



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Mikaell Alexandre Gouvea Faria

**Análise da microbiota intestinal em paciente com
doença de Crohn pré e pós-transplante de medula
óssea**

São José do Rio Preto
2019

Mikaell Alexandre Gouvea Faria

**Análise da microbiota intestinal em paciente com
doença de Crohn pré e pós-transplante de medula
óssea**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de São José do Rio Preto para
obtenção do Título de Mestre no
Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde, Eixo Temático:
Medicina Interna.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Casella

**São José do Rio Preto
2019**

Gouvea Faria, Mikael Alexandre

Análise da microbiota intestinal em paciente com doença de Crohn pré e pós-transplante de medula óssea/Mikael Alexandre Gouvea Faria.

São José do Rio Preto; 2019.

55p.

Dissertação (Mestrado)

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP

Eixo Temático: Medicina Interna

Orientador: Prof. Dr. Tiago Casella

1. Doença de Crohn; 2. Transplante de Células Precursoras Hematopoiéticas; 3. Microbiota; 4. Microbiota Intestinal.

MIKAELL ALEXANDRE GOUVEA FARIA

Análise da microbiota intestinal em paciente com
doença de Crohn pré e pós-transplante de medula
óssea

BANCA EXAMINADORA
TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: _____

Examinador: _____

Examinador: _____

Examinador: _____

Examinador: _____

Suplentes: _____

São José do Rio Preto, ____/____/____.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	i
AGRADECIMENTOS	ii
EPIÍGRAFE	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Microbiota Intestinal e Doença de Crohn.....	5
1.2 TCPH no tratamento da doença de Crohn.....	7
2 METODOLOGIA	11
2.1 Modelo do Estudo.....	11
2.2 Ética.....	11
2.3 Infraestrutura e procedimentos.....	11
2.4 Intervenções clínicas e análises.....	11
2.4.1 Avaliação clínica.....	11
2.4.2 Identificação de microbiota fecal.....	12
2.4.3 Descrição clínica do caso.....	13
2.5 Análise de dados.....	15
3 RESULTADOS	16
4 DISCUSSÃO	24
5 LIMITAÇÕES	32
6 CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	34
ANEXOS	39

DEDICATÓRIA

Dedico este a Deus por ter permitido que esses caminhos fossem triados.

À meus pais Francisco e Maria Helena por terem me conduzido até aqui, pela segurança, amor e dedicação por mim.

À minha esposa Daniela e às nossas filhas Maria Luísa e Maria Cecília que abriram mão do pouco tempo que nos últimos meses poderia ser de descanso na companhia delas para que este estudo fosse realizado e me apoiaram diariamente. Obrigado por todo entendimento nesse processo, pois fiz tudo isso pra vocês.

E ao sogro e sogra Antônio e Hilda por todo o apoio e encorajamento para o desenvolvimento da presente dissertação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, a paciente que participou desde estudo pois as descobertas relacionadas a microbiota poderão ajudar no futuro outros pacientes e que voluntariamente doou seu tempo e sua microbiota para esse estudo sem os quais não seria possível realizar nada.

Agradeço também a colegas envolvidos na TCPH, e aos colegas de trabalho da Kaiser Clínica pela paciência. E ainda agradeço as colegas de trabalho-funcionárias da clinica que me auxiliaram em todos os momentos.

Gostaria de agradecer também a Dra Renata Froes que me ajudou em outras atividades do Gediib enquanto eu finalizava este projeto.

Também gostaria de agradecer imensamente ao Dr Tiago Casella e à Dra Mara Nogueira pela orientação, paciência, e por acreditarem em mim durante essa jornada. E que sem os quais esse projeto não teria sido viabilizado.

Agradeço imensamente a Kaiser Clínica e Hospital, em especial ao Dr. Roberto Luiz Kaiser Júnior, por todo apoio e segurança para o desenvolvimento da presente dissertação. Agradeço também toda equipe de médicos da Kaiser Clínica e Hospital, bem como a todos os funcionários que muito me ajudaram.

Agradeço ao Prof. Dr. Idiberto José Zotarelli Filho por todo o apoio científico e na interpretação da análise estatística do presente trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Milton Arthur Ruiz pelo acompanhamento do estudo e por me ajudar com os dados da paciente do presente estudo.

“Estamos na situação de uma criancinha que entra em uma imensa biblioteca, repleta de livros em muitas línguas. A criança sabe que alguém deve ter escrito aqueles livros, mas não sabe como. Não compreende as línguas em que foram escritos. Tem uma pálida suspeita de que a disposição dos livros obedece a uma ordem misteriosa, mas não sabe qual ela é” (Albert Einstein).

Assim, estamos começando vislumbrar a relação da microbiota e das patologias....

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração das principais áreas intestinais acometidas de inflamação na doença de Crohn.....	3
Figura 2. Fatores genéticos e epigenéticos que podem causar ou intensificar a doença de Crohn.....	6
Figura 3. Etapas do processo de identificação da microbiota fecal.....	15
Figura 4. Principais grupos taxonômicos encontrados antes e após o procedimento de transplante de células precursoras hematopoiéticas da medula óssea.....	21
Figura 5. Análise de correlação não-paramétrica entre cada grupo taxonômico, antes e após o procedimento de transplante de células precursoras hematopoiéticas da medula óssea, com IC95%, e $p < 0,05$ com diferença estatística.....	22
Figura 6. Imagens colonoscópicas mostrando a inflamação do cólon na doença de Crohn (A e B) em comparação com as imagens após nove meses de TCPH (C e D).....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Critérios utilizados no índice de atividade inflamatória da doença de Crohn.....	12
Tabela 2. Dados gerais taxonômicos da microbiota intestinal antes e após TCPH. Intervalo de confiança de 95%, sendo $p < 0,05$ com diferença estatística.....	16
Tabela 3. Resultados dos indicadores de Firmicutes e Bacteroidetes.....	17
Tabela 4. Principais resultados de classificação de <i>Filo</i> . Intervalo de confiança de 95%, sendo $p < 0,05$ com diferença estatística.....	17
Tabela 5. Principais resultados de classificação de <i>Classe</i> . Intervalo de confiança de 95%, sendo $p < 0,05$ com diferença estatística.....	18
Tabela 6. Principais resultados de classificação de <i>Ordem</i> . Intervalo de confiança de 95%, sendo $p < 0,05$ com diferença estatística.....	18
Tabela 7. Principais resultados de classificação de <i>Família</i> . Intervalo de confiança de 95%, sendo $p < 0,05$ com diferença estatística.....	19
Tabela 8. Principais resultados de classificação de <i>Gênero</i> . Intervalo de confiança de 95%, sendo $p < 0,05$ com diferença estatística.....	19
Tabela 9. Principais resultados de classificação de <i>Espécie</i> . Intervalo de confiança de 95%, sendo $p < 0,05$ com diferença estatística.....	20
Tabela 10. Dados do índice de atividade inflamatória da doença de Crohn (IADC) antes e após o TCPH, com tempo avaliado em dias.....	20

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DC – doença de Crohn

DII – doença inflamatória intestinal

Th1, Th17 – Células T-helper e citocinas inflamatórias

TMO – transplante de medula óssea

CEP –comitê de ética em pesquisa

IMC – índice de massa corporal

IADC - índice de atividade inflamatória da doença de Crohn

CVC – cateter central venoso

Cy - Ciclofosfamida

G-CSF - Fator Estimulante de Colônias Granulocitárias

CTH SP - Células tronco de Sangue Periférico

TACPH – transplante autólogo de células precursoras hematopoiéticas

TCPH – transplante de células precursoras hematopoiéticas

GATr - Globulina Antitimocítica de coelho

RESUMO

Introdução: Devido à importância da microbiota intestinal na patogênese de doenças inflamatórias intestinais, como a doença de Crohn, terapias que manipulam a microbiota têm sido investigadas, incluindo o uso de probióticos e prebióticos, com evidência variável para sua eficácia. O transplante de células tronco hematopoiéticas pode ser usado como um importante recurso de tratamento para doença de Crohn. Após o procedimento, o paciente reestabelece-se da enfermidade, como se fizesse um reinício na história da doença voltando ao estado anterior ao seu aparecimento. A microbiota pode acompanhar esta melhora, visto que é esperado um perfil durante a doença e que possa se reestabelecer após o procedimento. **Objetivo:** Foi avaliar a microbiota de uma paciente pré e pós transplante de células precursoras hematopoiéticas (TCPH), em busca de dados sobre a microbiota de paciente doente, antes do TCPH, e de paciente em remissão profunda após transplante. **Metodologia:** Para análise clínica, a identificação de bactérias do doador foi realizada antes do transplante, seguida de coleta de fezes antes do TCPH, 9 meses após o transplante. A gravidade clínica da doença de Crohn foi avaliada por IADC. Para análise molecular foi realizada a extração do DNA das fezes da paciente, seguido de clonagem da biblioteca 16S rRNA, sequenciamento de DNA e análise filogenética. Para análise de dados foram utilizados cálculos de frequência absoluta e relativa, e testes paramétricos e/ou não paramétricos considerando $p < 0,05$ para valores significantes. **Resultados:** Após o TCPH, houve mudança da microbiota intestinal da paciente do presente estudo, principalmente no aumento das bactérias dos gêneros *Bacteroides*, *Prevotella*, *Ruminococcus*, *Blautia*, *Faecalibacterium*, *Parabacteroides*, *Oscillospira*, *Veillonella* e *Eubacterium*. Além disso, o indicador importante de saúde da microbiota intestinal foi o percentual somado dos filos Firmicutes e Bacteroidetes (F+B) em relação ao total, cuja faixa normal deve situar-se entre 85% a 95%. Neste sequenciamento, o indicador F+B encontrou-se dentro da faixa desejável após a TCPH. Os resultados também contemplam que houve diferença estatística significativa entre todas as comparações taxonômicas dentro de cada nível taxonômico (“Antes” vs. “Após”), com $p < 0,05$ para dados não-paramétricos. **Conclusão:** O presente estudo demonstrou a importância da investigação da microbiota na doença de Crohn, uma vez que a etiologia exata destas doenças ainda não é totalmente compreendida. Deste modo, houve uma melhor composição da microbiota, após o TCPH gerando uma discussão se a atividade da doença leva a uma alteração de microbiota ou se a sua melhora tem relação com o resultado do procedimento ou ainda se pode manter mais estável o resultado do TCPH.

Palavras-chave: Doença de Crohn. Transplante de Células Precursoras Hematopoiéticas. Microbiota Intestinal.

ABSTRACT

Introduction: Due to the importance of intestinal microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases, such as Crohn's disease, therapies that manipulate the microbiota have been investigated, including the use of probiotics and prebiotics, with variable evidence for their efficacy. Hematopoietic stem cell transplantation can be used as an important treatment resource for Crohn's disease. After the procedure, the patient reestablishes the disease, as if the history of the disease is resumed, returning to the state before its onset. The microbiota can accompany this improvement since a profile is expected during the disease and can be reestablished after the procedure. **Objective:** The aim of this study was to evaluate the microbiota of a patient pre and post hematopoietic precursor cell transplantation (TCPH), seeking data on the microbiota of a sick patient before TCPH and a patient in deep remission after transplantation. **Methodology:** For clinical analysis, identification of donor bacteria was performed prior to transplantation, followed by stool collection prior to TCPH, 9 months after transplantation. The clinical severity of Crohn's disease was assessed by IADC. For molecular analysis, DNA extraction from the patient's stool was performed, followed by cloning of the 16S rRNA library, DNA sequencing, and phylogenetic analysis. For data analysis, absolute and relative frequency calculations were used, and parametric and / or nonparametric tests considering $p < 0.05$ for significant values. **Results:** After TCPH, there was a change in the intestinal microbiota of the patient of the present study, mainly in the increase of bacteria of the genera *Bacteroides*, *Prevotella*, *Ruminococcus*, *Blautia*, *Faecalibacterium*, *Parabacteroides*, *Oscillospira*, *Veillonella* and *Eubacterium*. In addition, the important indicator of intestinal microbiota health was the summed percentage of Firmicutes and Bacteroidetes (F + B) in relation to the total, whose normal range should be between 85% and 95%. In this sequencing, the F + B indicator was within the desirable range after TCPH. Results also include statistically significant differences between all taxonomic comparisons within each taxonomic level ("Before" vs. "After"), with $p < 0.05$ for nonparametric data. **Conclusion:** The present study demonstrated the importance of microbiota investigation in Crohn's disease, as the exact etiology of these diseases is not yet fully understood. Thus, there was a better microbiota composition after TCPH leading to a discussion of whether the disease activity leads to a microbiota change or whether its improvement is related to the outcome of the procedure or the TCPH result can be more stable.

