

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

BRUNA ROSA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DO MICROBIOMA FECAL DE PACIENTES COM
RETocolite ulcerativa ATRAVÉS DE *METABARCODING***

**MACEIÓ – AL
2021**

BRUNA ROSA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DO MICROBIOMA FECAL DE PACIENTES COM
RETÓCOLITE ULCERATIVA ATRAVÉS DE *METABARCODING***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à coordenação do curso de Farmácia da Universidade Federal de Alagoas, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Cristina de Albuquerque Maranhão.

MACEIÓ

2021

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecário: Cláudio César Temóteo Galvino – CRB4/1459

- S586c Silva, Bruna Rosa da.
Caracterização do microbioma fecal de pacientes com retocolite ulcerativa através de *Metabarcoding* / Bruna Rosa da Silva. – 2021.
95 f.: il.
- Orientadora: Fernanda Cristina de Albuquerque Maranhão.
Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Farmácia) – Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2021.
- Bibliografia: f. 70-84.
Apêndices: f. 85-90.
Anexos: f. 91-95.
1. Retocolite ulcerativa. 2. Microbiota. 3. Disbiose. 4. *Metabarcoding*. I. Título.


CDU: 579.61

FOLHA DE APROVAÇÃO

BRUNA ROSA DA SILVA


CARACTERIZAÇÃO DO MICROBIOMA FECAL DE PACIENTES COM RETocolite ULCERATIVA ATRAVÉS DE *METABARCODING*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à coordenação do curso de Farmácia da Universidade Federal de Alagoas, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Farmácia, sob orientação da Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Cristina de Albuquerque Maranhão.


 Documento assinado digitalmente
Fernanda Cristina de Albuquerque Maranhão
Data: 23/11/2021 09:23:14-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Cristina de Albuquerque Maranhão
(ICBS-UFAL) (Orientadora)

Banca Examinadora:

 Documento assinado digitalmente
JUNIA ELISA CARVALHO DE MEIRA
Data: 23/11/2021 07:12:52-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

(Msc. Junia Elisa Carvalho de Meira) (HUPAA-UFAL)

 Documento assinado digitalmente
Manoel Alvaro de Freitas Lins Neto
Data: 22/11/2021 19:25:56-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

(Prof Dr. Manoel Alvaro de Freitas Lins Neto) (FAMED-UFAL)

AGRADECIMENTOS

A Deus, que nunca me abandonou, continuou me guiando e fortalecendo nos momentos em que eu estava mais abatida. Sou eternamente grata a ti Senhor, por me abençoar tanto, em todos os sentidos.

À minha querida mãe, Ana Maria, por ser minha melhor amiga, por seu amor, suas orientações e todo cuidado que me proporcionou ao longo desses anos, além de ser uma das maiores incentivadoras para concluir essa graduação.

Ao meu amado pai, Antônio Rosa, por ser o alicerce da minha família, exemplo de bom caráter, compromisso e responsabilidade, maior incentivador para que eu ingressasse na universidade e pudesse concluir o curso, possibilitando que eu me dedicasse aos estudos durante esses anos.

Obrigada por me guiarem pelos melhores caminhos, tudo que sou é devido a vocês, cada coisa que faço é para proporcionar a vocês orgulho e felicidade. Essa é uma forma de retribuir uma pequena porcentagem de tudo que depositaram em mim (amor, apoio e incentivo) para que eu seguisse minha jornada.

Ao meu querido irmão, Gustavo Lucas, por seu companheirismo, amor, compreensão e sua alegria a cada conquista.

Aos meus familiares, em especial aos meus avós maternos Otávio Correia (*in memoriam*) e Maria José, e avós paternos, Antônio Rosa (*in memoriam*) e Neuza Maria, pelo seu carinho e por me inspirarem com suas histórias de garra, superação e amor.

Aos meus amigos, Andressa Ferreira, Bianca Freitas, Bruna Diniz e Deivysson Bruno que conheci durante a graduação, que compartilharam comigo momentos inesquecíveis e muito felizes dessa caminhada.

A minha orientadora Prof^ª Dr^ª Fernanda Cristina de Albuquerque Maranhão, por ter aberto as portas do Laboratório de Microbiologia Clínica (LMC/UFAL), por todas as palavras, paciência, ensinamentos e oportunidades.

A colega de laboratório Camila, pelo acolhimento e suporte nos momentos que precisei, aos colegas do Laboratório de Micologia (Labmicol/UFAL) sob comando da Prof^ª Dr^ª Denise

Wanderlei, pelo acolhimento e companheirismo. Obrigado especial ao Marcílio, por possibilitar acompanhar a sua rotina de atividades para obter resultados para dissertação de seu mestrado e pelos conhecimentos passados, e à técnica do Setor de Microbiologia Msc. Emmily Margate por todo auxílio prestado.

Aos colegas que passaram e fazem parte do Instituto de Habilidades Multiprofissional de Microbiota Intestinal (InHaMMI) sob comando do Prof Dr Manoel Alvaro de Freitas Lins Neto, pelo acolhimento, a troca de conhecimento e a experiência multiprofissional, que enriqueceram a minha formação, em especial a Júnia, Lucas e Cláudia.

A todos que diretamente ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

“Peça a Deus que abençoe os seus planos, e eles darão certo.”

– Provérbios 16:3

RESUMO

O trato gastrointestinal humano é composto por milhões de micro-organismos que formam a microbiota intestinal (MI) e atua na modulação do metabolismo e da imunidade, visando a homeostase. O desequilíbrio quantitativo e/ou qualitativo da MI (disbiose) tem sido associado ao desenvolvimento e manutenção de doenças inflamatórias intestinais (DIIs), como a retocolite ulcerativa (RCU), que apresenta patogênese complexa e afeta a camada protetora da mucosa do cólon. Sendo assim, objetivou-se identificar a composição do microbioma intestinal de pacientes com RCU utilizando sequenciamento de DNA de alto rendimento (*metabarcoding*) e comparando com a MI de indivíduos saudáveis. Efetivou-se estudo do tipo caso-controle com pacientes voluntários diagnosticados com RCU (grupo teste) no Hospital Universitário Professor Alberto Antunes (HUPAA), com aplicação de questionário estruturado e obtenção de informações com base em prontuários. Indivíduos sem DIIs cadastrados como doadores saudáveis em um repositório de material fecal passaram pelas mesmas etapas dos pacientes para compor o grupo controle. Pacientes e doadores saudáveis foram encaminhados para exames laboratoriais e coletaram amostras de fezes individualmente com *kit* estéril. Uma alíquota foi enviada à empresa Probiome® para extração de DNA e sequenciamento de região do 16S rDNA, através da técnica de *metabarcoding* pela plataforma Illumina®, enquanto outra parte foi processada em laboratório (pesagem, filtração e diluição) para armazenamento a -80°C em repositório. Ferramentas bioinformáticas foram utilizadas para organizar as *reads* sequenciadas usando QIIME2 (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*, versão 1.9.1), e o *software on-line MicrobiomeAnalyst* foi usado para gerar unidades taxonômicas operacionais (OTUs) com classificação filogenética de filo à gênero. Dezoito pacientes com RCU responderam a questionário estruturado e detectou-se diferentes situações clínicas: colite distal (44,44%), pancolite (50%) e 5,56% dos pacientes com ambas extensões da doença. Sete pacientes (38,88%) possuíam comorbidades além de RCU, como diabetes (11,11%) e hipertensão (16,67%), controladas por medicação específica. Em relação aos exames laboratoriais, destaca-se que 13 pacientes (72,2%) apresentaram calprotectina fecal (CF) elevada e 8 (44,44%) foram reagentes ao exame de Proteína C-reativa. Após as indicações taxonômicas de OTUs, constatou-se que membros dos filos Bacteroidetes e Firmicutes foram predominantes em 13 (72,22%) e 16 (88,89%) pacientes, respectivamente, acompanhados de abundância relativa de Proteobacteria aumentada 72,22% (13). As famílias Bacteroidaceae, Ruminococcaceae, Lachnospiraceae e Prevotellaceae apresentaram importantes variações nos pacientes (10% à 47%, 1% à 28% e de 1% à 52%, respectivamente), com presença de *Escherichia-Shigella* em 5 (27,78%). Entre os pacientes, 2 apresentaram discrepâncias em seus microbiomas, como ausência de Prevotellaceae em um e outro com cerca de 70% do microbioma sem identificação. A depender da condição clínica do paciente (medida pelo marcador inflamatório CF), constatamos *Bacteroides* spp. e *Faecalibacterium* spp. em abundância relativa alta em quadros de remissão da RCU, enquanto que pacientes com RCU ativa apresentara abundância da família Prevotellaceae. *Roseburia* spp. e *Faecalibacterium* spp. foram identificados em abundância nos indivíduos saudáveis (controle), além de constatar a ausência de *Escherichia-Shigella* neste grupo. Importantes diferenças em relação às enterobactérias (Filo Proteobacteria) foram observadas ao comparar os microbiomas de pacientes com RCU com grupo controle, havendo abundância destas nos pacientes e ausência no microbioma saudável. Padrões de disbiose característicos foram identificados no microbioma RCU com possíveis marcadores microbianos, e a identificação de elevadas concentrações de micro-organismos benéficos no grupo controle indicou potencial para uso em transplante de microbiota fecal para beneficiar pacientes com RCU.

PALAVRAS-CHAVE: Retocolite ulcerativa, microbiota, disbiose, *metabarcoding*.

