: [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(95\)90017-9](https://doi.org/10.1016/0016-5085(95)90017-9). Disponível em: [https://www.gastrojournal.org/article/0016-5085\(95\)90017-9/pdf?referrer=https%3A%2F%2Fpubmed.ncbi.nlm.nih.gov%2F](https://www.gastrojournal.org/article/0016-5085(95)90017-9/pdf?referrer=https%3A%2F%2Fpubmed.ncbi.nlm.nih.gov%2F). Acesso em: 22 fev. 2023.

YANG, J. *et al.* Correlation between the severity of periodontitis and coronary artery stenosis in a Chinese population. **Aust Dent J**, [Sydney], v. 58, n. 3, p. 333-338, Sep 2013. DOI: <https://doi.org/10.1111/adj.12087>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/adj.12087>. Acesso em: 22 fev. 2023.

YERGEAU, E. *et al.* Microbial expression profiles in the rhizosphere of willows depend on soil contamination. **The ISME journal**, [London], v. 8, n. 2, p. 344-358, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.163>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ismej2013163>. Acesso em: 22 fev. 2023.

ZEISSIG, S. *et al.* Butyrate induces intestinal sodium absorption via Sp3-mediated transcriptional up-regulation of epithelial sodium channels. **Gastroenterology**, [United States], v. 132, n. 1, p. 236-248, Jan. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.10.033>. Disponível em: <https://www.gastrojournal.org/action/showPdf?pii=S0016-5085%2806%2902267-0>. Acesso em: 22 fev. 2023.

## ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
FACULDADE DE MEDICINA  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO FRAGA FILHO  
SERVIÇO DE GASTROENTEROLOGIA



### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Nome do Paciente: \_\_\_\_\_

Titulo do projeto: **“A importância da presença de microrganismos no sangue de pacientes com doenças inflamatórias intestinais”**

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa realizada pelo Hospital Clementino Fraga Filho da UFRJ. Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Clementino Fraga Filho da UFRJ. A causa das doenças inflamatórias intestinais ainda não é conhecida, mas atualmente acredita-se que os micróbios intestinais tenham uma participação importante. Esses micróbios estão alterados no intestino dos pacientes, e talvez possam passar para o sangue. Por este motivo, você está sendo convidado a participar deste estudo, que tem por objetivo analisar os micróbios das fezes e ver se eles também estão presentes no sangue.

Sua participação é inteiramente voluntária, isto é, você pode optar por não participar ou se retirar a qualquer momento do estudo. Embora não haja garantia de qualquer benefício pessoal, a sua participação na pesquisa certamente ajudará para o avanço do conhecimento científico nesta área. É importante que você saiba que os cuidados e tratamentos clínicos serão realizados normalmente, não havendo nenhum prejuízo para o seu caso. Caso concorde em participar da pesquisa, o seu consentimento será obtido no momento do atendimento no ambulatório ao qual você pertence. Mas a sua decisão não precisa ser imediata. Ao ser convidado, você deverá ler este documento com calma, consultando, se necessário, seus familiares ou outras pessoas que possam ajudá-lo na tomada de decisão. Entretanto, você só será convidado se estiver em acompanhamento regular, com exames em dia, solicitados pelo seu médico, dentro da rotina de exames do Serviço onde você é acompanhado. O resultado do exame oferecido nesta pesquisa será usado para comparar com os resultados dos exames de rotina e sua avaliação clínica.

Sua participação neste estudo consiste em doar uma amostra de fezes e uma pequena amostra de sangue, em duas ocasiões com intervalo de 5 a 7 meses. Você deverá autorizar o depósito, o armazenamento e a utilização do material de sangue e fezes, para análise posterior, além da utilização de dados clínicos, de exames laboratoriais, de exames de imagem (tomografia computadorizada ou ressonância magnética), de endoscopia intestinal (também chamada de colonoscopia), e de biópsias, que constam de seu prontuário. O sangue será colhido de uma veia do braço, na ocasião da assinatura deste termo de consentimento.