Keywords: Crohn's Disease. Transplantation of Hematopoietic Precursor Cells. Microbiota Intestinal.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A literatura mostra a incidência bimodal de Doença de Crohn (DC) em relação à idade, afetando indivíduos de 15 a 40 anos e de 50 a 80 anos [1]. Ainda, há maior percentual em mulheres afetadas por DC quando comparado a homens [4]. A doença de Crohn é uma doença inflamatória intestinal (DII) caracterizada por inflamação crônica do intestino de caráter autoimune e etiologia incerta [2]. No entanto, há provas importantes da interação entre fatores genéticos e ambientais no desencadeamento da resposta imune por meio das células T helper (Th) Th1, Th17 e suas citocinas inflamatórias [3]. Além disso, a DC tem mostrado um aumento da sua prevalência desde a segunda metade do século XX e, apesar dos grandes avanços conquistados na compreensão dos mecanismos básicos de inflamação e patogênese, sua causa permanece desconhecida [3,4].

A etiologia exata das DII ainda é incerta [4-7], entretanto, seu aparecimento, evolução e manifestação clínica estão relacionados à interação entre fatores genéticos, com destaque às mutações no gene NOD2 (ou CARD15) e também outras três mutações principais (R 702W, G908 R e 1007 frameshift) foram descritas e ligadas ao fenótipo da doença, a microbiota intestinal e a imunorregulação da mucosa [12-17]. Em relação à clínica, pacientes com doença de Crohn apresentam acometimento focal, assimétrico e transmural de qualquer parte do tubo digestivo, da boca ao ânus [18]. Nesse contexto, diversos estudos epidemiológicos demonstram incidência e prevalência crescentes de DC, com aumento em torno de 15 vezes nas últimas décadas. A incidência atinge em torno de 5:100.000 por ano nos EUA e Europa, e a prevalência alcança cerca de 50:100.000 [18].

Um estudo na cidade de São Paulo reportou prevalência de 14,8 casos de DC por 100.000 habitantes [18]. A DC predomina em raça branca, apresentando distribuição semelhante em ambos os sexos, com idade mais frequente em adultos jovens [11,12,19,26] e prevalece em áreas urbanas em relação às rurais e em classes econômicas mais altas, em fumantes e parentes de primeiro grau de indivíduos acometidos [22].

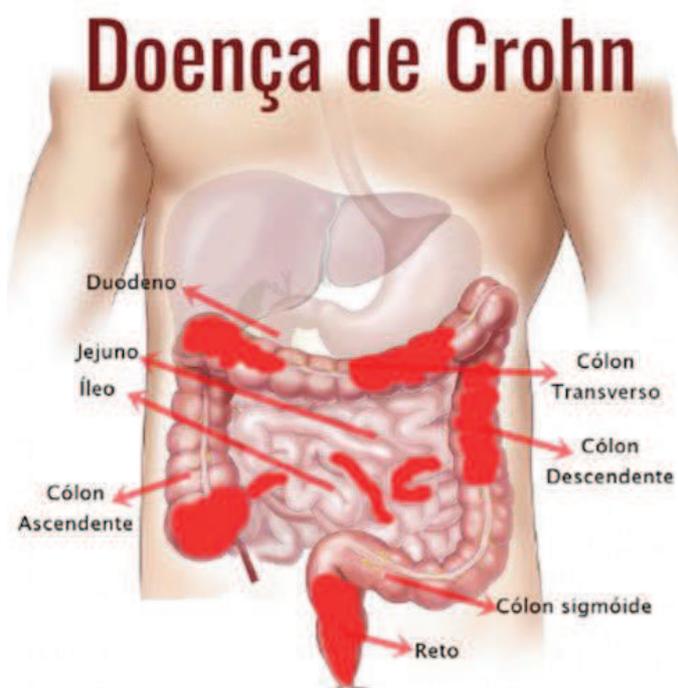
Dessa forma, no Brasil, Santos et al. (2013) [22] abordaram somente pacientes previamente diagnosticados com a Doença de Crohn, e a prevalência encontrada com relação à idade média dos pacientes foi de 40 anos, com uma preponderância do sexo feminino em virtude da maior predisposição genética e também à oscilação do humor depressivo e ansioso. Esses achados corroboram com um estudo da Califórnia (EUA) em que, dentre os pacientes com DC, de 45,0% a 61,8% eram do sexo feminino [21]. Entretanto, Cosnes et al. (2011) [23] reportaram que, em países com alta incidência de DC na Europa e na América do Norte, a prevalência da doença tem aumentado entre os homens, sendo semelhante, ou mesmo superior, à incidência entre as mulheres. O mesmo ocorreu no estudo brasileiro de Hardt et al. (2012) [24], em que foi verificada maior prevalência de sexo masculino (53%).

A característica mais marcante da DC é o acometimento transmural do trato gastrointestinal, que pode afetar todas as camadas, da mucosa à serosa, e que apresenta um caráter descontínuo das lesões devido à áreas de mucosa preservada em meio às de atividade inflamatória [25-28]. Dessa forma, podem ser observadas erosões discretas, edema, friabilidade, enantema, sendo mais característica a presença de úlceras [28-31]. Todas essas lesões podem sofrer processo inflamatório e, dessa forma, levar à desnutrição do paciente, não só pela velocidade com que a doença evolui, mas também por problemas

como anorexia, má absorção de nutrientes, estresse oxidativo, necessidades nutricionais aumentadas e uso de medicamentos [32].

As primeiras manifestações da DC consistem em diarreia e dor abdominal tipo cólica; podem, ainda, aparecer febre, perda de apetite e perda de peso [15]. Muitas vezes, pacientes podem apresentar áreas de tumefação, principalmente, do lado direito. Fístulas podem aparecer nas mais diversas áreas do intestino, mas, principalmente, na região anorretal. Locais de acometimento mais frequentes são os intestinos delgado e grosso, de acordo com a Figura 1 abaixo. Manifestações perianais podem ocorrer em mais de 50,0% dos pacientes [28]. Manifestações extraintestinais associadas ou isoladas podem ocorrer, e atingem, mais frequentemente, pele, articulações, olhos, fígado e trato urinário [14,16]. Apresentam-se sob três formas principais: inflamatória, fistulosa e fibroestenossante [18].

Figura 1. Ilustração das principais áreas intestinais acometidas de inflamação na doença de Crohn.



Fonte: He et al., 2017.

O tratamento da DC pode ser clínico e/ou cirúrgico [19]. A terapia medicamentosa tem como objetivo deixar a DC em remissão. Algumas classes de medicações utilizadas incluem corticoides, aminossalicilatos, imunossuppressores, antibióticos e terapia biológica. Entretanto, alguns pacientes tornam-se refratários ao tratamento, podendo apresentar efeitos adversos graves, sendo que muitos necessitam de cirurgia [7,20].

Apesar disso, estudos recentes evidenciam que a incidência da DC vem aumentando em avaliações realizadas na população infantil, de maneira lenta e progressiva [18,33,34]. Estes estudos demonstram que a doença, que raramente inicia antes dos dez anos, em geral começa entre os doze e dezoito anos de idade, o que faz com que seu pico de incidência fique ao redor dos vinte anos [35,37].

Cerca de 70,0 a 80,0% dos pacientes perdem peso durante a doença, levando a algum grau de comprometimento nutricional, e em torno de 23,0% dos pacientes ambulatoriais e 85,0% dos hospitalizados com predominância de desnutrição [30, 38]. Esse déficit nutricional está associado ao retardo da melhora clínica e da recuperação pós-operatória, bem como à mortalidade e aos crescentes casos de complicações cirúrgicas [38].

Devido à importância da microbiota intestinal na patogênese de doenças inflamatórias intestinais como DC [21], terapias que manipulam a microbiota têm sido investigadas, incluindo uso de probióticos e prebióticos, com evidência variável para sua eficácia [6,17]. Outra modalidade de tratamento da DC inclui o transplante de microbiota fecal, que consiste na transferência de microbiota de um doador saudável, via infusão de suspensão líquida de fezes, para restaurar a microbiota intestinal de um indivíduo doente [8,15].

Além disso, importantes estudos analisaram a remissão parcial ou completa da DC por meio do transplante de células progenitoras hematopoiéticas (TCPH) [56-58]. Entretanto, torna-se imperativo conhecer também a interferência do TCPH na ativação, manifestação e homeostase da microbiota intestinal nos pacientes com DC, haja vista que o TCPH pode substituir o sistema linfo-hematopoiético anormal [59-61]. O objetivo do TCPH é gerar o reinício do sistema imunológico, fazendo com o que o organismo pare de produzir anticorpos que atacam as próprias células [64].

1.1 Microbiota Intestinal e Doença de Crohn

Na microbiota humana, existe uma relação de simbiose entre o organismo humano e os microrganismos [1,2]. O organismo de um adulto sustenta, de forma saudável, uma comunidade de microrganismos, incluindo bactérias, vírus e fungos e os elementos genéticos que constituem a microbiota humana, onde todos esses microrganismos, benéficos e eventuais patógenos, convivem [3].

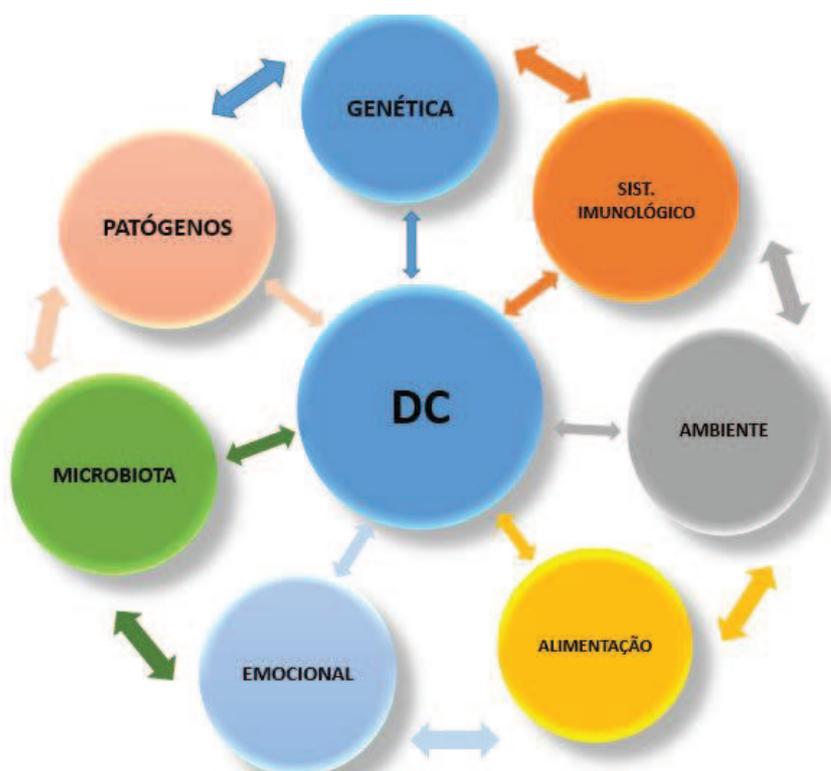
O trato gastrointestinal (GI) humano contém mais de 10 trilhões de bactérias, abrangendo mais de 500 espécies diferentes. Esta microbiota pode pesar até 2 kg. Um terço da nossa microbiota intestinal é comum à maioria das pessoas, e os demais 2/3 são específicos a cada um de nós [4].