ABSTRACT

The human gastrointestinal tract is composed of millions of microorganisms that form the intestinal microbiota (IM), which act in the modulation of metabolism and immunity aiming at homeostasis. The quantitative and/or qualitative imbalance of IM (dysbiosis) has been associated with the development and maintenance of inflammatory bowel diseases (IBDs), such as ulcerative colitis (UC), which has a complex pathogenesis and affects the protective layer of the colonic mucosa. Therefore, the objective was to identify the composition of the intestinal microbiome of patients with UC using high-throughput DNA sequencing (metabarcoding), comparing it with the IM of healthy individuals. A case-control study was carried out with volunteer patients diagnosed with UC (test group) at the Professor Alberto Antunes University Hospital (HUPAA), with application of a structured questionnaire and obtaining information based on medical records. Individuals without IBD registered as healthy donors in a fecal material repository went through the same steps as the patients to compose the control group. Both patients and healthy donors were referred for laboratory tests and individually collected stool samples with a sterile kit. An aliquot was sent to the Probiome® company for DNA extraction and 16S rDNA sequencing, through the metabarcoding technique by the Illumina® platform, while another part was processed in the laboratory (weighing, filtration and dilution) for storage at - 80°C in a repository. Bioinformatics tools were used to organize the sequenced reads using QIIME2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology, version 1.9.1), and the online software MicrobiomeAnalyst was used to generate operational taxonomic units (OTU) with phylogenetic classification from phylum to genus. Eighteen patients with UC answered a structured questionnaire and different clinical situations were detected: distal colitis (44.44%), pancolitis (50%) and 5.56% of patients with both extensions of the disease. Seven patients (38.88%) had comorbidities in addition to UC, such as diabetes (11.11%) and hypertension (16.67%), controlled by specific medication. Regarding laboratory tests, it is noteworthy that 13 patients (72.2%) had high fecal calprotectin (FC) and 8 (44.44%) were reactive to the C-reactive protein test. After the taxonomic indications of OTUs, members of the phyla Bacteroidetes and Firmicutes were found to be predominant in 13 (72.22%) and 16 (88.89%) patients, respectively, accompanied by an increased relative abundance of Proteobacteria 72.22% (13). The Bacteroidaceae, Ruminococcaceae, Lachnospiraceae and Prevotellaceae families showed important variations in patients (10% to 47%, 1% to 28% and 1% to 52%, respectively), with the presence of *Escherichia-Shigella* in 5 (27.78%). Among the patients, two had discrepancies in their microbiomes, such as the absence of Prevotellaceae in one and another with about 70% of the microbiome without identification. Depending on the patient's clinical condition (measuring by the inflammatory marker CF), we found *Bacteroides* spp. and *Faecalibacterium* spp. in high relative abundance in cases of UC remission, while patients with active UC had an abundance of the Prevotellaceae family. *Rosebury* spp. and *Faecalibacterium* spp. were identified in abundance in healthy individuals (control), in addition to noting the absence of *Escherichia-Shigella* in this group. Important differences in relation to enterobacteria (Phylum Proteobacteria) were observed when comparing the microbiomes of patients with UC with a control group, with an abundance of these in patients and absence in the healthy microbiome. Characteristic dysbiosis patterns were identified in the RCU microbiome with possible microbial markers, and the identification of high concentrations of beneficial microorganisms in the control group indicated potential for use in faecal microbiota transplantation to benefit patients with UC.

KEYWORDS: Ulcerative colitis, microbiota, dysbiosis, metabarcoding.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática das condições de eubiose e disbiose intestinal.....	18
Figura 2 - Representação esquemática dos fenótipos de doença inflamatória intestinal, doença de Crohn e retocolite ulcerativa.....	20
Figura 3 - Avaliação por colonoscopia do lúmen do intestino grosso em diferentes gravidades da retocolite ulcerativa.....	21
Figura 4 - Esquema representativo da fisiopatologia da retocolite ulcerativa.....	21
Figura 5 - Representação esquemática dos sinais e sintomas da retocolite ulcerativa.....	22
Figura 6 - Incidência global da retocolite ulcerativa.....	23
Figura 7 - <i>Ruminococcus gnavus</i> em micrografia após coloração com azul de metileno.....	25
Figura 8 - <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> visualizado através da microscopia eletrônica de varredura.....	26
Figura 9 - <i>Roseburia intestinalis</i> em microscopia fluorescente.....	28
Figura 10 - <i>Akkermansia muciniphila</i> por micrografia eletrônica de varredura.....	35
Figura 11 - Componentes do kit B-CAL-EX para realizar o exame de dosagem de calprotectina (Bühlmann®). A. Cassete de teste. B. Tubo Calex® com tampão.....	43
Figura 12 - Kit para coleta individual de amostra fecal cedido pela Probiome®.....	44

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Perfil microbiológico quanto à diversidade filogenética de pacientes diagnosticados com retocolite ulcerativa.....	50
Gráfico 2 - Famílias de bactérias identificadas em amostras fecais de pacientes com retocolite ulcerativa.....	51
Gráfico 3 - Gêneros de bactérias identificados nas amostras fecais dos pacientes com retocolite ulcerativa.....	52
Gráfico 4 - Filos de bactérias identificados nas amostras fecais de indivíduos sem doenças inflamatórias intestinais.....	59
Gráfico 5 - Famílias de bactéria identificadas nas amostras fecais de indivíduos sem doenças inflamatórias intestinais.....	60
Gráfico 6 - Gêneros de bactérias identificados nas amostras fecais de indivíduos sem doenças inflamatórias intestinais.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Perfil sociodemográfico dos pacientes retocolite ulcerativa do HUPAA/UFAL....	46
Tabela 2 - Situação clínica dos pacientes referente a retocolite ulcerativa.....	48
Tabela 3 - Exames laboratoriais de pacientes com retocolite ulcerativa.....	49
Tabela 4 - Caracterização geral do microbioma de pacientes com retocolite ulcerativa em fase ativa e em remissão de acordo com conteúdo de unidades taxonômicas.....	55
Tabela 5 - Organização das características clínicas associadas com o perfil do microbioma de pacientes com retocolite ulcerativa.....	56
Tabela 6 - Perfil sociodemográfico dos indivíduos saudáveis selecionados após aplicação de questionário.....	58
Tabela 7 - Comparativo entre os microbiomas de pacientes com retocolite ulcerativa e indivíduos sem doenças inflamatórias intestinais.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MI	Microbiota intestinal
TGI	Trato gastrointestinal
DII	Doença Inflamatória Intestinal
DC	Doença de Crohn
AGCCs	Ácido Graxo de Cadeia Curta
PSA	Polissacarídeo A
VME	Vesículas da Membrana Externa
ROS	Reativas de Oxigênio
rRNA	<i>Ribosomal ribonucleic acid</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	Caracterização geral da microbiota intestinal.....	17
2.2	Retocolite ulcerativa.....	19
2.3	Bactérias recorrentes na microbiota intestinal da retocolite ulcerativa.....	24
2.3.1.	Filo Firmicutes.....	24
2.3.1.1	Família Ruminococcaceae.....	25
2.3.1.2	Família Lachnospiraceae.....	27
2.3.2	Filo Bacteroidetes.....	28
2.3.3	Filo Proteobacteria.....	30
2.3.3.1	Família Enterobacteriaceae.....	31
2.3.4	Filo Fusobacteria.....	33
2.3.4.1	Família Fusobacteriaceae.....	33
2.3.5	Filo Verrucomicrobia.....	34
2.3.6	Filo Actinobacteria.....	36
2.3.6.1	Família Bifidobacteraceae.....	36
2.4.	Estudo do microbioma.....	38
3	OBJETIVOS.....	40
3.1	OBJETIVO GERAL.....	40
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
4	METODOLOGIA	41
4.1	Aspectos éticos	41
4.2	Local e população de estudo	41
4.3	Análise de exames laboratoriais.....	42
4.4	Coleta do material fecal	43
4.5	Extração de DNA e amplificação da região 16S (Metabarcoding) para análise do microbioma fecal	44
4.6	Análises bioinformáticas	45
5	RESULTADOS	46
5.1	Caracterização dos pacientes com retocolite ulcerativa	46
5.2	Avaliações dos exames laboratoriais	47
5.3	Identificação da comunidade microbiana em pacientes com retocolite ulcerativa	50
5.3.1	Correlação do microbioma com situação clínica do paciente	54
5.4	Perfil e identificação da comunidade microbiana intestinal de indivíduos saudáveis (sem doenças inflamatórias intestinais)	58
5.4.1	Comparação entre microbiomas de indivíduos saudáveis e portadores de retocolite ulcerativa.....	61
6	DISCUSSÃO	63
7	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS	71

APÊNDICE	85
APÊNDICE 1 - QUESTIONÁRIO ESTRUTURADO UTILIZADO NA PESQUISA....	86
APÊNDICE 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	89
ANEXO	91
ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA	92

1 INTRODUÇÃO

A microbiota intestinal (MI) humana abrange um ecossistema formado por milhões de micro-organismos que estão presentes no trato gastrointestinal (TGI), atuando na modulação do metabolismo e na imunidade com o objetivo de manter a homeostase do organismo (SHEN et al., 2018; GLASSNER et al., 2020). No sítio intestinal, constitui-se como uma microbiota saudável aquelas que apresentam determinados gêneros presentes de maneira majoritária (por exemplo, *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp.), enquanto os micro-organismos com potencial patogênico devem colonizar o TGI em proporções pequenas e preferencialmente de forma transitória, não sendo prejudicial nessa situação (SHEN et al., 2018).

A disbiose intestinal resulta da alteração quantitativa e qualitativa da microbiota, e tais alterações podem ter diversas origens, como por exemplo, fatores ambientais que podem promover mudanças no ambiente enteral em indivíduos geneticamente suscetíveis (GLASSNER et al., 2020). Fatores deletérios podem induzir a uma diminuição significativa dos gêneros que deveriam ser dominantes e o aumento dos micro-organismos negativos, que deveriam estar em menor quantidade, desencadeando um desequilíbrio da MI (SHEN et al., 2018; GLASSNER et al., 2020).

As doenças inflamatórias intestinais (DIIs) são doenças crônicas imuno-mediadas que afetam o trato gastrointestinal e incluem mais frequentemente os subtipos retocolite ulcerativa (RCU) e doença de Crohn (DC) (PORTER et al., 2020; GLASSNER et al., 2020). Nos últimos anos, as DIIs vem apresentado-se em ascensão mundial (STANGE; SCHROEDER, 2019), e em países desenvolvidos mostra-se com alta prevalência, estimando-se que em 2025 poderá chegar a 30 milhões de indivíduos afetados, de acordo com Porter e colaboradores (2020).

Descrita pela primeira vez por Samuel Wilks em 1859, a RCU é uma doença inflamatória recidiva e crônica idiopática do cólon e que causa inflamação mucosa contínua que se estende do reto ao cólon mais proximal, com extensões variáveis (DAMMAN et al., 2015; GAJENDRAN et al., 2019). Apresenta-se clinicamente com casos de presença de sangue nas fezes com ou sem muco, urgência retal, tenesmo e graus variáveis de dor abdominal, com alterações inflamatórias restritas principalmente ao intestino grosso (GAJENDRAN et al., 2019; NEURATH; LEPPKES, 2019; SUN et al., 2019).

Shen e colaboradores (2018) citaram que nos indivíduos portadores de DII ocorrem quedas em comunidades anaeróbicas (p. ex., Firmicutes) e aumento de patógenos condicionais (p. ex., *Enterobacter* spp.), bactérias aeróbias facultativas e bactérias intestinais não dominantes. A patogênese da RCU é complexa e acredita-se que seja mediada por fatores de risco como a suscetibilidade genética, desregulação microbiana, fatores ambientais e

imunológicos; porém, a etiologia permanece incerta e faltam métodos terapêuticos eficazes para a doença (SHEN et al., 2018; DAMMAN et al., 2015).