#### Riscos/Desconfortos

A pesquisa envolve a avaliação clínica e os exames laboratoriais a serem realizados no sangue e em amostra de fezes. A coleta de sangue é muito simples, e é feita em veia do braço, tal como para outra coleta de exames de rotina. Entretanto, pode haver pequeno desconforto no local da introdução da agulha e, raramente, pode acontecer pequeno sangramento ou surgir pequena mancha roxa no local. De toda maneira, em caso de danos, você receberá assistência (integral e imediata), de forma gratuita. Além disso, você poderá requerer indenização por conta de danos e até de ressarcimento de gastos decorrentes da pesquisa, inclusive para seus acompanhantes.

#### Confidencialidade

As informações contidas em sua ficha clínica ou prontuário serão guardadas pelos médicos envolvidos no estudo e serão manuseadas de forma confidencial. Nenhum paciente será identificado no trabalho que resultar dessa pesquisa. Entretanto, você poderá ter acesso aos resultados dos exames realizados durante o estudo.

#### Benefícios





UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
FACULDADE DE MEDICINA  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO FRAGA FILHO  
SERVIÇO DE GASTROENTEROLOGIA



Os dados fornecidos ao projeto de pesquisa poderão contribuir para um maior conhecimento sobre a doença inflamatória intestinal e na prevenção do câncer de intestino. Isso pode melhorar o tratamento de pessoas com a mesma condição que você.

#### Alternativas

Se você não quiser participar do estudo ou desejar sair do projeto durante o seu andamento, sua situação presente ou futura como paciente não será afetada.

#### Custos

Você não será cobrado(a) pela participação no estudo. Os custos dos exames serão cobertos pelo estudo.

#### Reembolso

Caso necessário, você receberá ressarcimento de quaisquer despesas suas e de seus acompanhantes, tais como transporte e alimentação, para a participação no estudo, com recursos pessoais do pesquisador responsável.

#### Questões

Caso necessite de qualquer esclarecimento adicional ou tenha alguma dúvida, você poderá entrar em contato com o pesquisador: Dr. Heitor Siffert Pereira de Souza, no endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco 255, Serviço de Gastroenterologia, 4º andar – tel: (21) 3938-2326 ou (21) 98840-6475.

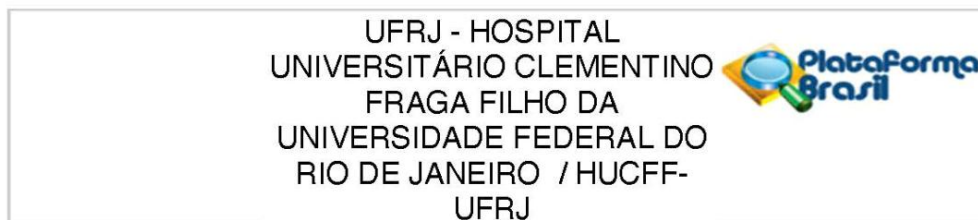
O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) que aprovou esse estudo também poderá esclarecer suas dúvidas: Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) Hospital Clementino Fraga Filho, CEP/HUCFF/FM/UFRJ, 7o andar, ala E, de segunda à sexta-feira das 8:00 às 16:00. Tel.: 3938-2480 e FAX: 3938-2481; email: [cep@hucff.ufrj.br](mailto:cep@hucff.ufrj.br). O Comitê de Ética em Pesquisa é um órgão que controla as questões éticas das pesquisas na instituição e tem como uma das principais funções proteger os participantes da pesquisa de qualquer problema.

#### A PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA É VOLUNTÁRIA

Li e concordo em participar da pesquisa. Você que é participante de pesquisa tem direito a uma via do TCLE assinada e rubricada em todas as páginas.

COMPLETE OS ITENS ABAIXO COM A SUA ASSINATURA E DATA	
<b>Consentimento do paciente adulto</b>	
Eu li e compreendi as explicações sobre este estudo e me foi dada a chance de discutir e fazer perguntas. Forneço aqui o meu consentimento para participação no protocolo de estudo.	
_____	____/____/____
Assinatura do participante de pesquisa/responsável legal	Data (DD/MM/AAAA)
<b>ESTE DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO FOI APROVADO PARA USO A PARTIR DE:</b>	
____/____/____	
_____	____/____/____
Assinatura do pesquisador	Data (DD/MM/AAAA)

## ANEXO B – Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** A importância da presença de microrganismos no sangue de pacientes com doenças inflamatórias intestinais.