Os microrganismos exercem importantes funções como conservação e promoção do desenvolvimento das defesas imunológicas, exercem influência considerável sobre uma série de reações bioquímicas do hospedeiro tais como: transformação de fibra dietética em açúcares simples, transformação de ácidos graxos de cadeia curta e de outros nutrientes para serem absorvidos, produção de vitamina K, vitamina B12 e ácido fólico,

participação no metabolismo e recirculação de ácidos biliares, transformação de potenciais agentes carcinogênicos e ativação de compostos bioativos [4].

Já o desequilíbrio da microbiota intestinal juntamente com outros fatores pode promover o aparecimento e progressão de doenças humanas, tais como a obesidade, particularmente na regulação de energia e no armazenamento de gordura, e doença de Crohn, e também proteção dos intestinos contra infecção por *Salmonella* e *Clostridium difficile* [4], conforme mostrado na Figura 2 abaixo.

Figura 2. Fatores genéticos e epigenéticos que podem causar ou intensificar a doença de Crohn (DC).



Fonte: Autoria própria.

Dessa forma, a presença de bactérias no intestino é obrigatória para o desenvolvimento de diversas funções do trato GI [4]. Além disso, a microbiota intestinal é fundamental para a ativação do sistema imune, com destaque para os *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactobacillus casei*, aumentando a IgA para remoção de antígenos por caminho não inflamatório e aumentando os linfócitos T e B.

Em outras palavras, na ausência de microbiota intestinal, a função motora do intestino é comprometida. Os Lactobacilos e as Bifidobactérias inibem o crescimento de bactérias exógenas e/ou nocivas, estimulam as funções imunológicas, auxiliam na digestão e/ou absorção dos ingredientes e minerais dos alimentos e contribuem para a síntese de vitaminas [29,30].

1.2 Transplante de Células Progenitoras Hematopoiéticas no tratamento da doença de Crohn

Segundo o Registro Brasileiro de Transplantes (RBT), em 2016, o Brasil realizou um total de 24.496 transplantes, incluindo órgãos sólidos, sendo 2.187 o número de transplantes de células progenitoras hematopoiéticas (TCPH), divididos entre 802 do tipo alogênico e 1.385 autólogos [45]. O estado de São Paulo é a região com o maior registro até o momento, totalizando 1.008 TCPH, sendo 406 alogênicos e 602 autólogos. Segundo o RBT, existe a possibilidade de haver subnotificação de TCPH em alguns estados. A diferença entre esses dois tipos de TCPH é a origem das células: no tipo autólogo, as células são provenientes do próprio paciente, enquanto no tipo alogênico, elas são doadas por um terceiro, podendo causar assim problemas de histocompatibilidade e, por isso, são evitados. Portanto, a modalidade realizada com maior frequência em pacientes com doença de Crohn é o TCPH autólogo [45].

Nesse contexto, apesar de haver mais de 30 doenças autoimunes, o TCPH apresenta uma eficácia maior no tratamento de algumas delas, como a DC [55,56]. Em casos graves, nos quais o paciente não responde mais a nenhum tratamento, o objetivo do TCPH é gerar o reinício do sistema imunológico, fazendo com que o organismo pare de produzir anticorpos que atacam as próprias células [60].

Existem estratégias de tratamento da DC, dependendo da resposta e da gravidade da doença. Os imunossuppressores associados ou não aos agentes biológicos (TNF- α e Alfa 4-integrina) preponderam no tratamento da DC com ausência de resposta primária e perda de resposta estimada em 13,0% dos casos anualmente nos respondedores primários [36,48,51]. O TCPH, tanto na modalidade alogênica quanto autóloga, é um procedimento que emerge como uma opção nos casos refratários sem opção de tratamento [50,51].

O primeiro relato de remissão da DC com o TCPH ocorreu em um paciente com 41 anos de idade com histórico de 20 anos de doença que desenvolveu posteriormente um Linfoma não Hodgkin (LNH). Seis meses após o TCPH, o paciente estava em remissão completa do LNH e os sintomas da DC haviam desaparecido [52]. Na sequência, inúmeros relatos com descrição de resultados positivos após o TCPH no tratamento da DC foram publicados na literatura [53-57].

A falta de opções terapêuticas, refratariedade e ausência de resposta aos medicamentos anti-inflamatórios, imunossuppressores e, particularmente, aos agentes biológicos antagonistas TNF- α e da alfa-4-integrina, bem como do risco de cirurgias mutilantes para muitos casos em vigência de estenoses, o TCPH se insere como potencial terapêutico das doenças autoimunes, principalmente na DC [58-60].

O racional para o uso do TCPH é que o regime de condicionamento mieloablativo empregado induz uma insuficiência medular reversível e produz uma imediata supressão do processo imune, propiciando, também, um implante celular com linfócitos auto-tolerantes quando da recuperação medular [60].

No Brasil, não existe um protocolo específico de TCPH para o tratamento de DC ou casos tratados, como o descrito para outras doenças autoimunes [58,59,60]. Os critérios de indicação do TCPH para a DC não são devidamente claros e se referem à doença grave e refratária aos tratamentos convencionais [56,60].

A terapia medicamentosa pode, de um lado, manter essa doença sobre controle, mas, por outro lado, pode gerar complicações como, por exemplo, aquelas decorrentes do uso prolongado do corticóides, alterações nas funções hepática e renal, e no caso de imunobiológicos, desde o aparecimento de doenças infecciosas até tumores.

Com a realização do TCPH, os pacientes com DC grave têm uma grande chance de recuperação e melhora da qualidade de vida [59,60,64]. Estudos mostram que até 50,0% dos pacientes passam a não ter mais necessidade de utilizar medicamentos para o controle da DC após o transplante. Cerca de 40,0% não ficam completamente curados, mas melhoram o estado de saúde e passam a responder aos medicamentos. Apenas 10,0% não manifestam melhora [57,58].

O TCPH, tanto na modalidade alogênica quanto autóloga, é um procedimento que emerge como uma opção nos casos refratários sem opção de tratamento [54]. Ele tem como proposta a ablação e ou a substituição do sistema hematopoiético, propiciando a interrupção do ciclo inflamatório e reprogramando o sistema imune [54]. Existem inúmeros relatos em que o TCPH autólogo foi utilizado em pacientes com DC,

proporcionando redução dos sintomas e remissão completa imediata e de longo termo da doença [55].

No Brasil, os pacientes com indicação de TCPH carecem de implementação sistemática e de acesso a essa modalidade terapêutica. Burt et al. (2016) [64] estudaram 24 pacientes refratários às terapias convencionais tratados com TCPH autólogas, obtendo remissão da DC em 91,0% no primeiro ano, caindo para 19,0%, sem recidiva, após 5 anos, porém não há menção sobre os critérios utilizados para recidiva da moléstia.

Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a microbiota intestinal de uma paciente pré- e pós-transplante autólogo de células progenitoras hematopoiéticas. Esse resultado poderá auxiliar na avaliação da eficácia e da relação do TCPH e a melhora da composição da microbiota, o que, conseqüentemente, melhora os sintomas da doença.

METODOLOGIA

2 METODOLOGIA

2.1 Modelo do Estudo

Foi realizado estudo em uma paciente portadora de doença de Crohn que foi submetida ao transplante autólogo de células progenitoras hematopoiéticas, refratária a tratamento medicamentoso durante o período de 1 ano, atendida no Kaiser Hospital Dia de São José do Rio Preto, SP.

2.2 Ética

De acordo com as Normas Regulamentares de Pesquisa em Seres Humanos, Resolução 466/12 do Ministério da Saúde, este estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Beneficência Portuguesa de São José do Rio Preto, SP (Parecer Nº 1.387.770) (Anexo 2). Esta investigação iniciou após a paciente ter sido esclarecida sobre o objetivo e importância da mesma, e mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1).

2.3 Infraestrutura e procedimentos

A paciente foi selecionada, em conjunto, pelas equipes de cirurgia geral no Kaiser Hospital Dia. A paciente recebeu o termo de consentimento explicativo sobre a natureza do procedimento, e que a análise da microbiota não causaria riscos diretos a paciente.

2.4 Intervenções clínicas, análises e descrição clínica do caso

2.4.1 Avaliação clínica

Na avaliação da gravidade clínica da DC, foi utilizado o índice de atividade inflamatória da doença de Crohn (IADC) (Sandborn *et al.*, 2002) [26]. Esse índice considera critérios como evacuação, dor abdominal, sensação de bem-estar, complicações, medicação, massa abdominal, hematócrito e peso, como evidenciado na Tabela 1.

Tabela 1 - Critérios utilizados no índice de atividade inflamatória da doença de Crohn.

Critérios clínicos	Fator de ajuste
Número de evacuações líquidas (diariamente por 7 dias)	x 2
Dor abdominal (nenhuma = 0, leve = 1, moderada = 2, intensa = 3)	x 5
Sensação de bem-estar (bem = 0, desconfortável = 1, ruim = 2, péssimo = 3, terrível = 4)	x 7
Número de complicações (artrite/artralgia, irite/uveíte, eritema nodoso/pioderma gangrenoso ou estomatite aftosa, fissura/fístula ou abscesso anal, outras fistulas, febre > 37,8° C)	x 20
Uso de difelionato ou loperamida (não = 0, sim = 1)	x 30
Massa abdominal (não = 0, questionável = 1, com certeza = 5)	x 10
Hematócrito (homens: 47%, mulheres: 42%)	x 6
Peso (1- peso / peso padrão x 100. Adicione ou subtraia segundo o sinal)	x 1
Total	

2.4.2 Descrição clínica do caso

A paciente CPOR, nascida em 1982, peso de 72 kg e 1,72 m de altura, de etnia caucasóide, teve início dos sintomas no ano 2000, e foi diagnosticada com doença de Crohn em 2002. Realizou TCPH em 20 de novembro de 2017. Fez uso de Sulfasalazina, Mesalazina, Prednisona, Azathioprina, Methotrexato, Infliximabe, Adalimumabe. Apresentava fistula na região perineal. Em histórico, a paciente não era fumante, foi amamentada por pouco tempo, tomou antibiótico na infância e tinha uma dieta com baixa ingestão de fibras. Passou por diversas cirurgias na tentativa de remissão da doença, como: ressecção de segmento intestinal, implante de colostomia, e fistulectomia anal. Não foi necessária colostomia ou apendicectomia ao TCPH. O tratamento pré-TCPH se deu com Methotrexato, Adalimumabe e Prednisona. Apresenta histórico familiar de DII Lupus em prima de 1º grau. Também não apresentava câncer colorretal.