O microbioma intestinal tem sido descrito com diferenças significativas em sua composição entre indivíduos saudáveis e aqueles com DII (KOZIK et al., 2019). Pesquisadores observaram que o uso de antibióticos e probióticos para o tratamento de RCU demonstraram alguma melhora clínica, sugerindo que a alteração da microbiota pode ser uma estratégia bem sucedida para alcançar o controle da doença em alguns pacientes (KHAN et al., 2011; MEIJER; DIELEMAN, 2011). Dessa forma, é importante avaliar o cenário microbiológico associado a RCU e DC, identificando as comunidades microbiológicas de forma quantitativas e qualitativas que podem indicar uma assinatura microbiana nas principais DIIs.

Os estudos moleculares com técnicas avançadas de sequenciamento de alto rendimento e ferramentas bioinformáticas combinadas permitem isolar e identificar quais os conjuntos microbianos mais presentes baseando-se na concentração dos principais filos, famílias e gêneros na microbiota de um sítio anatômico específico (PREIDIS; VERSALOVIC, 2009; MANDAL et. al., 2015). Tais estudos focando o microbioma intestinal de indivíduos portadores de doenças como a RCU devem permitir a avaliação de quais gêneros microbianos estão mais frequentemente envolvidos na patogênese e na manutenção desta doença multifatorial, auxiliando no entendimento da mesma e com potencial de auxiliar na indicação de tratamentos focados em estabelecer a harmonia microbiana intestinal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caracterização geral da microbiota intestinal

A microbiota intestinal (MI) é composta por milhões de micro-organismos habitando todo o TGI humano, entre eles as bactérias anaeróbicas presentes majoritariamente na MI, contendo os gêneros mais abundantes pertencentes às famílias Bacteroidaceae, Prevotellaceae e Ruminococcaceae (KIM; JAZWINSKI, 2018). Durante o parto inicia-se a aquisição de micro-organismos, que o recém-nascido adquire a depender do tipo de parto por meio do contato com a via vaginal, das fezes materna e do ambiente, formando uma camada de colônias bacterianas na superfície da mucosa intestinal estabelecendo relações simbióticas com o hospedeiro (BECKER et al., 2015; KATAOKA, 2016).

No intestino grosso encontram-se 70% dos micróbios e uma baixa abundância do filo Proteobacteria e níveis altos de bactérias pertencentes aos gêneros *Bacteroides*, *Prevotella* e *Ruminococcus* em uma microbiota saudável (JANDHYALA, 2015; ILJAZOVIC et al., 2021). Em geral, há uma estabilidade da microbiota que ocorre aproximadamente aos 3 anos do indivíduo, podendo permanecer por décadas com mesmos os dados filogenéticos microbianos (KIM; JAZWINSKI, 2018).

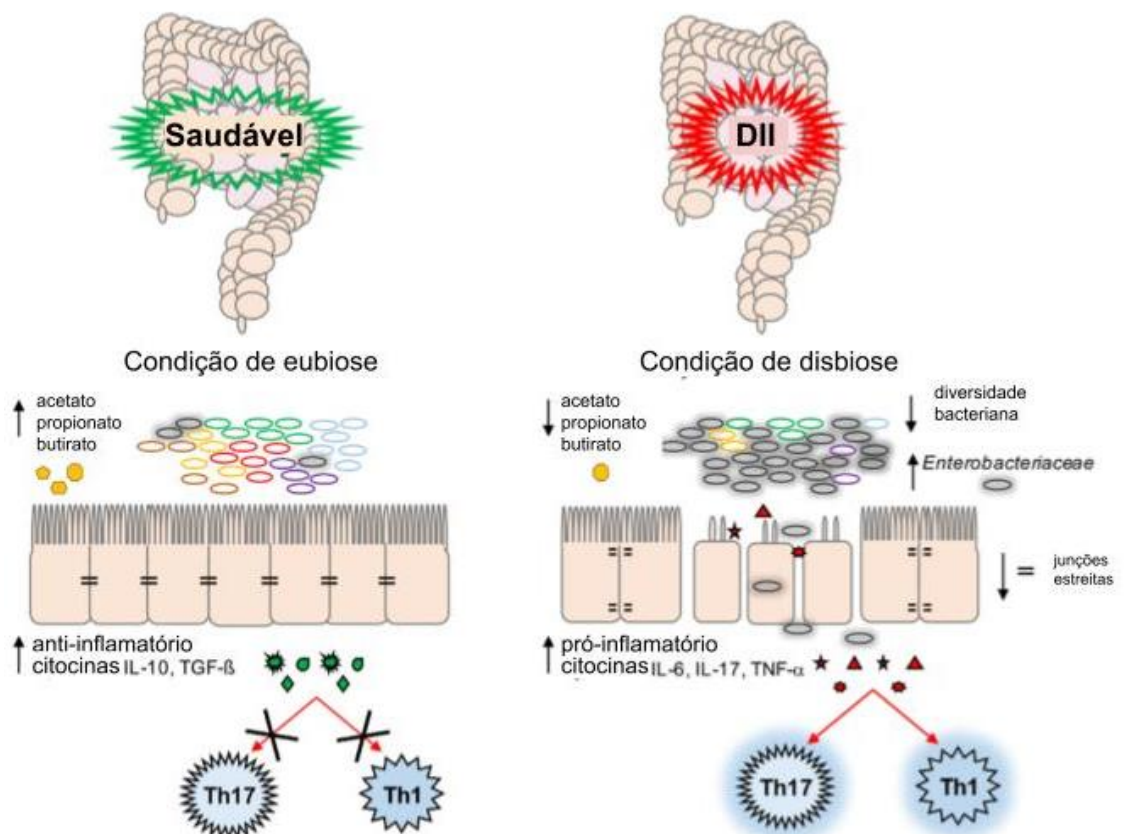
Becker e colaboradores (2015) trazem em seu estudo que durante os primeiros anos de vida, a complexidade da MI é menor devido a estar em processo de colonização e desenvolvimento. O desenvolvimento da MI envolve fatores nutricionais, ambientais e genéticos gerando alterações composicionais a curto e longo prazo, e essa contribuição favorece a diversidade da MI, em que as bactérias benéficas na mucosa promovem maturação do tecido intestinal, melhora o metabolismo e absorção de nutrientes e a produção de muco, fortalecendo os sistemas de proteção do hospedeiro (BECKER et al., 2015; KATAOKA, 2016).

Há uma relação estabelecida entre a microbiota residente do lúmen intestinal e o hospedeiro, relação em que há benefícios para ambas as partes (simbiose), em que para o hospedeiro a microbiota promove um papel importante no estado de boa saúde geral (JANDHYALA, 2015). A microbiota intestinal promove uma grande contribuição para a homeostase do TGI, p. ex., fornecer ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), fomentar a restrição de crescimento de patógenos e no auxílio do bom funcionamento do sistema imune. Já a modulação do sistema imune se dá através de citocinas anti-inflamatórias, como

interleucinas (IL)-10, Fator de crescimento Transformador (TGF)- β e menor ativação de células imunológicas T auxiliar (Th)17 e Th1 (BALDELLI et al., 2021).

Grande parte das bactérias possuem uma relação simbiótica com o hospedeiro, sendo a maioria anaeróbia e que estão ligadas às células epiteliais da mucosa, apresentando-se dominante na microbiota e que contribui na nutrição e regulação imunológica, como *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp. (SHEN et al., 2018; KATAOKA, 2016). Shen e colaboradores (2018) tratam em seu estudo que há também a presença de bactérias aeróbias facultativas não dominantes intestinais, que podem ser patógenos condicionais presentes na MI em determinadas concentrações, como as enterobactérias (Figura 1).

Figura 1 - Representação esquemática das condições de eubiose e disbiose intestinal.



Fonte: BALDELLI et al., 2021, p. 4.

As bactérias patogênicas não são encontradas a longo prazo na MI saudável ou estão em pequena quantidade, com potencial mínimo de patogenicidade, mas com mudanças consideráveis no ambiente enteral e externo que podem levar ao declínio da MI dominante,

levando à disbiose pela promoção de patógenos ou patógenos condicionais aumentados (SHEN et al., 2018); essas mudanças podem ser através da diminuição de AGCCs juntamente com aumento de citocinas pró-inflamatórias responsáveis pela ativação de Th17 e Th1 ligadas a resposta inflamatória. Nessas condições, com diminuição na diversidade e menor estabilidade intestinal, famílias bacterianas como a Enterobacteriaceae aumentam, potencializado também pela permeabilidade na mucosa intestinal devido às junções estreitas serem afetadas (BALDELLI et al., 2021).

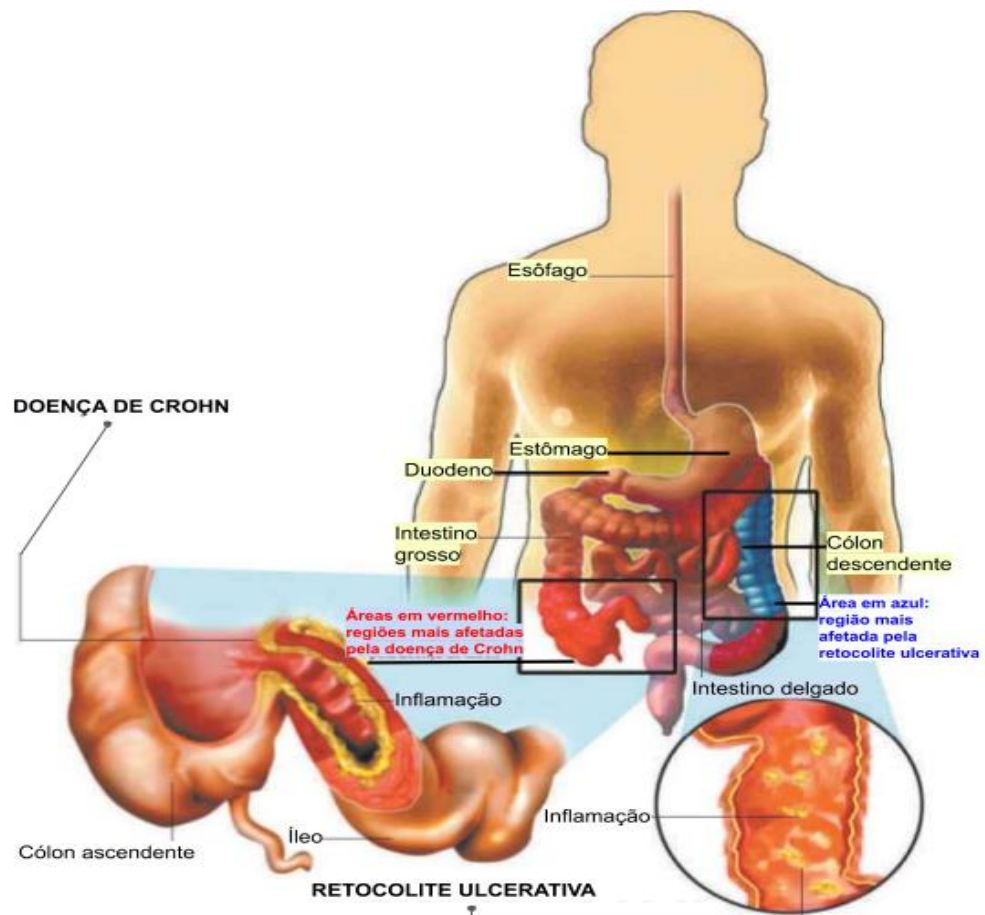
De maneira geral, a MI saudável possui filos dominantes, que são os Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria e Proteobacteria, além de grandes quantidades de espécies produtoras de butirato; o ambiente rico em butirato torna-se mais propenso à produção de hidrogênio, promovendo ao lúmen intestinal um ambiente de alta variabilidade em espécies (JANDHYALA et al., 2015, RIZZATTI et al., 2017). Com a redução das bactérias que se apresentam dominantes em microbiotas saudáveis, somada a menor diversidade da microbiota intestinal são consideradas características comuns da DII (KATAOKA, 2016).