**Pesquisador:** Heitor Siffert Pereira de Souza

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 29758920.0.0000.5257

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**Patrocinador Principal:** FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.983.502

#### Apresentação do Projeto:

Protocolo 056-20. Respostas recebidas em 30.3.2020.

As informações colocadas nos campos denominados "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo intitulado "PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1511936.pdf", postado em 30/03/2020.

#### Introdução:

As doenças inflamatórias intestinais (DIIs), incluindo a doença de Crohn e a retocolite ulcerativa (RCU) consistem de condições crônicas caracterizadas por manifestações persistentes e recidivantes de origem multifatorial. Embora os mecanismos patogênicos exatos responsáveis pelo desenvolvimento das DIIs continuem relativamente obscuros, a hipótese atual mais aceita é a de que essas doenças resultem da interação de fatores ambientais, predisposição genética, e respostas imunitárias inapropriadas. Tais interações formam uma rede patológica complexa, fazendo das DIIs um modelo conveniente e aplicável para a pesquisa de interações hospedeiro-

<b>Endereço:</b> Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255, 7º andar, Ala E
<b>Bairro:</b> Cidade Universitária <b>CEP:</b> 21.941-913
<b>UF:</b> RJ <b>Município:</b> RIO DE JANEIRO
<b>Telefone:</b> (21)3938-2480 <b>Fax:</b> (21)3938-2481 <b>E-mail:</b> cep@hucff.ufrj.br

UFRJ - HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO  
FRAGA FILHO DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO DE JANEIRO / HUCFF-  
UFRJ



Continuação do Parecer: 3 983.502

Biológico / Biorepositório / Biobanco	2020_Declaracao_materiais_DII_Microbioma.pdf	30/03/2020 19:02:24	Heitor Siffert Pereira de Souza	Aceito
Outros	2020_Declaracao_Guarda_de_Material_DII_Microbioma.pdf	30/03/2020 18:55:25	Heitor Siffert Pereira de Souza	Aceito
Outros	2020_Declaracao_resultados_DII_Microbioma.pdf	30/03/2020 18:47:09	Heitor Siffert Pereira de Souza	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	2020_Carta_Anuencia_CEP_DII_Microbioma_HUCFF.doc	30/03/2020 18:41:59	Heitor Siffert Pereira de Souza	Aceito
Orçamento	2020_DII_Sangue_Microbioma_Orcamento_Mar_28.doc	30/03/2020 18:40:44	Heitor Siffert Pereira de Souza	Aceito
Outros	2020_Anuencia_LabMops_Luciana_Pizzati_Mar_28.pdf	30/03/2020 18:39:06	Heitor Siffert Pereira de Souza	Aceito
Outros	2020_Carta_Anuencia_CEP_DII_Microbioma_Ambulatorio_assinatura.pdf	30/03/2020 18:38:31	Heitor Siffert Pereira de Souza	Aceito
Outros	2020_Carta_Anuencia_CEP_DII_Microbioma_LabMulti_assinatura.pdf	30/03/2020 18:37:52	Heitor Siffert Pereira de Souza	Aceito
Outros	2020_Carta_Anuencia_CEP_DII_Microbioma_Gastro_assinatura.pdf	30/03/2020 18:36:55	Heitor Siffert Pereira de Souza	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	2020_DII_Sangue_Microbioma_27_Mar.doc	30/03/2020 18:35:58	Heitor Siffert Pereira de Souza	Aceito
Cronograma	2020_DII_Sangue_Microbioma_Cronograma_Mar_28.doc	30/03/2020 18:35:35	Heitor Siffert Pereira de Souza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	2020_DII_Sangue_Microbioma_TCLE_Controlo_Mar_28.doc	30/03/2020 18:32:47	Heitor Siffert Pereira de Souza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	2020_DII_Sangue_Microbioma_TCLE_Mar_28.doc	30/03/2020 18:32:25	Heitor Siffert Pereira de Souza	Aceito
Outros	DII_Microbioma_Folhaderosto_Fez_2020.pdf	05/03/2020 16:43:28	Heitor Siffert Pereira de Souza	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto_5_fev_2020.pdf	05/03/2020 16:42:32	Heitor Siffert Pereira de Souza	Aceito
Declaração do Patrocinador	DII_Sangue_Microbioma_Outorga_Apoio_Pesq_Clinica_2017_Faperj.pdf	14/02/2020 18:37:03	Heitor Siffert Pereira de Souza	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Endereço:** Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255, 7º andar, Ala E  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 21.941-913  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3938-2480 **Fax:** (21)3938-2481 **E-mail:** cep@hucff.ufrj.br