Após o procedimento do TCPH, foram observados os sintomas diarreia, dor abdominal e dores articulares, porém houve redução dos sintomas gerais da DC e manutenção de diarreias esparsas. Para a mobilização das células da medula óssea por aférese para posterior TCPH foram utilizados Ciclofosfamida 60mg/kg + G-CSF 5µg/kg
Condicionamento: Ciclofosfamida 200 mg/Kg GAT 6,5 mg/Kg.

2.4.3 Identificação de microbiota fecal

Após indicação do TCPH para a paciente, foi colhida a amostra de fezes 24h antes de se iniciar o procedimento, e uma nova amostra foi colhida após 9 meses do transplante, pois corresponde ao tempo médio de melhora clínica e endoscópica. A paciente foi esclarecida, também, que, após esse período, poderá haver coleta de novas amostras caso ela apresente sinais colonoscópicos e clínicos de recidiva. As amostras de fezes foram enviadas à empresa Bioma4me® para realização de ensaios de metagenômica, de acordo com metodologia padrão da empresa [69]. A caracterização da microbiota intestinal obedeceu ao processo de coleta das fezes em recipiente estéril e repassado pequena amostra para o kit fornecido pela empresa, e a amostra, após acondicionada neste recipiente, foi encaminhada em embalagem especial, também fornecida pela mesma até a sede em São Paulo, onde iniciou-se o processo de sequenciamento, conforme Figura 3.

Primeiramente, as fezes são processadas para a obtenção do DNA purificado de todas as bactérias que estão presentes na amostra fornecida. Após quantificação e análise de qualidade, o DNA é utilizado na identificação de cada espécie de bactéria por meio da amplificação do gene 16S rDNA de cada microrganismo presente na amostra utilizando-se primers para amplificar as regiões hipervariáveis V3 e V4 do gene [69].

Esse gene está presente em uma grande variedade de microrganismos, sendo amplamente utilizado na identificação de indivíduos das mais diversas microbiotas. É composto por regiões altamente conservadas intercaladas com regiões com grande variabilidade, chamadas hipervariáveis. Essas regiões hipervariáveis são as responsáveis pela identificação taxonômica de cada espécie presente na amostra, funcionando como uma “impressão digital” para cada caso [69].

As sequências obtidas através de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase), posteriormente foram submetidas ao sequenciamento de DNA de segunda geração na plataforma Illumina MiSeq, que gera sequências de 250 pares de bases [69].

Por meio das análises de bioinformática de editoração, essas sequências são tratadas, eliminando as sequências de baixa qualidade. Neste ponto, esses dados são como peças de um quebra-cabeça, que, após montados, dão origem às unidades taxonômicas operacionais (OTUs, do inglês *Operational Taxonomic Units*). As OTUs representativas são, então, confrontadas com sequências presentes em bancos de dados como Greengene e Ribosomal Database Project. A classificação taxonômica se dá por meio da similaridade das regiões hipervariáveis com as mesmas sequências de espécies já cadastradas nos bancos de dados. A partir da identificação, análise estatística e interpretação destes dados, é possível ter o retrato das populações de bactérias que coabitam no sítio amostrado, permitindo relacionar a ocorrência e o percentual de algumas espécies com condições de saúde ou hábitos alimentares.

Figura 3. Etapas do processo de identificação da microbiota fecal.



2.5 Análise de dados

Para análise dos dados, foi construído um banco de dados na planilha eletrônica Microsoft Excel®, a qual foi exportada para o programa estatístico Minitab 18® (version 18, Minitab, LLC, State College, Pensilvânia, USA) e também para o Origin 9® (DPR Group, Inc., Northampton, Massachusetts, USA). Todos os dados numéricos foram vistos por estatística descritiva comum. Realizou-se teste da normalidade de Kolmogorov-Smirnov para dados contínuos e categóricos, aplicando-se, também, análise de variância de Kruskal-Wallis para correlação não-paramétrica, com $p < 0,05$ com diferença estatística (IC95,0%).

RESULTADOS

3 RESULTADOS

Para ser considerado excelente em qualidade, o sequenciamento por meio da técnica 16S rDNA precisa apresentar mais de 98% de leituras aprovadas [71], com percentual de identificação de gênero superior a 90% e o de espécie, superior a 50%. Assim, no presente trabalho o gênero tanto antes quanto após o procedimento de TCPH apresentou valores maiores de 90% e também valores maiores do que 50% para espécie, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Dados gerais taxonômicos da microbiota intestinal antes e após TCPH. Intervalo de confiança de 95%, sendo $p < 0,05$ com diferença estatística.

<i>Nível Taxonômico</i>	<i>Leituras classificadas em nível taxonômico</i>		<i>% de classificação em nível taxonômico</i>		<i>p-value</i>
	<i>Antes</i>	<i>Após</i>	<i>Antes (%)</i>	<i>Após (%)</i>	
Reino	44365	82742	99,17%	99,98 %	<0,05
Filo	44343	82500	98,88%	99,93 %	<0,05
Classe	44297	82288	98,63%	99,83 %	<0,05
Ordem	44279	82251	98,58%	99,79 %	<0,05
Família	44194	80268	96,21%	99,60 %	<0,05
Gênero	43752	78978	94,66%	98,60 %	<0,05
Espécies	23930	55961	53,93 %	67,07 %	<0,05

Um indicador importante de saúde da microbiota intestinal é a razão entre os filos Firmicutes e Bacteroidetes (F/B), cuja proporção normal situa-se entre 0,7 e 1,0. Outro indicador importante é o percentual somado destes dois filos (F+B) em relação ao total, cuja faixa normal deve situar-se entre 85% a 95%. No presente estudo, antes do procedimento de TCPH, a razão entre Firmicutes / Bacteroidetes (F/B) foi 0,55 e após foi 0,87. Já o índice Firmicutes + Bacteroidetes (F+B) foi 97,70% antes e 92,0% após, conforme a Tabela 3.

Tabela 3. Resultados dos indicadores de Firmicutes e Bacteroidetes antes e após TCPH.

<u>Indicador</u>	<u>Valor Encontrado</u>	<u>Valor Desejável</u>
	(Antes / Após TCPH)	
Razão Firmicutes / Bacteroidetes (F/B)	0,55 / 0,87	0,7 - 1,0
Índice Firmicutes + Bacteroidetes (F+B)	97,70% / 92,00%	85% - 95%

As Tabelas de 4 a 9 mostram os resultados dos principais grupos taxonômicos (de filas a espécies) encontrados pela análise da microbiota intestinal da paciente, com resultados antes e após o TCPH. Os resultados mostraram que houve diferença estatística entre todas as comparações taxonômicas dentro de cada nível taxonômico (“Antes” vs. “Após”), com $p < 0,05$ para dados não-paramétricos.

Tabela 4. Principais resultados de classificação de *Filo*. Intervalo de confiança de 95%, sendo $p < 0,05$ com diferença estatística.

<i>Nível Taxonômico</i>	<i>Leituras</i>		<i>% de classificação em</i>		<i>p-value</i>
	<i>classificadas em</i>		<i>nível taxonômico</i>		
	<i>Antes</i>	<i>Após</i>	<i>Antes (%)</i>	<i>Após (%)</i>	
<i>Bacteroidetes</i>	13842	52702	31.19	63.16	<0,05
<i>Firmicutes</i>	13784	28819	31.06	34.54	<0,05
<i>Proteobacteria</i>	10951	695	24.68	0.83	<0,05
<i>Actinobacteria</i>	4403	163	9.92	0.19	<0,05
<i>Chlorobi</i>	1003	42	2.26	0.05	<0,05
<i>Cyanobacteria</i>	324	29	0.73	0.03	<0,05
<i>Tenericutes</i>	33	18	0.07	0.02	<0,05
<i>Fusobacteria</i>	30	6	0.07	0.00	<0,05

Tabela 5. Principais resultados de classificação de *Classe*. Intervalo de confiança de 95%, sendo $p < 0,05$ com diferença estatística.

<i>Nível Taxonômico</i>	<i>Leituras classificadas em nível taxonômico</i>		<i>% de classificação em nível taxonômico</i>		<i>p-value</i>
	<i>Antes</i>	<i>Após</i>	<i>Antes (%)</i>	<i>Após (%)</i>	
<i>Gammaproteobacteria</i>	13727	19453	30,94	35,65	<0,05
<i>Clostridia</i>	12422	6444	27,99	12,34	<0,05
<i>Bacteroidia</i>	10920	22332	24,61	51,23	<0,05
<i>Verrucomicrobiae</i>	4401	6780	9,92	11,24	<0,05
<i>Actinobacteria</i>	1003	3450	2,26	5,46	<0,05
<i>Bacilli</i>	877	988	1,98	2,56	<0,05
<i>Erysipelotrichi</i>	523	877	1,18	2,67	<0,05
<i>Fusobacteria</i>	324	544	0,73	1,68	<0,05

Tabela 6. Principais resultados de classificação de *Ordem*. Intervalo de confiança de 95%, sendo $p < 0,05$ com diferença estatística.

<i>Nível Taxonômico</i>	<i>Leituras classificadas em nível taxonômico</i>		<i>% de classificação em nível taxonômico</i>		<i>p-value</i>
	<i>Antes</i>	<i>Após</i>	<i>Antes (%)</i>	<i>Após (%)</i>	
<i>Enterobacteriales</i>	13668	16868	30,80	34,80	<0,05
<i>Clostridiales</i>	12360	3560	27,85	5,55	<0,05
<i>Bacteroidales</i>	10920	19820	24,61	29,41	<0,05
<i>Verrucomicrobiales</i>	4401	7456	9,92	13,92	<0,05
<i>Bifidobacteriales</i>	852	3467	1,92	7,32	<0,05
<i>Lactobacillales</i>	759	4790	1,71	9,31	<0,05
<i>Erysipelotrichales</i>	523	234	1,18	0,68	<0,05
<i>Fusobacteriales</i>	324	789	0,73	2,45	<0,05

Tabela 7. Principais resultados de classificação de *Família*. Intervalo de confiança de 95%, sendo $p < 0,05$ com diferença estatística.

<i>Nível Taxonômico</i>	<i>Leituras classificadas em nível taxonômico</i>		<i>% de classificação em nível taxonômico</i>		<i>p-value</i>
	<i>Antes</i>	<i>Após</i>	<i>Antes (%)</i>	<i>Após(%)</i>	
	<i>Enterobacteriaceae</i>	13668	19568	30,80	
<i>Bacteroidaceae</i>	10561	20361	23,80	46,8	<0,05
<i>Lachnospiraceae</i>	8652	12252	19,50	24,3	<0,05
<i>Verrucomicrobiaceae</i>	4401	2201	11,3	9,92	<0,05
<i>Veillonellaceae</i>	2734	6334	6,16	9,23	<0,05
<i>Bifidobacteriaceae</i>	852	4678	1,92	4,56	<0,05
<i>Ruminococcaceae</i>	785	987	1,77	2,45	<0,05
<i>Coprobacillaceae</i>	436	1578	0,98	3,56	<0,05

Tabela 8. Principais resultados de classificação de *Gênero*. Intervalo de confiança de 95%, sendo $p < 0,05$ com diferença estatística.

<i>Nível Taxonômico</i>	<i>Leituras classificadas em nível taxonômico</i>		<i>% de classificação em nível taxonômico</i>		<i>p-value</i>
	<i>Antes</i>	<i>Após</i>	<i>Antes(%)</i>	<i>Após(%)</i>	
	<i>Escherichia</i>	12492	0492	28,15	
<i>Bacteroides</i>	10561	20261	23,80	36,70	<0,05
<i>Ruminococcus</i>	6916	1216	15,59	7,45	<0,05
<i>Akkermansia</i>	4262	6162	9,60	11,40	<0,05
<i>Veillonella</i>	1823	4423	4,11	6,15	<0,05
<i>Blautia</i>	1380	7580	3,11	6,03	<0,05
<i>Dialister</i>	883	383	1,99	0,87	<0,05
<i>Bifidobacterium</i>	849	1670	1,91	3,31	<0,05

Tabela 9. Principais resultados de classificação de *Espécie*. Intervalo de confiança de 95%, sendo $p < 0,05$ com diferença estatística.