2.2 Retocolite ulcerativa

As doenças inflamatórias intestinais (DIIs) são um conjunto complexo de doenças do TGI sem etiologia totalmente definida, de manifestação espontânea, crônicas e inflamatórias, sendo passíveis de recidivas no indivíduo afetado (BECKER et al., 2015). Sabe-se que a MI desempenha um papel importante no desenvolvimento e na manutenção de DIIs, bem como determinada suscetibilidade genética (WEINGARDEN; VAUGHN, 2017), havendo indicações de que a resposta imune desregulada do indivíduo contra integrantes da microbiota comensal do TGI está envolvida na fisiopatologia dessas doenças (BECKER et al., 2015).

As formas mais comuns de DIIs são a retocolite ulcerativa (RCU) e a doença de Crohn (DC), sendo a RCU restrita ao intestino grosso (Figura 2), caracterizando-se como uma doença inflamatória de patogênese complexa, em que a camada protetora da mucosa do cólon do paciente apresenta-se diminuída ou perdida como consequência da redução das células caliciformes produtoras de mucina e reação inflamatória excessiva (KATAOKA, 2016).

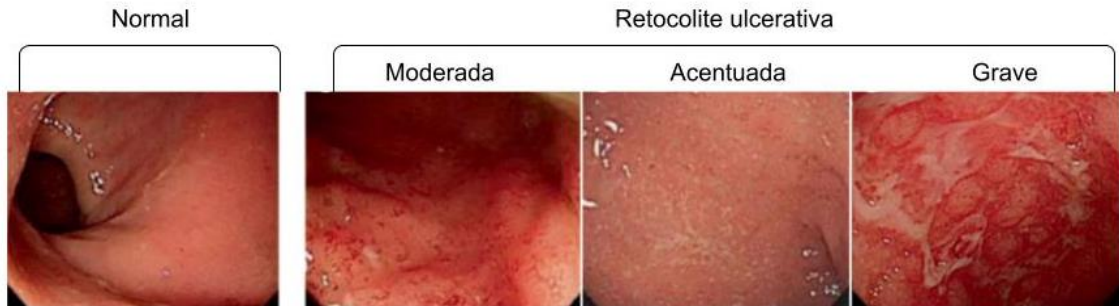
Figura 2 - Representação esquemática dos fenótipos de doença inflamatória intestinal, doença de Crohn e retocolite ulcerativa.



Fonte: Modificado de Pio (2014, p. 1)

Com a perda de mucina no cólon, há um aumento significativo da permeabilidade da mucosa afetando principalmente o cólon e o reto (Figura 3), podendo também atingir de forma contínua o intestino grosso a partir do reto e sua progressão pode levar à pancolite (SHEN, 2018; NEURATH; LEPPKES, 2019).

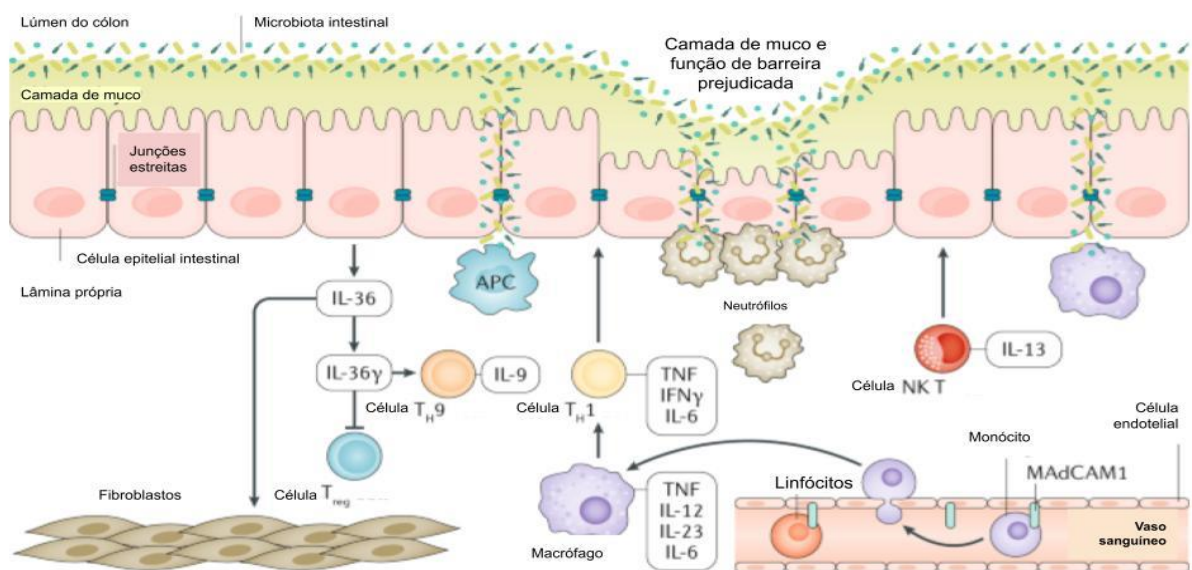
Figura 3 - Avaliação por colonoscopia do lúmen do intestino grosso em diferentes gravidades da retocolite ulcerativa.



Fonte: Kobayashi et al., 2020, p. 9.

A fisiopatologia da RCU inclui uma diminuição de AGCCs, o que leva a menor diversidade, alteração do perfil metabólico da MI e diminuição da camada de muco no lúmen intestinal (Figura 4); com a redução do muco, há uma quebra da barreira que facilita o contato de bactérias com o epitélio intestinal, situação que é potencializada com prejuízos nas funções das junções estreitas das células epiteliais, permitindo maior permeabilidade (PORTER et al., 2020; UNGARO et al., 2017). Assim, essa invasão bacteriana ativa células imunes inatas, como macrófagos e células apresentadoras de antígenos (APCs), que atraem neutrófilos através da liberação de quimiocinas (ÓRDAS et al., 2012; KOBAYASHI et al., 2020).

Figura 4 - Esquema representativo da fisiopatologia da retocolite ulcerativa



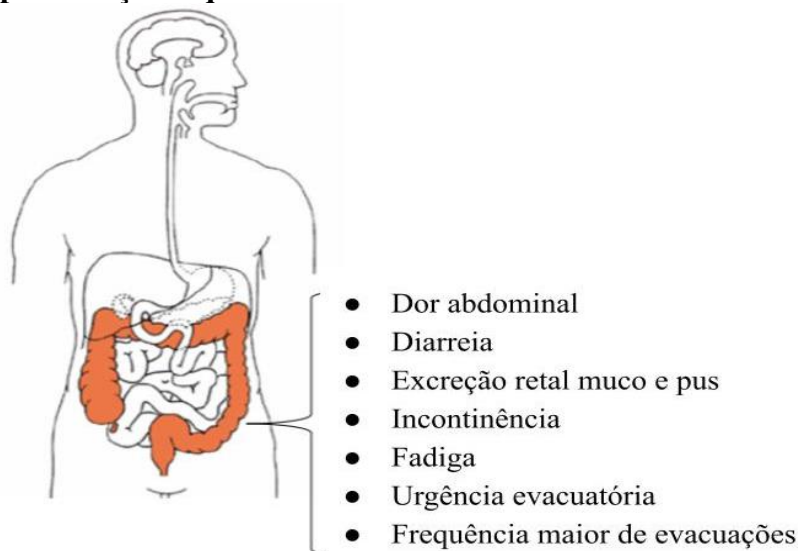
Fonte: Modificado de Kobayashi et al. (2020, p. 5.)

Após o reconhecimento dos antígenos luminiais pelas células imunes inatas e recrutamento de neutrófilos e monócitos, as células recrutadas infiltram-se no epitélio

promovendo o aumento na produção de citocinas inflamatórias TNF, IL-12, IL-23 e IL-6 (KOBAYASHI et al., 2020; YE; MCGOVERN, 2017). Observa-se também que IL-36 γ proveniente da expressão do epitélio intestinal atua na inibição de células T regulatórias (Treg) e aumenta produção de IL-9 e IL-36, que possui ativação na fibrogênese, bem como IL-13 advinda de células NK (Natural Killer) contribuem com a alteração na barreira intestinal (ÓRDAS et al., 2012).

As manifestações clínicas geralmente apresentadas pelos pacientes acometidos com RCU (Figura 5) são dores na região abdominal acompanhadas de diarreia com sangue, mas pode ocorrer também excreção retal de muco e pus, incontinência, fadiga, defecações noturnas e desconforto abdominal (cólicas) (DANESE; FIOCCHI, 2011; UNGARO, et al., 2017). Somado às sintomatologias mais comuns, pode haver manifestações extra-intestinais da pele, fígado, olhos ou articulações (SEGAL et al., 2021; NEURATH; LEPPKES, 2019).

Figura 5 - Representação esquemática dos sinais e sintomas da retocolite ulcerativa.