UFRJ - HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO  
FRAGA FILHO DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO DE JANEIRO / HUCFF-  
UFRJ



Continuação do Parecer: 3.983.502

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RIO DE JANEIRO, 22 de Abril de 2020

---

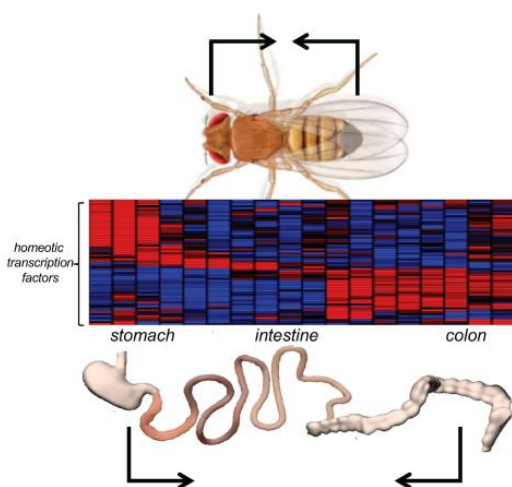
**Assinado por:**

**Carlos Alberto Guimarães**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255, 7º andar, Ala E  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 21.941-913  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3938-2480 **Fax:** (21)3938-2481 **E-mail:** cep@hucff.ufrj.br



## ANEXO C – Trabalho aprovado na *Digestive Disease Week (DDW)*



420

### INTEGRATING hPSC-DERIVED 3D ORGANOID AND MOUSE GENETICS TO DEFINE A NOVEL ROLE OF YAP IN ESOPHAGEAL DEVELOPMENT

Dominique Bailey, Yongchun Zhang, Benjamin J. van Soldt, Ming Jiang, Wellington V. Cardoso, Jianwen Que

**Background:** The development of the esophagus results from the balanced coordination of esophageal progenitor cell (EPC) proliferation and differentiation. Much remains unknown about the molecular mechanisms related to the development of the esophagus. YAP is an important regulator of proliferation in several endodermal derived organs; however, the role of YAP in esophageal development remains to be elucidated. We hypothesize that YAP is required for the proliferation and stratification of EPCs in the developing esophagus. To address this we used genetic mouse models and 3D human pluripotent stem cell (hPSC)-derived esophageal organoids to evaluate the role of YAP in esophageal development. **Methods:** We deleted *Yap* using *Shh-Cre*; *Yap<sup>loxP/loxP</sup>* mutants to examine the role of *Yap* deletion in the developing mouse esophagus. To investigate the effect of *Yap* overexpression we generated *Shh-Cre*; *Yap<sup>loxP/loxP</sup>; R26<sup>opSSA</sup>* mutants in which endogenous *Yap* is replaced by constitutively nuclear *Yap*. We utilized our previously established protocol to generate EPCs from human pluripotent stem cells (hPSCs) that are able to self-renew and differentiate into a stratified squamous epithelium in 3D organoid culture. We treated hPSCs-derived EPCs with the YAP inhibitor Verteporfin to examine its effects on proliferation and differentiation of EPCs. **Results:** Deletion of *Yap* in the mouse esophagus reduces the number of epithelial layers and lumen size. Reduction of the numbers of p63<sup>+</sup>, pHH3<sup>+</sup> and Edu<sup>+</sup> EPCs suggests that EPC proliferation is affected by *Yap* loss. Deletion of *Yap* affects stratification, as seen in the reduction in the thickness of the Krt13<sup>+</sup> epithelium and reduction of Krt8<sup>+</sup> suprabasal cells. *Yap* overexpression causes a hyperplastic phenotype of the epithelium in which the thickness of basal cell layers (p63<sup>+</sup> Krt5<sup>+</sup>) and differentiated cell layers (Krt13<sup>+</sup>) are increased. Additionally, the number of p63<sup>+</sup> basal cells and pHH3<sup>+</sup> proliferating epithelial cells are increased. YAP inhibition with Verteporfin reduces the number and size of esophageal organoids. Consistently, YAP knockdown by siRNA reduces the numbers proliferation (Ki67<sup>+</sup>) of EPCs and stratification of hPSC-derived esophageal organoids. **Conclusions:** Our results show that YAP plays a conserved role in the development of the mouse and human esophageal epithelium by regulating EPC proliferation. Notably, YAP has been shown to be increased in dysplastic esophageal epithelium and esophageal squamous cell carcinoma. Future directions include evaluating whether YAP can act as an oncogene to transform these EPCs at early stages of these malignancies. **Keywords:** esophagus, basal progenitor cells, YAP, human embryonic stem cells, 3D organoids, development, proliferation, differentiation