Nível Taxonômico	Leituras classificadas em nível taxonômico		% de classificação em nível taxonômico		p-value
	Antes	Após	Antes(%)	Após(%)	
<i>Bacteroides dorei</i>	4903	8603	11,05	22,05	<0,05
<i>Akkermansia muciniphila</i>	4262	14162	9,60	25,60	<0,05
<i>Ruminococcus gnavus</i>	2038	1028	4,59	2,59	<0,05
<i>Bacteroides uniformis</i>	1659	5659	3,74	7,74	<0,05
<i>Bacteroides fragilis</i>	1539	7539	3,47	8,37	<0,05
<i>Escherichia albertii</i>	933	123	2,10	0,56	<0,05
<i>Dialister invisus</i>	883	345	1,99	0,45	<0,05

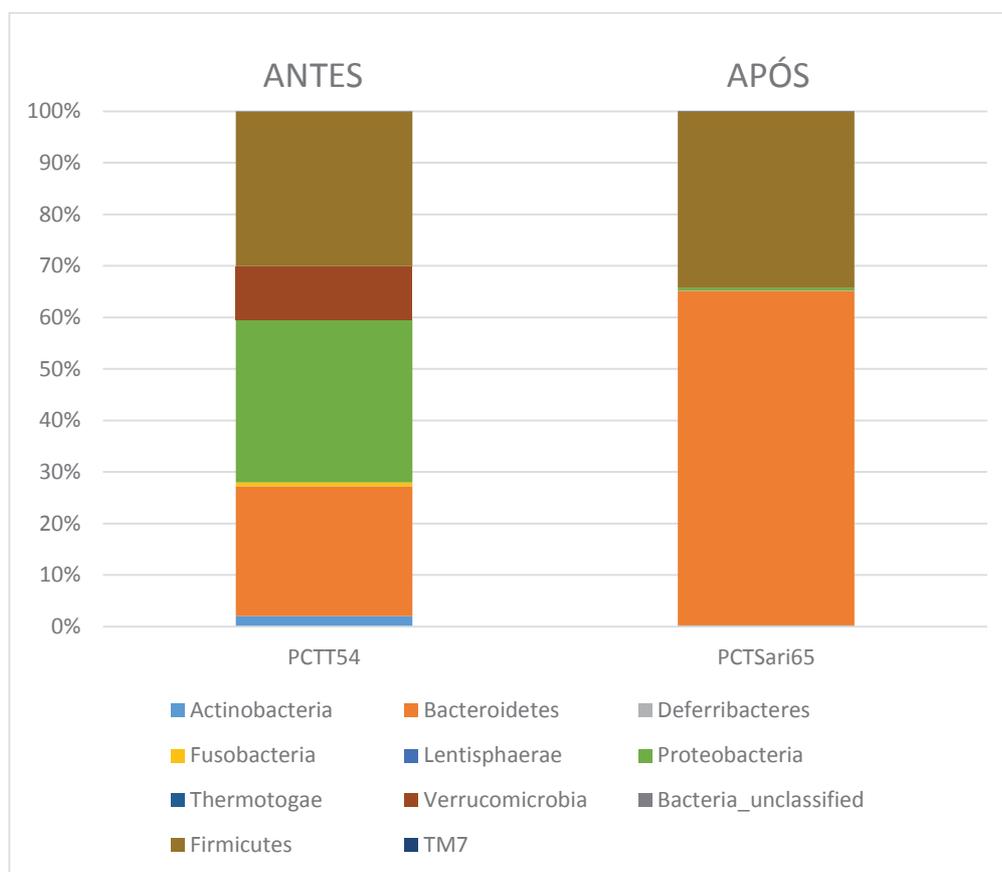
A Tabela 10 abaixo mostra os resultados do índice de atividade inflamatória da doença de Crohn (IADC) da paciente antes e após o TCPH, sendo que após um ano de seguimento, a paciente obteve redução desse índice para 53.

Tabela 10. Dados do índice de atividade inflamatória da doença de Crohn (IADC) antes e após o TCPH, com tempo avaliado em dias.

Pré	Após 30 d	Após 90 d	Após 180 d	Após 270 d	Após 365 d
236	121	110	100	65	53

A Figura 4 apresenta a diferença na composição da microbiota intestinal da paciente, com relação aos principais grupos taxonômicos, nos dois diferentes momentos (antes e após o TCPH).

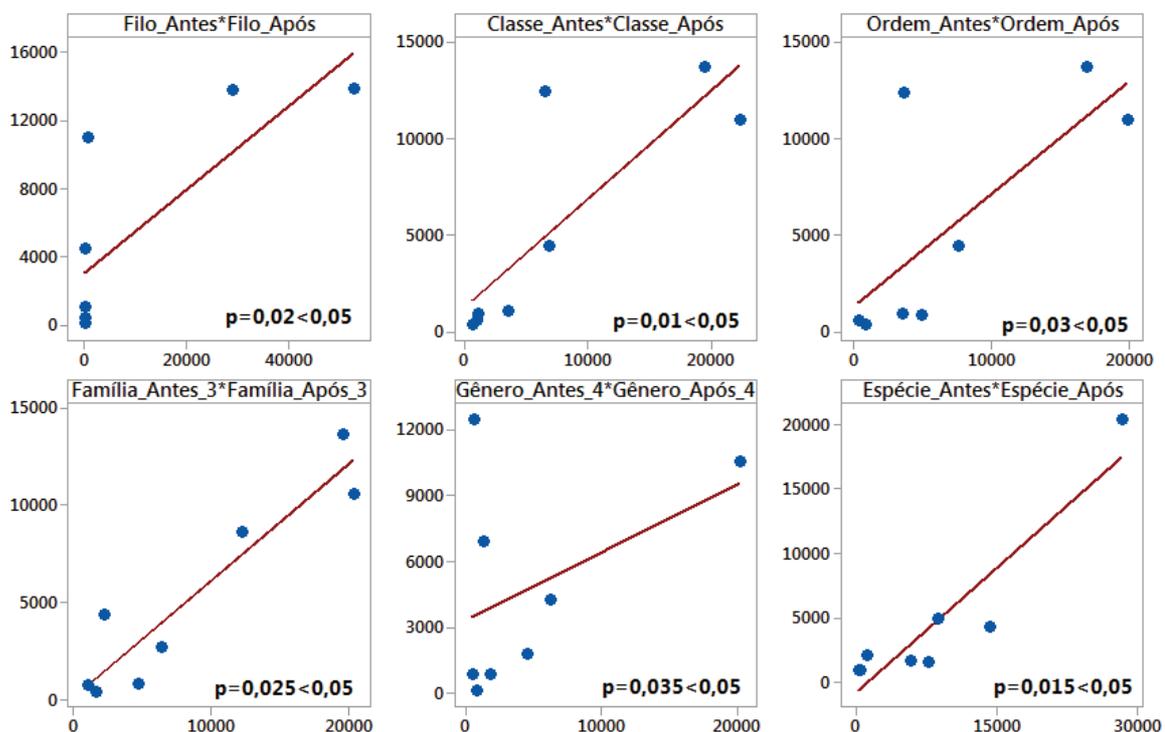
Figura 4. Principais filos encontrados antes e após o procedimento de TCPH.



A Figura 5 mostra a análise de correlação não-paramétrica entre cada grupo taxonômico (“Filo_Antes” vs. “Filo_Após”; “Classe_Antes” vs. “Classe_Após”; “Ordem_Antes” vs. “Ordem_Após”; “Família_Antes” vs. “Família_Após”; “Gênero_Antes” vs. “Gênero_Após”; “Espécie_Antes” vs. “Espécie_Após”), antes e após o procedimento de TCPH. Os resultados mostraram que houve diferença estatística, com $p < 0,05$ para todas as análises não-paramétricas, ou seja, todas as comparações “antes” e “após” envolvendo cada grupo taxonômico foram diferentes, comprovando que houve alteração na microbiota intestinal após o procedimento de TCPH.

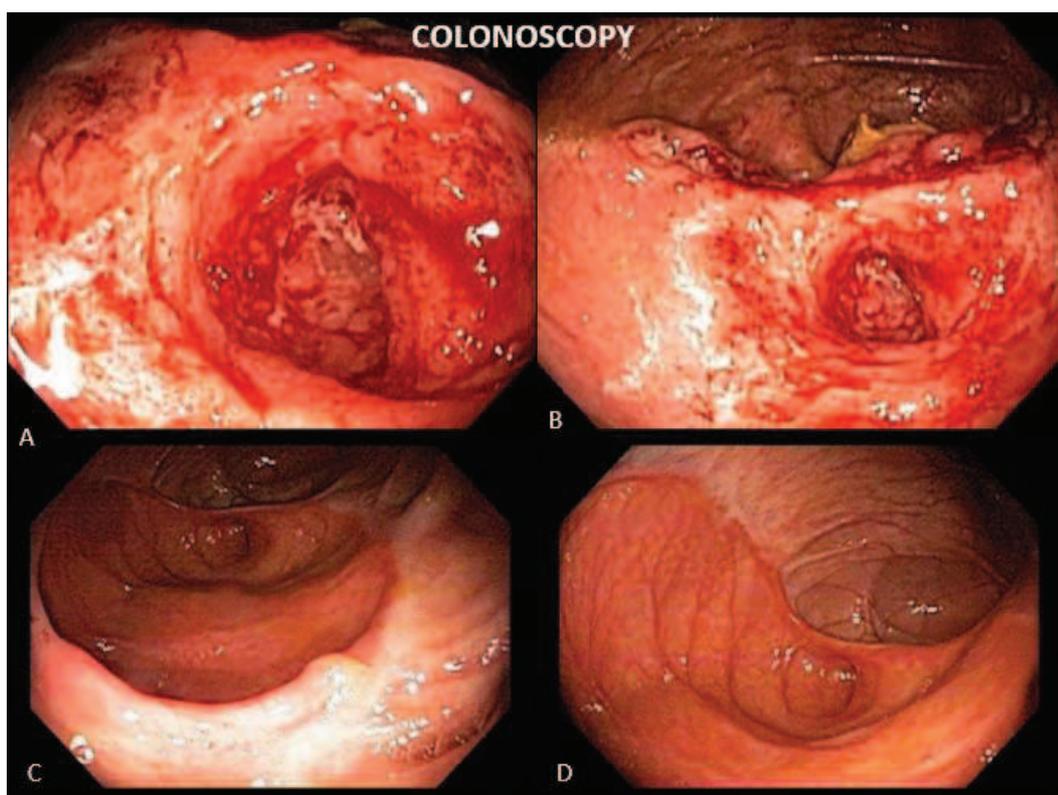
Além disso, outro resultado a ser explorado na Figura 5 é a dispersão dos pontos azuis em relação à reta vermelha, tanto no eixo x quanto em y, configurando que houve baixa correlação de similaridade entre cada grupo taxonômico.

Figura 5. Análise de correlação não-paramétrica entre cada grupo taxonômico, antes e após o procedimento de transplante de células precursoras hematopoiéticas da medula óssea, com IC95%, e $p < 0,05$ com diferença estatística.



A Figura 6 abaixo representa as imagens colonoscópicas mostrando a inflamação do cólon na doença de Crohn (A e B) em comparação com as imagens após nove meses de TCPH (C e D).