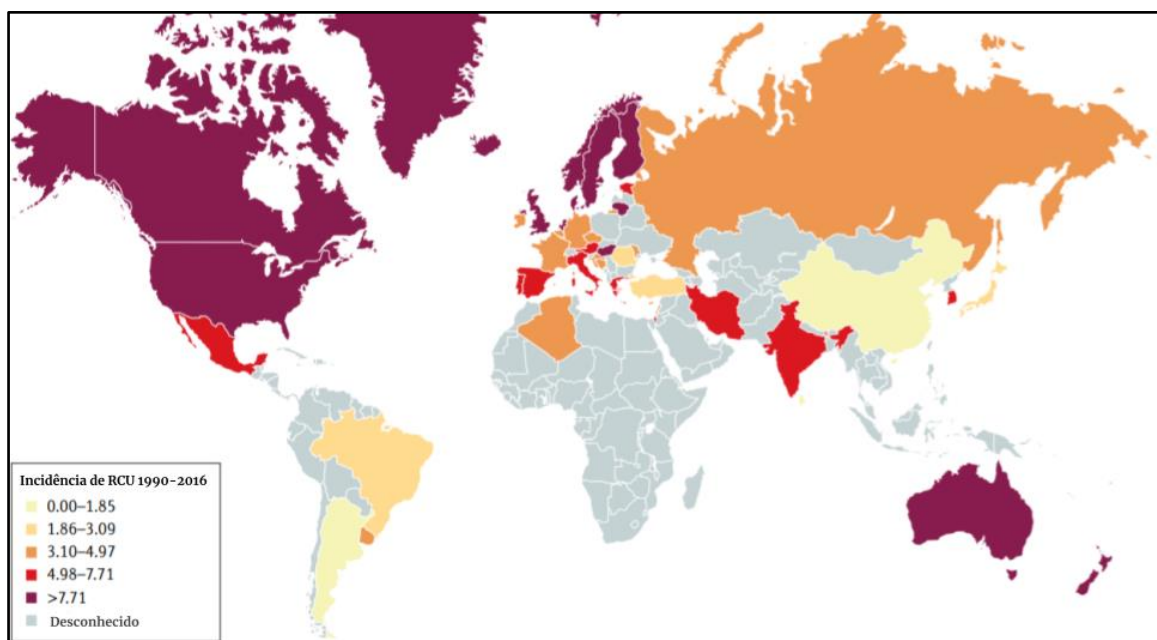
Fonte: Modificado do Centre de Radiologie Belledonne. (2019)

Acredita-se que a etiologia da RCU está relacionada à MI, é possível constatar um distúrbio quantitativo de espécies bacterianas nesta doença e uma microbiota mais instável ao longo do tempo quando comparada a um intestino saudável (BECKER et al., 2015). Observa-se em pacientes com RCU que há diminuição em relação à diversidade de bactérias de sua MI e que filos como Firmicutes, por exemplo, apresenta-se em menor proporção e há aumento significativo de Enterobacteriaceae (KATAOKA 2016; NICHOLSON et al. 2012).

Morgan e colaboradores (2012) relatam que na microbiota de indivíduos com DII há um aumento considerável em Actinobacteria e Proteobacteria e uma diminuição na diversidade da microbiota na DII. Com o declínio quantitativo da diversidade de Firmicutes e gêneros bacterianos anaeróbios pertencentes ao clostridial IV que possuem atividades associadas à proteção da mucosa, *Faecalibacterium* spp., *Bifidobacterium* spp., por exemplo, podem estar relacionadas com a diminuição da diversidade da MI em pacientes com DIIs (KANG et al. 2010).

O histórico familiar torna os indivíduos mais propensos ao desenvolvimento de DIIs, acredita-se que quando o parentesco é de primeiro grau o risco é aumentado em quatro vezes e muitos fatores podem influenciar para o desenvolvimento da RCU; observa-se também que a população judaica apresenta taxas altas de DIIs em relação às demais (UNGARO et al., 2017; ORDÁS et al., 2012), e que países desenvolvidos e em desenvolvimento possuem alta prevalência nas DIIs (Figura 6), estimando-se que em 2025 poderá chegar a 30 milhões de indivíduos afetados, de acordo com Porter e colaboradores (2020).

Figura 6 - Incidência global da Retocolite ulcerativa.



Fonte: Modificado de Kobayashi et al. (2020, p. 4)

Ordás e colaboradores (2012) citaram em seu estudo que alguns indivíduos que apresentaram episódios de infecção gastrointestinal, causados por *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Campylobacter* spp., por exemplo, o risco subsequente de desenvolverem RCU

aumentou. A apendicectomia pode conferir um possível proteção contra o desenvolvimento da RCU, reduzindo o risco nos casos de apendicite aguda, principalmente em pacientes jovens, possivelmente há um efeito imunomodulador que promove proteção ao desenvolvimento de RCU com a excisão do apêndice (ORDÁS et al., 2012; CHEN et al., 2018).

Outra situação que promove proteção do lúmen intestinal é a promoção do aumento da diversidade microbiana, fomentado pelo aleitamento materno, quando a amamentação ocorre em um tempo superior a três meses gera aumento na proteção da mucosa e diminui o risco da RCU, devido aos componentes presentes no leite materno serem capazes de atuar no desenvolvimento da imunidade inata da mucosa (UNGARO et al., 2017; XU, 2017).

2.3 Bactérias recorrentes na microbiota intestinal da retocolite ulcerativa

2.3.1. Filo Firmicutes

O filo Firmicutes é composto por bactérias Gram-positivas produtoras de butirato que compõem o lúmen da mucosa do TGI e contribuem para um ambiente de alta variabilidade em espécies e a homeostase intestinal (Consórcio do Projeto Microbioma Humano, 2013). A composição da MI de adultos saudáveis é composta majoritariamente por Firmicutes e Bacteroidetes, que juntos representam mais de 90% da comunidade microbiana, com isso Firmicutes é encontrado normalmente em níveis altos na mucosa intestinal (WEXLER, 2017; BECKER et al., 2015).

Quando comparados ao filo Bacteroidetes, o filo Firmicutes promove uma absorção mais eficiente de calorias, pois, apresentam alta eficiência em extrair energia dos alimentos; com a metabolização do substrato amido, por exemplo, para a produção de butirato e outros ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), o filo Firmicutes mostra-se com maior capacidade na captação de energia em relação ao filo Bacteroidetes, que também tem capacidade em extrair energia do amido (MAGNE et al, 2020; VACCA et al., 2020).

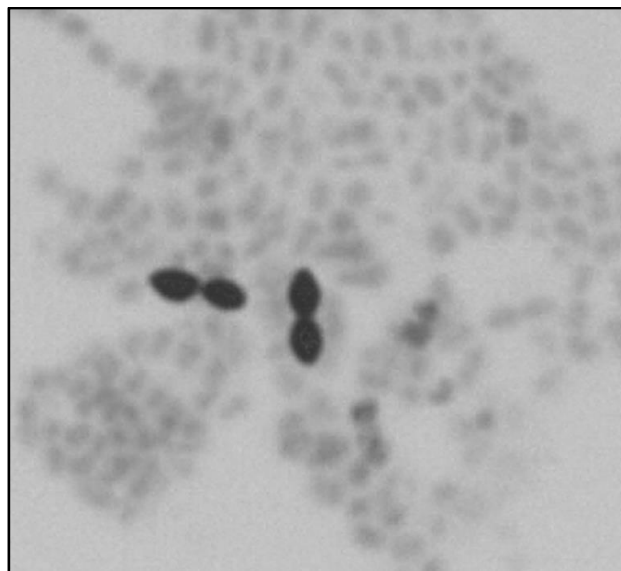
2.3.1.1 Família Ruminococcaceae

As bactérias da família Ruminococcaceae pertencem ao filo Firmicutes, a família abrange espécies que hidrolisam amido e outros açúcares para produzir butirato e outros AGCCs, função realizada também pelas famílias Lachnospiraceae e Lactobacillaceae (VACCA et al., 2020; SCOTT et al., 2015). Em algumas espécies da família Ruminococcaceae pode-se encontrar a capacidade de processar carboidratos não digeridos que beneficiam a produção de

AGCCs, que são encontrados em níveis diminuídos nas DIIs (KUMP et al., 2017; HIIPPALA et., 2018).

Na DII pode haver um aumento significativo de espécies de *Ruminococcus* spp. levando à degradação excessiva do muco, e dessa forma, facilitando que *Streptococcus* spp. infiltrem na mucosa causando inflamação, pois, o muco age como uma barreira protetora do lúmen intestinal (MAZZAWI et al, 2018). Henke e colaboradores (2019) relatam que *Ruminococcus gnavus*, por exemplo, possui uma relação importante na doença inflamatória intestinal (Figura 7), e sua alta prevalência tem sido associada à exacerbação dos sintomas de DC, representando em casos graves um pico de 69% da MI, enquanto em indivíduos saudáveis representa <0,1% da microbiota.

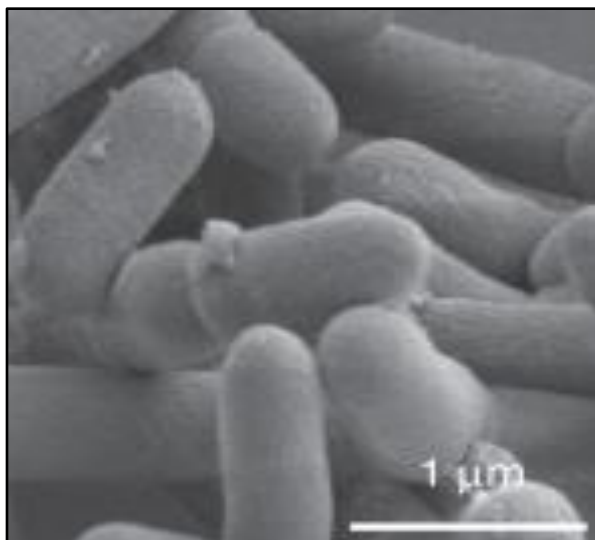
Figura 7 -*Ruminococcus gnavus* em micrografia após coloração com azul de metileno.



Fonte: Modificado de Hansen et al. (2013, p 2.)

Uma das principais espécies da família Ruminococcaceae é *Faecalibacterium prausnitzii*, um anaeróbio sensível à presença de oxigênio e considerada a bactéria comensal mais abundante do TGI de um adulto saudável (Figura 8), representando cerca de 2 a 15% da MI (HIIPPALA et al., 2018, LOPEZ-SILES et al., 2018). O metabolismo de *F. prausnitzii* permite a utilização de carboidratos mais complexos, sendo esta uma característica da espécie, pois, majoritariamente as bactérias utilizam açúcares simples como fonte de energia (KIM et al., 2020; HIIPPALA et al., 2018).

Figura 8 - *Faecalibacterium prausnitzii* visualizado através da microscopia eletrônica de varredura.



Fonte: Modificado de Miquel et al. (2013, p. 2.)

Devido à importância e sua quantidade significativa na microbiota de indivíduos saudáveis, *F. prausnitzii* pode ser utilizada como um possível marcador microbiológico para diagnóstico e prognóstico de DIIs, pois, se encontra em níveis baixos em pacientes com DII (KIM et al., 2020; KOWALSKA-DUPLAGA et al., 2019). Em experimentos realizados em murina por Hiippala e colaboradores (2018) foi observado que a presença de *F. prausnitzii* em quantidades significativas reduziram a gravidade da colite aguda e promoveram o aumento da secreção de IL-10 anti-inflamatório e uma menor secreção de citocinas pró-inflamatórias.