421

### LRIG3 RESTRICTS THE SIZE OF THE COLONIC STEM CELL NICHE

Janelle M. Stevenson, Ryan Sayegh, Natalie Pedicino, Natalie Pellitier, Timothy W. Wheeler, Robert J. Coffey, Annie E. Zempfer

**Background and Aims:** The colonic epithelium is a dynamic tissue that regenerates weekly supported by a heterogeneous population of cells. This continual and dynamic process of proliferation and migration to the top of the crypt requires a high degree of regulation from the stem cells (Lrig1<sup>+</sup>) and deep crypt secretory cells (Reg4<sup>+</sup>) in the stem cell niche. The aim of this study was to evaluate the molecular mechanisms by which Lrig3, a previously uncharacterized protein in the colonic crypt, may be involved in colonic crypt homeostasis, specifically stem cell niche expansion. **Methods:** As Lrig3 is previously uncharacterized in the colon, we first compared wildtype crypts to a novel *Lrig3<sup>-/-</sup>* mouse line that has exons 4-12 (of 19) excised resulting in a stop codon and a truncated protein. We used both RNAscope in situ hybridization and immunofluorescence (IF) analysis to determine Lrig3 expression patterns. To quantify molecular changes in protein expression of known colonic epithelial regulatory pathways in *Lrig3<sup>-/-</sup>* mice, we used morphometric analysis of H&E staining, in situ hybridization, western blot and IF analysis. **Results:** RNA and protein expression patterns show Lrig3 expressed throughout the colonic crypt including stem,

progenitor, and differentiated cell types (n=6n=8). Quantification of total colon length showed that despite a smaller body size, the colons are significantly longer from cecum to rectum in the *Lrig3<sup>-/-</sup>* mice (n=21; p=0.0159). The colonic mucosa was measured, and quantified, to find *Lrig3<sup>-/-</sup>* mice have a significantly greater mucosal area (n=9;p=0.00489) through a significant increase in total number of cells per crypt (n=8; p=0.0136). As the mucosal area of *Lrig3<sup>-/-</sup>* mice is expanded, we analyzed the expression of stem cell marker Lrig1 in *Lrig3<sup>-/-</sup>* mice. We found a significant increase in Lrig1 protein expression, where Lrig1 is expressed much higher in the crypt than in WT (n=9; p<0.001). To analyze potential stem cell niche expansion, deep crypt secretory marker Reg4<sup>+</sup> was quantified and found to have significantly more Reg4<sup>+</sup> cells in the lower portion of the crypt but not the upper portion (n=15; p<0.0001,p=0.07). **Conclusion:** Our study demonstrates that in the absence of Lrig3, niche stem cells and deep crypt secretory cells expand outside of the crypt base. Currently, this expansion is limited to the stem cell niche and not cells in the transit-amplifying zone and differentiated cells at the top of the crypt, indicating that the loss of Lrig3 leads to a stem cell niche expansion in colonic crypts. Along with expansion of the crypt stem cell niche we see an overall increase in total number of cells per crypt, mucosal area, and colon length; in an animal that is significantly smaller than WT. In summary, our study provides insight into regulation of the stem cell niche and the morphological changes that accompany this dysregulation.