Figura 6. Imagens colonoscópicas mostrando a inflamação do cólon na doença de Crohn (A e B) em comparação com as imagens após nove meses de TCPH (C e D).



Fonte: Autoria própria.

DISCUSSÃO

4 DISCUSSÃO

O presente trabalho apresentou e detalhou os resultados da alteração da microbiota intestinal de uma paciente portadora de doença de Crohn que foi submetida ao transplante autólogo de células progenitoras hematopoiéticas. Os resultados mostraram que, após o TCPH, houve alteração da microbiota intestinal da paciente, pois pode substituir o sistema linfo-hematopoiético anormal, permitindo que as espécies consideradas saudáveis colonizassem o intestino, principalmente no aumento das espécies bacterianas *Bacteroides dorei*, *Akkermansia muciniphila*, *Ruminococcus gnavus*, *Bacteroides uniformis*, *Bacteroides fragilis*, *Escherichia albertii*, *Dialister invisus*.

Em destaque, a *Akkermansia muciniphila*, que apresentou, no presente estudo, um aumento maior do que três vezes (3,32 x) após o TCPH em relação à quantificação inicial, é uma bactéria anaeróbia Gram-negativa que reside no revestimento intestinal, e utiliza a mucina, presente no muco do intestino, como fonte de energia [4]. Esta bactéria parece colonizar o intestino humano ainda na primeira infância, uma vez que é encontrada no leite materno [4]. A *A. muciniphila* é considerada a bactéria mucolítica degradante mais abundante em um indivíduo saudável. Sua presença ilustra uma relação hospedeiro-microrganismo próspera, e sua baixa concentração no intestino pode indicar uma camada de muco fina, resultando em uma barreira intestinal enfraquecida, além de possibilitar aumento da translocação de toxinas bacterianas [4]. A população de *A. muciniphila* tende a ser menor em pacientes que sofrem de DII, obesidade e diabetes do tipo II [4], ficando evidente na paciente estudada que a população de *A. muciniphila* era bem menor, se comparado à quantidade de indivíduos dessa espécie após a remissão dos sintomas da DC.

A diminuição da população desta bactéria pode ocorrer também com o avanço da idade. Um estudo indicou que a administração oral de *A. muciniphila* pode promover a melhora de condições como hipertrigliceridemia crônica, sensibilidade à insulina, estresse de retículo endoplasmático hepático e inflamação metabólica, além de facilitar a absorção de colesterol de lipoproteína de densidade intermediária [4].

Estudos recentes indicam que microbiotas com preponderância de Bacteroidetes estão correlacionadas com perda de peso e biotipos magros [1,2]. Na microbiota sequenciada após o TCPH do presente estudo, a preponderância das Bacteroidetes foi em virtude do alto percentual de bactérias Bacteroides. Assim, Bacteroidetes e Firmicutes competem pela colonização do intestino. Para reforçar as Firmicutes, e, conseqüentemente, abaixar o percentual de Bacteroidetes, é recomendado o uso de probióticos cuja formulação privilegie as espécies *Lactobacillus rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. bulgaricus*, *L. salivarius*, *L. brevis*, *L. gasseri*, *L. casei*, *L. paracasei* [3].

Dessa forma, o estado de saúde dos seres humanos depende, dentre outros fatores, do equilíbrio, entre as diferentes bactérias, em número e diversidade, que compõem a microbiota intestinal. A riqueza da microbiota intestinal é definida como o número de diferentes espécies que foram identificadas na amostra [2,4].

A diversidade da microbiota intestinal, por sua vez, reflete quantas espécies diferentes foram encontradas na amostra, levando em consideração, simultaneamente, a uniformidade com que estas espécies estão distribuídas na amostra [2]. Estima-se que existam cerca de 500 espécies bacterianas na microbiota intestinal humana. O índice de diversidade da microbiota intestinal é calculado de 0 a 10 (índice de diversidade de Simpson) sendo 10 o máximo de diversidade [3].

A *Faecalibacterium prausnitzii* é uma das espécies bacterianas intestinais mais prevalentes em adultos saudáveis, sendo considerada uma bactéria benéfica e produtora de butirato [1]. Por ser uma bactéria anti-inflamatória, existem evidências científicas acerca da sua eficácia na prevenção de doenças respiratórias como asma. A redução desta bactéria no intestino é vista em várias doenças, como exemplo na Doença de Crohn, na obesidade e na asma. Porém, são bactérias anaeróbias (sensível ao oxigênio, morrendo poucos minutos após a exposição ao ar). Considerada como um "probiótico futuro", atualmente há pesquisas em andamento para descobrir maneiras de ser facilmente armazenadas e expostas ao ar [1]. Dessa forma, são indicados alguns manejos para aumentar os números dessa bactéria como: dar preferência a alimentos com fibras, aumentar o consumo de frutas, verduras, legumes, grãos e cereais integrais, sementes e nozes [1,4]. O aumento da fibra alimentar aumenta o butirato, um ácido graxo de cadeia curta, que está envolvido com a saúde do cólon, sendo anti-inflamatório e anticâncer [4].

Além disso, as bactérias intestinais não são apenas responsáveis por quebrar fibras dietéticas complexas, mas também são importantes para a produção de uma variedade de metabólitos com funções ativas no intestino [67]. Os mais bem estudados são os ácidos graxos de cadeia curta, como butirato, propionato e acetato, que servem como fonte de

energia para as células epiteliais intestinais, e induzem respostas imunes regulatórias protetoras tanto localmente no intestino quanto sistemicamente [67-69].

Nesse contexto, a origem genética da doença de Crohn baseia-se em alterações em genes responsáveis pela homeostase celular, pela regulação da resposta imunológica e pela barreira adaptativa [70]. Fatores ambientais que alteram a microbiota intestinal, como tipo de parto, condições sanitárias, alimentação, uso de antibióticos e tabagismo, são fatores de risco [72]. Todos estes fatores, bem como os genéticos e as respostas imunes, já foram considerados como a maior etiologia da Doença de Crohn. No entanto, nos últimos anos, diversos autores estiveram muito interessados em avaliar o possível envolvimento da microbiota intestinal na etiopatogenia complexa das DII [31-33].

Assim, Becker et al (2015) [44] realizaram um estudo com base em culturas de fezes, onde foi observada uma diminuição significativa da biodiversidade da microbiota intestinal em pacientes com DII. Tal fato foi observado no presente trabalho, pois a paciente analisada apresentava uma microbiota intestinal mais favorável aos processos inflamatórios antes do procedimento de TCPH. Tanto é plausível tal observação que, após o transplante e, conseqüentemente, “reiniciação” do sistema imune, decorridos 9 meses do TCPH, a paciente apresentou melhora clínica significativa do quadro inflamatório (IADC entre 53 e 100) e uma composição de microbiota intestinal comparável a de indivíduos saudáveis.

Existe, também, uma tendência para o excesso de organismos pró-inflamatórios com depleção concomitante de organismos com propriedades anti-inflamatórias, tais como *F. prausnitzii* [31,33,36]. No estudo de Chiodini et. al. (2015) [44], foi identificado um aumento nas Enterobacteriaceae (*Escherichia coli* e *Shigella*) em DII. A colonização por *Escherichia coli* com propriedades aderentes e invasivas se mostra mais frequente na

mucosa ileal de pacientes com DC do que em controles saudáveis, e, de maneira geral, este grupo de bactérias vem sendo detectado com maior constância nas fezes de pacientes com DII [34,37].

No presente estudo, a presença das espécies do filo Proteobacteria na microbiota da paciente apresentaram redução drástica 9 meses após o TCPH, como evidenciado na Figura 4. Essa diferença na alteração entre os grupos taxonômicos também foi observada pela Figura 5, pois houve diferença estatística, com $p < 0,05$ para todas as análises não-paramétricas, ou seja, todas as comparações “antes” e “após” envolvendo cada grupo taxonômico foram diferentes, comprovando que houve alteração na microbiota intestinal após o procedimento de TCPH. Além disso, outro resultado a ser explorado na Figura 5 é a dispersão dos pontos azuis em relação à reta vermelha, tanto no eixo x quanto em y, configurando que houve baixa correlação de similaridade entre cada grupo taxonômico. Assim, as Proteobacteria são forte indutoras de inflamação devido à sua composição, então é lógico que sua presença aumentada no intestino vai aumentar a inflamação naquele local, como acontece nas DII. Quando a paciente fez TCPH, diminuiu drasticamente a quantidade de Proteobacteria e também a inflamação. Entretanto, o que ainda não se sabe é se a diminuição de Proteobacteria levou à diminuição da inflamação intestinal, ou se o TCPH reiniciou o sistema imune, permitindo que o corpo combatesse a grande quantidade de Proteobacteria, ou até mesmo permitindo que a microbiota intestinal restabelecida combatesse as bactérias nocivas, conseqüentemente diminuindo a inflamação intestinal.

Assim, a indução de tolerância imunológica no intestino estimulada pela renovação e reativação do sistema imunológico da paciente neste estudo foi fundamental para evitar respostas inflamatórias indesejáveis contra proteínas alimentares, ou contra a

própria microbiota intestinal [63]. O sistema imune intestinal mantém a barreira mucosa em cheque por meio da secreção de peptídeos antimicrobianos e anticorpos, e a microbiota comensal molda, reciprocamente, a fisiologia intestinal do hospedeiro [63,72].

O sistema imune adaptativo do intestino também é rapidamente ativado após a exposição a bactérias comensais, com um aumento na expressão de moléculas de classe II do complexo de histocompatibilidade principal e um aumento de células T [63]. As células T podem gerar subpopulações cuja resposta imunológica é pro-inflamatória ou anti-inflamatória. As células Th1 e Th17 – células T helper, são de caráter pró-inflamatório, enquanto as células Treg (de fenótipo CD4⁺ CD25⁺) e Th2 são anti-inflamatórias [3].

Nesse sentido, a bactéria Gram-negativa *Bacteroides fragilis*, que apresentou um aumento de 4,9 vezes após o TCPH em relação à quantidade inicial do presente estudo, induz a diferenciação de células T CD4⁺ em células Treg, levando à produção de citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina-10 (IL-10) e o fator de transformação do crescimento beta (TGFβ), anulando a resposta pró-inflamatória da Th17 [3]. A diferenciação de células Treg depende do reconhecimento pelas células T CD4⁺, do polissacarídeo apresentado pelas CD. Por sua vez, bactérias segmentadas filamentosas, após contato com células apresentadoras de antígeno, demonstraram induzir células pró-inflamatórias, como as células Th17. Entretanto, apesar de se considerar que a indução da inflamação é um inconveniente, também pode ser benéfica, se controlada. As respostas imunológicas desencadeadas pela microbiota parecem contribuir para reforçar a barreira intestinal [3,4].

Ainda, certas composições da microbiota intestinal foram associadas à inflamação sistêmica e distúrbios metabólicos. Particularmente, bactérias Gram-negativas, contendo

lipopolissacarídeos na sua camada externa, demonstraram estimular a imunidade e provocar endotoxemia metabólica, enquanto outros gêneros, como as Bifidobactérias, estimulam a redução da endotoxemia [73]. Apesar de ser Gram-negativa, a *A. muciniphila* mostra-se positiva por melhorar a função de barreira intestinal e induzir efeitos metabólicos benéficos [31]. Nesse contexto, na paciente CPOR, a população de *A. muciniphila* apresentou aumento estatístico significativo após o TCPH, passando de uma composição representativa inferior a 10% da população intestinal identificada pré-transplante para mais de 25,0% do total de espécies presentes após o TCPH (Tabela 9).