A espécie *F. prausnitzii* é um dos principais produtores de butirato, produto final resultante do processo da fermentação de glicose e acetato, a espécie também produz uma molécula anti-inflamatória microbiana (MAM) que mostrou atividade no alívio da inflamação intestinal e na restauração da mucosa epitelial (BELZER et al, 2017; XU, 2020). Ao participar da modulação imunológica a espécie também demonstrou atividade anti-inflamatória, inibindo a ativação do fator Kappa B (NF- κ B) através da produção de ácido salicílico por *F. prausnitzii*; esse ácido atua bloqueando a ativação NF- κ B e afetando a produção da IL-8 (interleucina pró-inflamatória) na liberação de citocinas, e favorece o aumento de citocinas anti-inflamatórias como, IL-10, e conseqüentemente, leva a um alívio na inflamação intestinal (HIIPPALA et al., 2018; KIM et al., 2020).

2.3.1.2 Família Lachnospiraceae

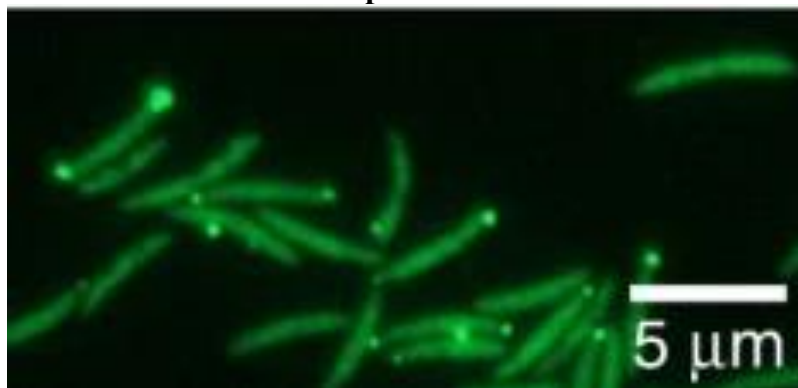
Os membros da família Lachnospiraceae pertencem ao aglomerado clostridial XIV do filo Firmicutes, são anaeróbios, fermentativos, quimiorganotróficos e algumas espécies contidas na família apresentam atividade de hidrólise, e estão entre os principais produtores de AGCCs (VACCA et al., 2020; KIM et al., 2018). A família é presente em alta concentração na MI de indivíduos saudáveis, colonizam o TGI desde o nascimento e durante toda a vida do indivíduo, aumentando sua variedade em espécies e sua abundância relativa para contribuir com a homeostase intestinal (VACCA et al., 2020; HIIPPALA et al., 2018).

As bactérias pertencentes à família Lachnospiraceae são capazes de realizar a conversão de ácidos biliares primários em secundários, contribuem para homeostase intestinal por meio também da produção de AGCCs e butirato, promovendo resistência à colonização contra patógenos diversos (SORBARA et al, 2020; VACCA et al., 2020). Segundo Vacca e colaboradores (2020), as bactérias pertencentes a esta família demonstram capacidade em utilizar polissacarídeos derivados da dieta, como a inulina, bem como o amido como fontes para produção de AGCCs.

O aumento das concentrações de AGCCs na mucosa intestinal pode levar a uma acidificação do lúmen do TGI, o que poderia ser uma contribuição da família Lachnospiraceae, levando a uma resistência à colonização de patógenos, como Enterobacteriaceae (SORBARA et al, 2020). Entretanto, o aumento da abundância de Lachnospiraceae pode estar associado ao envelhecimento, assim como essa taxa mostra-se elevada no lúmen intestinal em diversas doenças intra e extra intestinal (VACCA et al., 2020).

Um dos seus representantes é a bactéria Gram-positiva e anaeróbia *Roseburia intestinalis* (Figura 9), uma das espécies mais abundantes da MI saudável; o gênero *Roseburia* representa cerca de 0,9 a 5,0% da microbiota total e possui capacidade de produzir butirato, substância que beneficia a homeostase da microbiota do lúmen intestinal (HOLD et al., 2003). Entretanto, o gênero é encontrado em níveis baixos nas doenças do TGI, indicando um potencial de contribuição para homeostase da MI (MACHIELS et al., 2014; IMHANN et al., 2016).

Figura 9 - *Roseburia intestinalis* em microscopia fluorescente.



Fonte: La Rosa et al. (2019, p. 7.)

Em estudos realizados em camundongos, *R. intestinalis* promoveu ações anti-inflamatórias através da indução da produção em níveis maiores de citocinas anti-inflamatórias (IL-22) e redução de citocinas pró-inflamatórias (IFN γ e IL-17) (HOFFMANN et al., 2015; ZHU et al., 2018). Em indivíduos com DII há uma diminuição de *R. intestinalis* com *F. praunitzii* e outras espécies na microbiota do TGI, principalmente produtoras de butirato. Quando essa diminuição é vista somada a um aumento significativo de patógenos pertencentes à família Enterobacteriaceae, por exemplo, favorece o aparecimento da disbiose intestinal caracterizando a MI de um indivíduo com DII (IMHANN et al., 2016; HIIPPALA et al., 2018).

2.3.2 Filo Bacteroidetes

Membros dos filos Bacteroidetes e Firmicutes são predominantes nas microbiotas intestinais saudáveis dos seres humanos e colonizam principalmente o intestino grosso; além disso, o filo Bacteroidetes variam em abundância relativa entre os indivíduos, geralmente atingem a metade ou mais da MI (JANDHYALA et al., 2015; HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM, 2012). No filo Bacteroidetes encontramos bactérias Gram-negativas que vivem em diversos ecossistemas (livre no meio ambiente e na MI de animais), e habitam principalmente o intestino distal, contribuindo com a homeostase intestinal através da sua capacidade em fermentar polissacarídeos não digeríveis e fornecendo energia ao hospedeiro, além de produzir AGCCs (JOHNSON et al., 2017; LAPÉBIE et al., 2019).

Um dos gêneros que contribuem para a homeostase intestinal é *Bacteroides* encontradas no TGI, no trato respiratório superior e genital (ZHOU; ZHI, 2016), possuem efeitos promotores de saúde que ocorre através de moléculas imunomoduladoras excretadas que se

comunicam com o sistema imunológico do hospedeiro, e assim, podem atuar como protetoras contra DIIs (JACOBSON et al., 2018).

O polissacarídeo A (PSA) pode ser expresso por *Bacteroides* spp., e tem potencial para induzir o crescimento de células T regulatórias e a expressão de citocinas que são protetoras contra a RCU (ZHOU; ZHI, F., 2016). A comunicação entre *B.fragilis* e o sistema imunológico, por exemplo, se dá através de PSA liberadas pelas membranas bacterianas em vesículas de membrana externa (VMEs) para às células dendríticas, permitindo a interação de *Bacteroides* spp. com o epitélio intestinal através da camada de muco (HIIPPALA et al., 2018).

Uma das espécies mais abundantes do gênero é *B. fragilis*, um comensal humano com propriedades imunomoduladoras benéficas para o hospedeiro (CHU et al., 2016). *B. fragilis* também produz uma molécula imunomoduladora PSA, que ativa as respostas imunes dependentes de células T envolvidas na homeostase intestinal e na expressão de citocinas que são protetoras contra a colite (CHU et al., 2016; ZHOU; ZHI, F., 2016).

Schirmer e colaboradores (2018) mostram em seu estudo que ao comparar a microbiota de pacientes RCU e indivíduos que não possuíam DII foi visto que, *B. fragilis* apresentou-se em menor densidade em pacientes RCU. Em modelo de camundongo com colite induzida, o *B. fragilis* aumenta a expressão anti-inflamatória, por conseguinte, melhora os sintomas de colite e reforça a barreira epitelial, corrigindo a permeabilidade intestinal, alterações nas junções estreitas e expressão de citocinas (HIIPPALA et al., 2018; DONALDSON, 2018).

Um dos gêneros pertencentes ao filo Bacteroidetes é *Prevotella* spp. com mais de 80 espécies majoritariamente identificadas na cavidade oral, enquanto cerca de 10 espécies foram identificadas na MI humana (ILJAZOVIC et al., 2021). *Prevotella* spp. são encontrados principalmente em indivíduos que fazem consumo maior de plantas, como aqueles que vivem em sociedades agrárias e não ocidentalizadas (GORVITOVSKAIA et al., 2016; TETT et al., 2019).

O aumento da concentração de espécies de *Prevotella* necessita de derivados de plantas que são fontes de polissacarídeos complexos, e acredita-se que os hábitos alimentares sejam responsáveis pela concentração destas bactérias, pois, em sociedades ocidentais há menor prevalência quando comparada às orientais (ILJAZOVIC et al., 2021).

Prevotella spp. desempenham atividades benéficas à homeostase intestinal, entretanto, há estudos que relatam a atuação de algumas espécies na contribuição no desenvolvimento das

doenças inflamatórias (ILJAZOVIC et al., 2021; VIGSNÆS et al., 2012). *P. copri* é encontrada em indivíduos saudáveis atuando na tolerância da glicose e da insulina, mas tem sido associada também a microbiota de pacientes com DIIs, estimulando a produção de interleucinas (IL- 8, IL- 6) que podem promover respostas imunes e recrutamento de neutrófilos para a mucosa (LARSEN, 2017; TETT et al., 2019). Vignæs e colaboradores (2012) observaram que pacientes com recaída na RCU apresentavam maior quantidade de *Prevotella* spp. em relação aos pacientes considerados saudáveis.

Em modelos experimentais para RCU, Iljazovic e colaboradores (2021) confirmaram que *Prevotella* spp. pode aumentar significativamente a inflamação intestinal em ratos, e análises metabolômicas mostraram a capacidade em perturbar a MI através do mecanismo que promove a diminuição dos níveis de AGCCs, e com a redução da camada de muco protetor há aumento da suscetibilidade para infecções.

2.3.3 Filo Proteobacteria

Proteobacteria, considerado o filo que possui a maior composição filogenética, dispõe de anaeróbios facultativos, Gram-negativos, que possuem morfologia variável e fisiologia versátil, essas características podem conferir vantagem competitiva frente aos demais micro-organismos que possam interagir (SHIN et al, 2015). O filo abrange algumas bactérias conhecidas por sua patogenicidade (p. ex., *Escherichia coli* e *Shigella* spp.), e sua ausência ou uma abundância relativa baixa na MI é observada em indivíduos saudáveis (HOLLISTER, 2014; RIZZATTI et al., 2017).