422

### A DORMANT BLOOD MICROBIOME MAY UNDERLIE THE PERSISTENT AND RELAPSING INFLAMMATION OF CROHN'S DISEASE

Fernando M. Castro, Gabriella Poralla, Aline Cristina A. Moreira-Souza, Katia S. Farias, Patricia T. Santana, Siane Rosas, Morgana T. Castelo-Branco, Luciana Pizzatti, Heitor S. de Souza

**Background and aims:** Gut dysbiosis has been shown to affect intestinal epithelial barrier function, thereby providing an access of microorganisms into the body, resulting in *atopobiosis*, i.e. the appearance of members of the gut microbiome in the wrong place, including the blood. Therefore, we hypothesized that a viable aberrant blood microbiota can reflect gut dysbiosis, and might disrupt systemic homeostasis playing a role in IBD development and progression. **Methods:** Blood and fecal samples were prospectively collected from outpatients with Crohn's disease (CD), and healthy controls, after an overnight fast. Blood aliquots were separated and immediately processed for nucleic acids isolation for 16S rRNA gene sequencing, transmission electron microscopy (TEM), live and dead staining of blood smears analyzed at the confocal microscopy, and measurement of circulating cytokines and lipopolysaccharide, by ELISA. Analyses were performed in the context of clinical activity, endoscopic index of severity, magnetic resonance enterography, plasma C-reactive protein, and fecal calprotectin, and aerobic and anaerobic cultivation of blood. **Results:** In this preliminary study, our results confirmed the existence of a dormant blood microbiome, considering that molecular analysis identified microorganisms, whereas blood cultures were negative in all individuals studied (CD, n=12; controls, n=7). Here, blood microbiome phylum compositions appear to concur with previous findings in buffy coat samples from patients with liver diseases as well as healthy individuals, but differed from the gut microbiome, where Bacteroidetes and Firmicutes predominate. Although comparative analysis matching fecal samples of the same individuals is yet to be performed, results from the blood suggest that most microbial communities are probably originated in the gut. In contrast to the expected lower alpha-diversity of fecal samples from CD patients, microbial analysis of blood samples revealed similarities with controls. However, a pronounced difference in beta-diversity was demonstrated. In the blood, relative abundances of Proteobacteria and of Bacteroidetes were detected in patients with CD (more so in active disease, ileal localization, and inflammatory behavior), while Actinobacteria predominated among the controls. Confocal analysis revealed that most microorganisms are viable. Detection of structures compatible with microorganisms was further corroborated by TEM, identifying predominantly isolated microorganisms in controls, and complex aggregates in CD, in the vicinity of red cells. **Conclusion:** In CD, a dormant blood microbiome may reflect gut dysbiosis and contribute as a potential biomarker for the identification of specific disease phenotypes, hopefully anticipating disease relapses and bringing new insights into strategies for microbiome-targeted therapeutic interventions.

423

### DYNAMICS OF INTESTINAL INFLAMMATION AND MICROBIAL DYSBIOSIS IN PREGNANT WOMEN WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASE AND THEIR INFANTS

Eun Soo Kim, Leonid Tarassishin, Caroline Eisele, Amélie Barré, Anne Thjomoe, Einar Mark, Marla C Dubinsky, Joanne Stone, N Nair, Anketse Debebe, Kelly Hawkins, Alexa Rendon, Joao Sabino, Joana Torres, Jean Frederic Colombel, Inga Peter, Jianzhong Hu

**Background:** Inflammatory bowel disease (IBD) often affects women during their reproductive years; however, the effect of pregnancy on disease course remains poorly understood. We aimed to assess intestinal inflammation in IBD patients compared to controls as measured by fecal calprotectin (FC). We also investigated whether maternal IBD diagnosis was associated with altered FC in the offspring and if there were particular bacterial taxa that correlated with FC levels. **Methods:** Pregnant women with or without IBD and their infants were prospectively enrolled in the MECONIUM (Exploring MEchanisms Of disease traNsmission In Utero through the Microbiome) study between March 2015 and August 2018. FC levels at each trimester of pregnancy and in babies throughout the first 3 years of life were measured using a quantitative enzyme immunoassay (CALPRO AS, Norway). Multivariate regression analysis was applied to investigate FC levels. Stool microbiota composition in the maternal and baby stool was assessed using 16s rRNA sequencing. **Results:** Overall, 614 fecal samples from 341 mothers (90 IBD, 251 control) and 1,005 fecal samples from 290 infants (born to 76 mothers with and 214 without IBD) were analyzed. FC levels in pregnant women with IBD were substantially higher than in control pregnant women (p<0.001 at every trimester) regardless of IBD type (Crohn's Disease vs. ulcerative colitis). In IBD mothers, FC levels showed a decline during pregnancy (µg/g, median (interquartile range)); 1<sup>st</sup> trimester