Dessa forma, os pontos a destacar no presente trabalho foram que após o TCPH, com consequente substituição do sistema linfo-hematopoiético anormal e indução da tolerância imunológica no intestino estimulada pela renovação e reativação do sistema imunológico, houve importante alteração da microbiota intestinal da paciente, com aumento significativo da microbiota intestinal com tendência ao povoamento saudável, com dominância dos Bacteroidetes, aumento das espécies bacterianas *Bacteroides dorei*, *Akkermansia muciniphila*, *Ruminococcus gnavus*, *Bacteroides uniformis*, *Bacteroides fragilis* e Diminuição considerável das espécies *Escherichia albertii* e *Dialister invisus*.

Além disso, houve redução dos filos Proteobacteria, Actinobacteria, Chlorobi, Cyanobacteria, Tenericutes e Fusobacteria após 9 meses de TCPH. E como desfecho principal, a bactéria Gram-negativa *Bacteroides fragilis* apresentou um aumento de quase cinco vezes em relação à quantidade inicial antes do procedimento de TCPH, induzindo a diferenciação de células T CD4⁺ em células Treg, o que pode ter levado à produção de citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina-10 (IL-10) e o fator de transformação do crescimento beta (TGF β), anulando a resposta pró-inflamatória da Th17.

LIMITAÇÕES

5 LIMITAÇÕES

- ✓ Não há estudos clínicos como suporte ao presente estudo;
- ✓ O presente estudo foi realizado em um único paciente;
- ✓ Alto custo das análises da microbiota fecal.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

O presente estudo comprovou que, após o transplante de células progenitoras hematopoiéticas houve alteração significativa na composição da microbiota intestinal, correlacionando com uma melhora clínica do quadro da doença de Crohn.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS

1. Danilova NA, Abdulkhakov SR, Grigoryeva TV, Markelova MI, Vasilyev IY, Boulygina EA, Ardatskaya MD, Pavlenko AV, Tyakht AV, Odintsova AK, Abdulkhakov RA. Markers of dysbiosis in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Ter Arkh.* 2019 May 15;91(4):17-24. doi: 10.26442/00403660.2019.04.000211.
2. Khanna S, Raffals LE. The Microbiome in Crohn's Disease: Role in Pathogenesis and Role of Microbiome Replacement Therapies. *Gastroenterol Clin North Am.* 2017 Sep;46(3):481-492. doi: 10.1016/j.gtc.2017.05.004. Epub 2017 Jul 19.
3. He Q, Gao Y, Jie Z, Yu X, Laursen JM, Xiao L, Li Y, Li L, Zhang F, Feng Q, Li X, Yu J, Liu C, Lan P, Yan T, Liu X, Xu X, Yang H, Wang J, Madsen L, Brix S, Wang J, Kristiansen K, Jia H. Two distinct metacommunities characterize the gut microbiota in Crohn's disease patients. *Gigascience.* 2017 Jul 1;6(7):1-11. doi: 10.1093/gigascience/gix050.
4. Green N, Miller T, Suskind D, Lee D. A Review of Dietary Therapy for IBD and a Vision for the Future. *Nutrients.* 2019 Apr 26;11(5). pii: E947. doi: 10.3390/nu11050947.
5. Anderson JL, Edney RJ, Whelan K. Systematic review: faecal microbiota transplantation in the management of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2012;36:503-16.
6. Benjamin JL, Hedin CR, Koutsoumpas A, Ng SC, McCarthy NE, Hart AL, et al. Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of fructo-oligosaccharides in active Crohn's disease. *Gut* 2011;60:923-9.
7. Bernstein CN, Loftus EV Jr, Ng SC, Lakatos PL, Moum B; Epidemiology and Natural History Task Force of the International Organization for the Study of Inflammatory Bowel Disease (IOIBD). Hospitalisations and surgery in Crohn's disease. *Gut* 2012;61:622-9.
8. Borody TJ, Khoruts A. Fecal microbiota transplantation and emerging applications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011;9:88-96.
9. Brandt K, Taddei CR, Takagi EH, Oliveira FF, Duarte RTD, Irino I, et al. Establishment of the bacterial fecal community during the first month of life in Brazilian newborns. *Clinics* 2012;67:113-23.
10. Brazilian Study Group of Inflammatory Bowel Diseases. Consensus guidelines for the management of inflammatory bowel disease. *Arq Gastroenterol* 2010;47:313-25.
11. Campos FG, Teixeira MG. Doença de Crohn. In: Coelho JCU, editor. *Aparelho digestivo: clínica e cirúrgica.* 3ª ed. São Paulo: Atheneu; 2005. p. 772-85.
12. Hanauer SB, Sandborn W; Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. Management of Crohn's disease in adults. *Am J Gastroenterol* 2001;96:635-43.
13. Hedin C, Whelan K, Lindsay JO. Evidence for the use of probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease: a review of clinical trials. *Proc Nutr Soc* 2007;66:307-15.
14. Kirschner BS. Differences in the management of inflammatory bowel disease in children and adolescents compared to adults. *Neth J Med* 1998;53:S13-8.

15. Landy J, Al-Hassi HO, McLaughlin SD, et al. Review article: faecal transplantation therapy for gastrointestinal disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2011;34:409-15.
16. Langholz E, Munkholm P, Krasilnikoff PA, Binder V. Inflammatory bowel diseases with onset in childhood: clinical features, morbidity, and mortality in a regional cohort. *Scand J Gastroenterol* 1997;32:139-47.
17. Meijer BJ, Dieleman LA. Probiotics in the treatment of human inflammatory bowel diseases: update 2011. *J Clin Gastroenterol* 2011;45:S139-44.
18. Ministério da Saúde. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas: doença de Crohn. 2010. http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/crohn_pcdt.pdf.
19. Miszputen SJ. Doenças inflamatórias intestinais. In: Miszputen SJ, Schor N, editores. *Guias de medicina ambulatorial e hospitalar: gastroenterologia*. São Paulo: Manole; 2002, p. 217-31.
20. Mowat C, Cole A, Windsor A, Ahmad T, Arnott I, Driscoll R, et al. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut* 2011;60:571-607.
21. Nagalingam NA, Lynch SV. Role of the microbiota in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2012;18:968-84.
22. Santos C, Menezes J, Nunes T, Martins L. Enterografia POR tomografia Computadorizada na Avaliação da Doença de Crohn. *J. Coloproctol.*, Rio de Janeiro. 2015; 35(4).
23. Cosnes J, et al. Epidemiologia e história natural das doenças inflamatórias intestinais. *Gastroenterology*. 2011; 140(6):1785-1794.
24. Hardt MR et al. Perfil epidemiológico de 175 pacientes com doença de Crohn submetido à terapia biológica. *J Coloproctol*, Rio de Janeiro, vol. 32, n. 4, 2012.
25. Salviano FN, Burgos MGPA, Santos EC. Perfil socioeconômico e nutricional de pacientes com doença inflamatória intestinal internados em um hospital universitário. *Arq Gastroenterol* 2007;44:99-106.
26. Sandborn WJ, Feagan BG, Hanauer SB, Lochs H, Löfberg R, Modigliani R, et al. A review of activity indices and efficacy endpoints for clinical trials of medical therapy in adults with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002;122:512-30.
27. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 2009;75:7537-41.
28. Teixeira, MG. Tratamento cirúrgico da doença de Crohn [Tese de livre-docência]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2000.
29. Vucelic B, Korac B, Sentic M, Milicic D, Hadzic H, Juresa V, et al. Epidemiology of Crohn's disease in Zagreb, Yugoslavia: a ten-year prospective study. *Int J Epidemiol* 1991;20:216-20.
30. Basson A. Vitamin D. Crohn's disease in the adult patient: a review. *J Parenter Enteral Nutr*. 2014;38:438-58.
31. Xu XR, Liu CQ, Feng BS. Dysregulation of mucosal immune response in pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20:3255-64.

32. Bruna Karoline Pinheiro França Protásio, Camila Maria Pinheiro Machado Martins Barbosa, Clarice Blaj Neufeld, Leandro Dimasi Buck, Lygia de Souza Lima Laund, Mauro Sergio Toporovski, Thais Cristina Visoni. Specificities of presentation of Crohn's disease in childhood. *Einstein (São Paulo)*. 2018;16(1):1-3.
33. Kugathasan S, Judd RH, Hoffmann RG, Heikenen J, Telega G, Khan F, WeisdorfSchindele S, San Pablo W Jr, Perrault J, Park R, Yaffe M, Brown C, RiveraBennett MT, Halabi I, Martinez A, Blank E, Werlin SL, Rudolph CD, Binion DG; Wisconsin Pediatric Inflammatory Bowel Disease Alliance. Epidemiologic and clinical characteristics of children with newly diagnosed inflammatory bowel disease in Wisconsin: a statewide population-based study. *J Pediatr*. 2003;143(4):525-31.
34. Adamiak T, Walkiewicz-Jedrzejczak D, Fish D, Brown C, Tung J, Khan K, et al. Incidence, clinical characteristics, and natural history of pediatric IBD in Wisconsin: a population-based epidemiological study. *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19(6):1218-23.
35. Gupta N, Bostrom AG, Kirschner BS, Cohen SA, Abramson O, Ferry GD, et al. Presentation and disease course in early- compared to later-onset pediatric Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*. 2008;103(8):2092-8.
36. Levine A, Griffiths A, Markowitz J, Wilson DC, Turner D, Russell RK, et al. Pediatric modification of the Montreal classification for inflammatory bowel disease: the Paris classification. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17(6):1314-21.
37. Griffiths AM. Specificities of inflammatory bowel disease in childhood. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2004;18(3):509-23.
38. Roth MP, Petersen GM, McElree C, Vadheim CM, Panish JF, Rotter JI. Familial empiric risk estimates of inflammatory bowel disease in Ashkenazi Jews. *Gastroenterology*. 1989;96(4):1016-20.
39. Bayless TM, Tokayer AZ, Polito JM 2nd, Quaskey SA, Mellits ED, Harris ML. Crohn's disease: concordance for site and clinical type in affected family members--potential hereditary influences. *Gastroenterology*. 1996;111(3):573-9.
40. Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ, Tremelling M, Anderson CA, Fisher SA, Roberts RG, Nimmo ER, Cummings FR, Soars D, Drummond H, Lees CW, Khawaja SA, Bagnall R, Burke DA, Todhunter CE, Ahmad T, Onnie CM, McArdle W, Strachan D, Bethel G, Bryan C, Lewis CM, Deloukas P, Forbes A, Sanderson J, Jewell DP, Satsangi J, Mansfield JC; Wellcome Trust Case Control Consortium, Cardon L, Mathew CG. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet*. 2007;39(7):830-2.
41. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science*. 2006;314(5804):1461-3.
42. Parker D, Karmazyn B, Steiner SJ. Radiologic predictors of surgery in newly diagnosed pediatric crohn's disease patients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2016;63(6):e182-5.
43. Becker C, Neurath MF, Wirtz S. A Microbiota Intestinal na Doença do Intestino Inflamatório. *ILAR J*. 2015; 56: (192-204).