Há mudanças nas comunidades microbianas intestinais nas DIIs, e essa mudança inclui um aumento significativo de bactérias anaeróbias facultativas da família Enterobacteriaceae, (filo Proteobacteria) (ZHU et al., 2018). Alterações na composição da microbiota ocorrem em diversas condições inflamatórias, nessas circunstâncias é observado um aumento significativo de proteobactérias na MI, alguns autores consideram essa abundância como um marcador de instabilidade da microbiota (SHIN et al., 2015).

2.3.3.1 Família Enterobacteriaceae

A família Enterobacteriaceae pertence ao filo Proteobacteria, Gram-negativas, abrange organismos comensais e organismos que podem atuar com patógenos, em geral, estão presentes em menos de 1% da MI de indivíduo saudável e quando estão em maior abundância relaciona-se a disbiose (DONALDSON et al., 2016; WINTER et al., 2013). Entre os patógenos entéricos desta família Enterobacteriaceae estão *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica* e outros, que possuem a capacidade de colonizar e replicar no TGI, além de invadir tecidos mais profundos (HEROVEN et al., 2017).

Nas DII observa-se que frequentemente há mudanças significativas nas comunidades microbianas que colonizam o lúmen intestinal, destacando-se o aumento na abundância relativa de bactérias facultativas da família Enterobacteriaceae (ZHU et al., 2018). Essa família possui propriedades pró-inflamatórias, e uma das consequências de sua expansão é a contribuição para o desencadeamento ou exacerbação da resposta inflamatória do hospedeiro (MORGAN et al., 2012; JALANKA et al., 2020).

Uma das espécies que podem atuar na promoção do desencadeamento ou exacerbação da resposta inflamatória é *Escherichia coli*, um comensal comumente encontrado no TGI dos seres humanos e em animais de sangue quente (ALLOCATI et al., 2013; JANG et al., 2017). Há uma diversidade filogenética dentro da espécie *E. coli* com linhagens bacterianas contendo diferentes combinações de genes de virulência, permitindo a existência de muitos patotipos com variados fatores de virulência na microbiota normal e que podem ser oportunistas (KITANA et al., 2018).

De acordo com Mirsepasi-Lauridsen e colaboradores (2019), *E. coli* pode ser classificada em três tipos baseando-se em critérios genéticos e clínicos, como cepas comensais, cepas patogênicas intestinais e cepas patogênicas extra intestinais (ExPEC). A espécie possui capacidade em converter nitrato não fermentável em fermentável e utiliza VMEs como mecanismo molecular de liberação de fator de virulência ativos, como proteases, proteínas pró-inflamatórias, LPS, e toxinas, além disso tem sido associada a DIIs (RUETER; BIELASZEWSKA, 2020; MIRSEPASI-LAURIDSEN et al., 2019).

O principal potencial patogênico que liga *E. coli* à DII é sua propriedade em aderir e invadir células epiteliais, multiplicando-se dentro dos macrófagos, e em RCU observa-se que o *E. coli* induz morte celular em células dendríticas e estimula a liberação de certas citocinas,

como, TNF- α , IL-6 e IL-23 (MIRSEPASI-LAURIDSEN et al, 2019). Como possível relação benéfica da bactéria nas MIs, Pilarczyk-Zurek e colaboradores (2016) relatam casos de RCU exacerbada em pacientes com nível alto de espécies reativas de oxigênio (ROS); e uma vez que altas taxas de ROS aceleram o processo de necrose do epitélio intestinal, *E. coli* pode atuar como anulador de substratos que dão origem ao ROS, promovendo a diminuição da necrose do epitélio intestinal de pacientes com RCU.

Na década de 1970 alguns experimentos de fenotipagem utilizados não conseguiram distinguir algumas espécies das cepas de *Escherichia coli*, com isso *Shigella* spp. e *E. coli* foram considerados como uma espécie e permanecem atualmente como espécies irmãs, com isso *Shigella* spp. é membro do gênero *Escherichia*, e não cepa de *E. coli* (ZUO et al., 2013). *Shigella* spp. são enterobactérias patogênicas Gram-negativas constituída por quatro grupos, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae* e *Shigella boydii*, e é o agente etiológico da disenteria bacilar também chamada de shigelose (associada a febre, cólicas abdominais) (ANDERSON et al., 2016).

Shigella spp. possui capacidade em rapidamente adquirir resistência a antibióticos o que gera uma preocupação por parte dos pesquisadores (QU et al., 2014) e o gênero é uma das principais causas de morbidade e mortalidade infantil, pois, se relaciona a formas graves de diarreia (KOTLOFF et al., 2013). A invasão na mucosa do cólon dos seres humanos e não no intestino delgado ainda é desconhecida, mas antes da invasão, *Shigella* spp. precisa competir com as bactérias comensais luminiais do cólon, após conseguir ultrapassar os micro-organismos rompe a espessa camada protetora de muco invade e coloniza a mucosa (ANDERSON et al., 2016). Nas doenças inflamatórias intestinais que há uma disbiose microbiana presente é caracterizada principalmente pelo aumento nos níveis do gênero *Escherichia-Shigella*, quando somada a uma diminuição do filo Firmicutes caracteriza-se a microbiota da mucosa inflamada de pacientes com RCU e de pacientes com DC (XU et al., 2018; THORKILDSEN et al., 2013).

Outro gênero de bacilos Gram-negativos pertencente à Enterobacteriaceae e que tem sido relacionado a RCU é *Klebsiella*, geralmente imóveis e agentes etiológicos de infecções nosocomiais oportunistas, principalmente pneumonia promovida por *K. pneumoniae* (CAPUTO et al., 2015; GARRETT et al., 2010). Espécies de *Klebsiella* foram identificadas como patobiontes após isolamento da cavidade oral de pacientes com DII, local acometido por manifestações extra-intestinais da DII; com a translocação de *Klebsiella* spp. da mucosa oral para a parte inferior intestinal, seu acúmulo pode induzir ao desenvolvimento de colite, pois

promove a ativação de macrófagos da mucosa intestinal, agravando a patogênese da RCU (KITAMOTO et al., 2020).

2.3.4 Filo Fusobacteria

As bactérias que pertencem ao filo Fusobacteria são bastonetes anaeróbios, Gram-negativos, não formam esporos e não móveis, possuem baixa capacidade fermentável, são conhecidos por serem infecciosos e invasivos, bem como podem induzir a inflamação, como a gênero *Fusobacterium* (ARANE; GOLDMAN 2016; YANG et al., 2020). Estudos relatam que o filo tem sido considerado como uma característica clínico-patológica para pacientes diagnosticados com RCU, podendo influenciar na ocorrência e progressão da RCU, além disso, sua capacidade invasiva foi correlacionada com a gravidade da DII no hospedeiro (MA et al., 2018; WEINGARDEN; VAUGHN, 2017).

2.3.4.1 Família Fusobacteriaceae

Família Fusobacteriaceae pertence ao filo Fusobacteria, em estudos sua abundância na MI correlaciona-se à algumas patologias, como DII, bem como possível biomarcador da DC e RCU, retratam ainda, que essa família pode possivelmente promover um ambiente propício para a progressão de uma complicação a longo prazo da DII, o carcinoma colorretal, entretanto requer, mais investigação (GEVERS, D. et al., 2014; KOSTIC, A. D. et al., 2012). O aumento em níveis quantitativos da família Fusobacteriaceae foi observado em alguns estudos, um deles foi realizado com coorte de DC pediátrica e outro com pacientes RCU, e entre os estudos a abundância aumentada de Fusobacteriaceae e sua possível relação com a patologia (GEVERS et al., 2014; BAJER et al., 2017).

Um dos gêneros que compõe a família é *Fusobacterium*, composto por bactérias Gram-negativas, bastonetes não formadores de esporos e fazem parte da microbiota das mucosas oral e intestinal de humanos e possuem características invasivas, aderentes e pró-inflamatórias (STRAUSS et al, 2011; TAHARA et al, 2017). O nível desse gênero aumentado é associado a câncer colorretal e adenomas com fenótipos de metilação, indicando uma possível atuação desta bactéria em doenças relacionadas à metilação do DNA (TAHARA et al, 2017).

Fusobacterium spp. possuem a capacidade de invadir ativamente células hospedeiras através de moléculas adesivas extracelular e de invasão, como FadA; também apresentam características aderentes e pró-inflamatórias na microbiota (SEKIZUKA et al., 2017). Ademais, algumas espécies podem ser consideradas patógenos oportunistas, pois, tem sido associadas a alguns distúrbios como DIIs, e nesse caso se observou a capacidade da bactéria em invadir ativamente as células hospedeiras, mas sua atuação na patogênese da DII ainda não foi determinada (LIU et al., 2019; SEKIZUKA et al., 2017).

Fusobacterium nucleatum é um anaeróbio obrigatório Gram-negativo que coloniza os espaços periodontais, presente também associada a infecções invasivas em todo o corpo humano (LEWIS et al., 2016). Em estudo realizado por Liu e colaboradores (2020) foi observado altos níveis de *F. nucleatum* em fezes de pacientes com DII, fazendo correlação da sua abundância à atividade da doença. Há evidências de que o comensal e oportunista *F. nucleatum* tem associação com o RCU, por meio de um mecanismo de ação ainda não definido que promove inflamação intestinal nessa patologia (CHEN et al., 2020).

Chen e colaboradores (2020) demonstraram que *F. nucleatum* promove a expressão de citocinas inflamatórias (p.ex., IL-1 β , Il-6, IL-17F e TNF- α) e aumenta a degradação do epitélio intestinal, afetando a sua integridade e facilitando o contato da mucosa exposta com patógenos. Tahara e colaboradores (2015) relataram que outras espécies de *Fusobacterium* são encontradas na microbiota de pacientes com RCU, e que exercem função importante na persistência da inflamação do cólon devido à sua atuação pró-inflamatória.

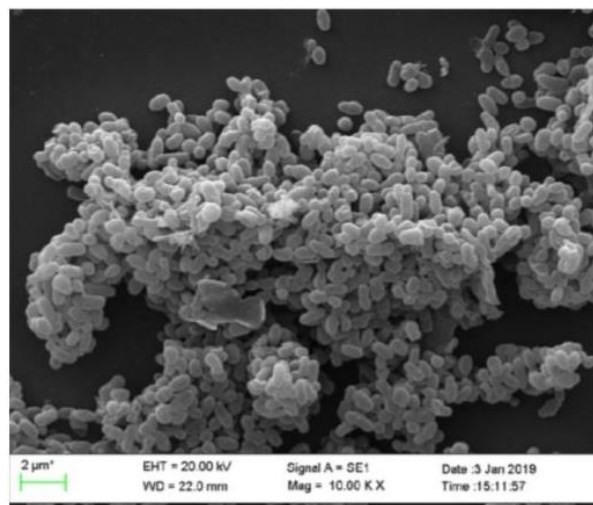
2.3.5 Filo Verrucomicrobia

O filo bacteriano Verrucomicrobia possui um único isolado intestinal que é *Akkermansia* ou *Akkermansia muciniphila*, contudo, seu representante é altamente ramificado e possui uma importância significativa na MI (LI et al., 2019; DERRIEN et al., 2017). *A. muciniphila* possui atividade no lúmen intestinal na degradação de muco, que por meio de enzimas degradadoras codificadas, atuam na proteção da barreira intestinal, aumentando a produção de muco intestinal, conseqüentemente tornando a camada de muco mais espessa, além disso, essa degradação promove a produção de carbono, energia e nitrogênio para outras bactérias que podem produzir butirato, substrato utilizado pelos colonócitos (FUJIO-VEJAR et al., 2017).