44. Chiodini RJ, Dowd SE, Davis B, Galandiuk S, Chamberlin WM, Kuenstner JT, McCallum RW, Zhang J. A doença de Crohn pode ser diferenciada em 2 biótipos distintos com base na detecção de sequências genômicas bacterianas e genes de virulência nos tecidos submucosais. *Clin Gastroenterol*. 2013; 47(7): 612-20.
45. Garcia VD, Pacheco L. Registro Brasileiro de Transplantes. Ano XXII, nº4. São Paulo. 2016.
46. Hovde O and Moum BA. Epidemiology and clinical course of Crohn's disease: Results from observational studies. *World J Gastroenterol* 2012;18(15):1723-1731.
47. Chaparro M, Martínez-Montiel P, Van Domselaar M, Bermejo F, Pérez-Calle JL, Casis B et al. Intensification of infliximab therapy in Crohn's disease: Efficacy and safety. *Journal of Crohn's and Colitis* 2012;6:62-67.
48. Assche GV, Vermeire S and Rutgeerts P. Management of loss response to anti-TNF drugs: Change the dose or change the drug? *Journal of Crohn's and Colitis* 2008;2:348-351.
49. Khanna R, Bressler B, Levesque BG, Zou G, Stitt LW, Greenberg GR et al. Early combined immunosuppression for the management of Crohn's disease (REACT): a cluster randomised controlled trial. *TheLancet.com* 2015; S0140-6736(15)00068-9.
50. Bamba S, Lee CY, Brittan M, Preston SL, Direkze NC, Poulosom R, et al. Bone marrow transplantation ameliorates pathology in interleukin-10 knockout colitic mice. *J Pathol*. 2006;209(2):265–273.
51. Burt RK, Craig RM, Milanetti F, Quigley K, Gozdzia P, Bucha J et al. Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in patients with severe antiTNF refractory Crohn disease: long-term follow-up. *Blood*. 2010;116:6123–6132.
52. Drakos PE, Nagler A, Orel R. Case of Crohn's disease in bone marrow transplantation. *Am J Hematol*. 1993;43(2):157–158.
53. Kashyap A, Forman SJ. Autologous bone marrow transplantation for non-Hodgkin's lymphoma resulting in long-term remission of coincidental Crohn's disease. *Br J Haematol*. 1998;103 (3):651–652.
54. Oyama Y, Craig RM, Traynor AE, Quigley K, Statkute L, Halverson A, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2005;128 (3):552–563.
55. Cassinotti A, Annaloro C, Ardizzone S, Onida F, Della Volpe A, Clerici M et al. Autologous haematopoietic stem cell transplantation without CD34+ cell selection in refractory Crohn's disease. *Gut*. 2008;57(2):211–217.
56. Kreisel W, Potthoff K, Bertz H, Schmitt-Graeff A, Ruf G, Rasenack J et al. Complete remission of Crohn's disease after high-dose cyclophosphamide and autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2003; 32: 337–340.
57. Burt RK, Traynor A, Oyama Y, Craig R. High-dose immune suppression and autologous hematopoietic stem cell transplantation in refractory Crohn disease. *Blood* 2003;101:2064–2066.

58. Snowden J A, Saccardi RA, Allez RM, Ardizzone S, Arnold R, Cervera R et al. Haematopoietic SCT in severe autoimmune diseases: updated guidelines of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2012 June; 47(6): 770–790.
59. Ruiz MA, Kaiser Junior RL, Faria MAG, de Quadros LG. Remission of refractory Crohn's Disease after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2015;37(2):136-139.
60. Ruiz MA, Kaiser Junior RL, de Quadros LG, Piron-Ruiz L, Arciniegas TP, Faria MAG et al. High dose immunoablation following Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation in a Crohn's Disease. *Anais do Congresso Brasileiro SBTMO, Foz do Iguaçu* 2015.
61. Muro M, López-Hernandez R and Mrowiec A. Immunogenetic biomarkers in inflammatory bowel diseases: Role of the IBD3 region. *World J Gastroenterol* 2014;20(41):15037-15048.
62. Pessach I, Tsirigotis P, Nagler A. The gastrointestinal tract: properties and role in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Rev Hematol*. 2017 Apr;10(4):315-326.
63. Staffas A, Burgos da Silva M, van den Brink MRM. The intestinal microbiota in allogeneic hematopoietic cell transplant and graft-versus-host disease. *Blood*. 2017;129(8):927-933.
64. Burt RK, Ruiz MA, Kaiser RL. Stem cell transplantation for refractory crohn disease. *JAMA*. 2016;315:2620.
65. Lee YK, Menezes JS, Umesaki Y, Mazmanian SK. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(suppl 1):4615-4622.
66. Teng F, Klinger CN, Felix KM, et al. Gut microbiota drive autoimmune arthritis by promoting differentiation and migration of Peyer's patch T follicular helper cells. *Immunity*. 2016;44(4):875-888.
67. Donohoe DR, Garge N, Zhang X, et al. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell Metab*. 2011;13(5):517-526.
68. Smith PM, Howitt MR, Panikov N, et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science*. 2013;341(6145):569-573.
69. Bioma4me®. ©2017 Illumina, Inc. All rights reserved. 16S Metagenomics, Version 1.0.1.0.
70. Den Besten G, Bleeker A, Gerding A, et al. Short-chain fatty acids protect against high-fat diet-induced obesity via a PPAR γ -dependent switch from lipogenesis to fat oxidation. *Diabetes*. 2015;64(7):2398-2408.
71. Weber D, Oefner PJ, Hiergeist A, et al. Low urinary indoxyl sulfate levels early after transplantation reflect a disrupted microbiome and are associated with poor outcome. *Blood*. 2015;126(14):1723-1728.

ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Título: Análise da microbiota intestinal em pacientes com doença de Crohn antes e após transplante de medula óssea.

Pesquisador Responsável: Dr. Mikael Alexandre Gouveia Faria

Instituição: KAISER CLINICA E HOSPITAL DIA

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa “Análise da microbiota intestinal em pacientes com doença de Crohn antes e após transplante de medula óssea”.

Informações Iniciais

O motivo que nos leva a estudar o seu caso é avaliar a microbiota dos pacientes pré e pós transplante de células tronco, que deve nos fornecer dados sobre a microbiota de um paciente doente, antes do Transplante de Medula Óssea e de um paciente em remissão profunda da doença de Crohn após transplante e se em algum momento houver qualquer recidiva se este paciente terá ou não alterações em sua microbiota intestinal, e se apresentar alguma alteração, você receberá um transplante de microbiota intestinal. Este estudo não irá interferir fisicamente em nada em você, apenas iremos recolher amostras de suas fezes para nelas analisar a Microbiota nela apresentada, e se apresentar alterações e se for necessário, realizaremos o implante de microbiota retirada do se doador.

Explicação do Estudo:

Para participar da pesquisa será necessária que o paciente tenha indicação para a realização do Transplante de Medula Óssea para tratar a Doença de Crohn.

O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões éticos profissionais de sigilo. Os resultados serão passados a você e permanecerão confidenciais. Você não será identificado(a) em nenhuma publicação científica que possa resultar desse estudo.

Riscos e Benefícios**Riscos**

O risco será mínimo devido a este estudo ser de análise de material, cujo material não necessita de intervenção para coletá-lo.

Risco de engravidar: Para pacientes do sexo feminino com potencial risco de gerar filhos: Você entende que o estudo pode envolver riscos para a Sra.(ao embrião, feto ou bebê em amamentação) que não são atualmente conhecidos, previstos ou pressupostos. O médico do estudo discutirá com a Sra. os métodos apropriados de controle de natalidade e que não interfiram com os resultados do estudo. e aplicável ao seu caso, o método de contracepção, indicado após a sua participação no estudo. Caso todos estes cuidados sejam tomados e ainda assim a sra. engravidar durante o estudo, ou suspeitar que possa estar grávida, a sra. informará imediatamente o médico do estudo e será imediatamente afastada do estudo e o médico do estudo vai decidir decidir com a sra. qual é a melhor conduta para o tratamento do seu diagnóstico durante a gravidez. Além disso, o médico do Estudo lhe dará assistência, por meio de acompanhamento durante todo o seu período de gravidez até o nascimento do seu filho. A Sra. não poderá participar deste estudo se estiver grávida ou amamentando.

Benefícios:

O benefício será o de conseguir por meio da Microbiota analisar qual problema continua apresentando o paciente, e a melhor forma de tratá-lo.

Embora ainda não tenha sido efetivamente estudado o benefício desta análise, o que se espera deste estudo é que ao acompanhar os pacientes possa fazer um acompanhamento detalhado das condições de saúde destes pacientes, podendo ser diagnosticado a qualquer momento se algo acontecer de inesperado. Ficando então aqui a sua contribuição para os pacientes que futuramente forem se submeter a este tipo de tratamento.

Custos Adicionais e Ressarcimento

A participação na pesquisa não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional. Caso ocorra algum dano a você, lhe será dada assistência médica dentro da própria clínica onde se realiza o estudo.

No caso do participante ser uma pessoa com capacidade mental ou autonomia reduzida, o presente termo deverá ser lido na frente de testemunha imparcial e acompanhado por seu representante legal, sem envolvimento com a pesquisa. Essa pessoa deverá assinar o termo certificando que todas as informações foram dadas ao voluntário, ou seu representante legal, e que as perguntas suscitadas pelos mesmos foram amplamente esclarecidas pelo pesquisador.

O voluntário, ou seu representante legal, caso não assinem deverão como substituição colocar sua impressão datiloscópica ao Termo de Consentimento.

Direitos do paciente

Assinando esse consentimento, o (a) senhor (a) não desiste de nenhum de seus direitos. Além disso, o(a) senhor(a) não libera os investigadores de suas responsabilidades legais e profissionais no caso de alguma situação que lhe prejudique. A sua participação é inteiramente voluntária.

Uma vez aceitando participar desta pesquisa, o(a) Sr(a) terá total liberdade para abandonar o estudo a qualquer momento, sem que isto afete o seu cuidado ou tratamento futuro nesta clínica. O seu médico também poderá retirá-lo do estudo a qualquer momento, se ele julgar que seja necessário para o seu bem estar.

Caso surja alguma dúvida quanto aos procedimentos a serem realizados, o Sr(a) deverá se reportar ao Investigador Principal, o Dr. Mikael Alexandre Gouvea Faria pelo tel. (17) 3203-4777; Caso surja alguma dúvida quanto à ética do estudo, o(a) Sr (a) deverá se reportar ao Comitê de Ética em Pesquisas envolvendo seres humanos – subordinado ao Conselho Nacional de Ética em Pesquisa, órgão do Ministério da Saúde, através de solicitação ao representante de pesquisa, que estará sob contacto permanente, ou contactar diretamente o referido Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Associação Portuguesa de Beneficência, pelo telefone (17) 2139-1800.

O(A) Sr(a) tem direito ao completo sigilo de sua identidade quanto a sua participação neste estudo, incluindo a eventualidade da apresentação dos resultados deste estudo em congressos médicos e jornais científicos.

Eu, _____,

Ou o seu Representante Legal: _____,

fui informado(a) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada esclarecendo minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim o desejar. O Dr. Mikael Alexandre Gouvea Faria certificou-me de que todos os dados da pesquisa são confidenciais.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia desse termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada oportunidade de ler e esclarecer minhas dúvidas.

São José do Rio Preto, _____ de _____ de 20____.

Paciente da Pesquisa

Nome: _____.

Assinatura: _____.

Representante Legal(se necessário):

Nome: _____.

Assinatura: _____.

Testemunha:

Nome: _____.

Assinatura: _____.

ANEXO 2 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

- DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA	
Título da Pesquisa: Análise da microbiota intestinal em pacientes com doença de Crohn antes e após transplante de medula óssea	
Pesquisador Responsável: MIKAELL ALEXANDRE GOUVEA FARIA	
Área Temática:	
Versão: 2	
CAAE: 52003115 3 0000 5629	
Submetido em: 08/01/2016	
Instituição Proponente: KAISER CLINICA E HOSPITAL DIA	
Situação da Versão do Projeto: Aprovado	
Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável	
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio	
Comprovante de Recepção:  PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_651181	