Observou-se que em indivíduos saudáveis o percentual que compreendia a microbiota fecal ocupada por *Akkermansia* spp. é cerca de 1–4%, e esse percentual é encontrado desde os primeiros anos da vida (LI et al., 2019). Em distúrbios microbiológicos como encontrado na DC e RCU, em que a mucosa encontra-se inflamada, houve uma diminuição na abundância de Verrucomicrobia (*Akkermansia* ssp.) nesses pacientes quando comparada a indivíduos sem DII (SALEM et al., 2019). *A. muciniphila* encontra-se em níveis altos na MI saudável (aproximadamente 3%) e atua na regulação da barreira intestinal para manutenção da homeostase e integridade das funções metabólicas, contudo, esses mecanismos permanecem desconhecidos (EVERARD et al., 2013; DE VOS, 2017).

A. muciniphila (Figura 10) produz oligossacarídeos e ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), como acetato e propionato, e outros produtos de fermentação através do processo de degradação de mucina presente na mucosa do TGI (JOHANSSON; HANSSON, 2016; BELZER; DE VOS, 2012). Esse muco é degradado por *A. muciniphila* e outras espécies bacterianas promovendo uma renovação do muco através de *feedback* positivo que estimula a produção de muco e favorece o crescimento bacteriano (EVERARD et al., 2013). Os produtos de fermentação resultantes da degradação do muco servem como fontes de energia para outras bactérias, contribuindo para a diversidade da MI (BELZER; DE VOS, 2012).

Figura 10 - *Akkermansia muciniphila* por micrografia eletrônica de varredura.



Fonte: Zhang et al. (2019, p. 3.)

O propionato é um produto de fermentação resultante da degradação da mucina e que atua como sinalizador para o hospedeiro, resultando em uma estimulação imunológica e sinalização metabólica (HOSSEINI et al., 2011). Estudos mostram que em uma microbiota

saudável *A. muciniphila* desempenha um papel protetor ou anti-inflamatório na mucosa intestinal, quando observada em pacientes com DIIs, a espécie apresenta-se em níveis quantitativos baixos, independente se a doença está na fase ativa ou em remissão (BELZER; DE VOS, 2012; VIGSNÆS et al., 2012).

2.3.6 Filo Actinobacteria

As bactérias que compõem Actinobacteria são de vida livre, amplamente distribuídas nos ecossistemas, algumas podem ser patogênicas (por exemplo, *Corynebacterium* spp., *Mycobacterium* spp.) e outras, como comensais no TGI (por exemplo, *Bifidobacterium* spp.) (BARKA et al., 2015; POLKADE et al., 2016). As actinobactérias são bactérias Gram-positivas, e esse filo possui uma das maiores unidades taxonômicas entre as principais linhagens atualmente reconhecidas no domínio Bacteria (GAO; GUPTA, 2012).

As bactérias que fazem parte do filo Actinobacteria são utilizadas pela indústria farmacêutica na produção de compostos biologicamente ativos (por exemplo, drogas antibacterianas, anticâncer ou antifúngicas) (RANGSEEKAEW; PATHOM-AREE, 2019). As actinobactérias encontradas geralmente no TGI são da família Bifidobacteriaceae e são importantes na promoção e manutenção da homeostase da MI, devido seu potencial probiótico (GAO; GUPTA, 2012). Em um estudo com pacientes com RCU, em que a mucosa está em processo de inflamação exacerbada, ainda assim o filo apresentou-se abundante com o filo Proteobacteria (ZAKERSKA-BANASZAK et al., 2021).

2.3.6.1 Família Bifidobacteraceae

Trata-se de uma família formada por quatro gêneros (*Bifidobacterium* spp., *Gardnerella* spp., *Scardovia* spp. e *Parascardovia* spp.), em que cada gênero é constituído por uma espécie apenas, exceto o gênero *Bifidobacterium* (VENTURA et al., 2007). As bifidobactérias são imóveis, não possuem a capacidade de esporular, possui metabolismo fermentativo e são anaeróbias ou anaeróbias facultativas, e estão entre as populações bacterianas dominantes do TGI (HIDALGO-CANTABRANA et al., 2017).

O gênero *Bifidobacterium* é formado por bactérias Gram-positivas, o gênero está entre as populações bacterianas dominantes no TGI dos humanos, algumas das espécies que o gênero

abrange é comumente encontrado na MI de indivíduos saudáveis (*B. adolescentis*, *B. longum*, *B. breve*, *B. bifidum*) (HIDALGO-CANTABRANA et al., 2017). Algumas espécies podem estabelecer uma interação patogênica com o hospedeiro (como, *B. dentium*) ou como comensais no TGI (como, *Bifidobacterium bifidum* e *Bifidobacterium breve*) (TURRONI et al, 2011; QUAGLIARIELLO et al, 2016).

Satish Kumar e colaboradores (2017) utilizaram *B. bifidum* em que houve um aumento significativo da espécie por suplementação observou-se que o nível de IL-10 aumentou e concomitante com a redução de IL-1 β no cólon, mostrando o efeito antiinflamatório da espécie. Em um estudo utilizando modelo murino de colite induzida, os resultados demonstraram que *B. bifidum* reduziu o curso da doença, demonstrando seu potencial como modulador e capacidade em reduzir a inflamação e sintomas da colite (DURANTI et al., 2016).

As bifidobactérias possuem capacidade de fermentar variados oligossacarídeos presentes no TGI, entre eles os que não são digeridos pelo hospedeiro, chamados também de pré-bióticos (LUGLI et al., 2017). Geralmente, são encontradas no TGI e possuem grande importância na manutenção e para estabelecer a homeostase do ecossistema intestinal, que através da capacidade de fermentação contribuem para uma melhor digestão (GAO; GUPTA, 2012).

Um outro gênero conhecido da família Bifidobacteraceae é gênero *Gardnerella* spp. é frequentemente associado a vaginites, situação em que há perda de espécies que evitam a proliferação de anaeróbios facultativos e estritos, como *Gardnerella vaginalis*, um Gram-positivo propenso a formar biofilmes (RANDIS; RATNER, 2019; VESTBY et al., 2020). Algumas cepas de *Gardnerella* spp. possuem enzimas sialidases que clivam as ligações glicosídicas dos ácidos siálicos, incluindo glicoproteínas da superfície da célula epitelial, o que pode estar relacionada à adesão da bactéria e promoção da formação do biofilme (KURUKULASURIYA et al., 2021). Zhou et al. (2021) indicou que *Gardnerella* spp. tem concentração em níveis elevados em amostras fecais de pacientes com DII, tendo potencial como biomarcador de RCU.

2.4. Estudo do microbioma

A microbiota de cada indivíduo é variada qualitativa e quantitativamente, a depender também da condição do hospedeiro, e há uma dificuldade no cultivo de muitas espécies da composição total da microbiota intestinal (MI), já que a maioria são anaeróbios e os métodos tradicionais de cultura são limitados e, por exemplo, apenas aproximadamente 10% a 30% da MI total pode ser cultivada (TANNOCK, 2001; WANG et al., 2015). Há portanto uma dificuldade em se obter a informação completa sobre um microbioma saudável de diferentes sítios anatômicos com técnicas clássicas, levando necessariamente ao uso de técnicas independentes de isolamento e cultivo baseadas em Biologia Molecular para obter maior informação. Sendo assim, há um importante progresso em conhecimento sobre o microbioma intestinal (MI) com tecnologias cada vez mais avançadas, como o sequenciamento de DNA de nova geração (*Next Generation DNA Sequencing*; NGS) que permite o estudo metagenômico (KIM; JAZWINSKI, 2018; WANG et al., 2015).

Estima-se que há cerca de 10 milhões de bactérias intestinais no ser humano (CARVALHO et al., 2017), e a coleção de genomas e genes dos membros da microbiota intestinal (metagenoma intestinal) traz informações que podem ser abordadas de diferentes formas: a metagenômica descritiva pode demonstrar a estrutura das comunidades colonizadoras e a abundância relativa, por exemplo, enquanto na metagenômica funcional foca o estudo das interações entre hospedeiro e micro-organismos, em um formato de ecossistema preditivo e dinâmico (MANDAL et al., 2015).

Então, a abordagem metagenômica para o estudo de comunidades microbianas tornou possível a identificação com mais acurácia da diversidade microbiana que habita o lúmen intestinal, permitindo conhecer padrões de disbiose e as relações entre os micro-organismos, o hospedeiro e sua interferência na promoção da saúde e da doença (WANG et al., 2015; CARVALHO et al., 2017). Entre as abordagens mais utilizadas para identificação por sequenciamento de genes bacterianos tem-se a análise do gene 16s do rRNA, que se tornou um marcador padrão para a análise filogenética de procariotos e vem sendo amplamente usado no estudo de comunidades microbianas em combinação com tecnologias de sequenciamento de alto rendimento, o que permitiu o aprofundamento sobre bactérias intestinais não cultiváveis (BECKER et al., 2015; WANG et al., 2015). O gene 16s possui regiões conservadas e hipervariáveis entre as espécies bacterianas, e as regiões hipervariáveis permitem a distinção

entre diferentes clados bacterianos, possibilitando identificar maior parte das bactérias em uma comunidade microbiana (SANSCHAGRIN et al., 2014; LU et al., 2020).

O sequenciamento do rRNA 16S tem sido usado em estudos ambientais e também em pesquisas de interesse médico, podendo auxiliar no diagnóstico e caracterização da contribuição microbiana em algumas doenças, por exemplo (HOSHINO; INAGAKI, 2017; EMERY, 2017). Nos últimos anos, a composição da microbiota intestinal tem sido amplamente estudada, visando principalmente a identificação da abundância relativa de micro-organismos em relação à doenças como neurológicas, obesidade, incluindo DIIs (IMHANN et al., 2016; SOKOL et al., 2015).

Com o sequenciamento do rRNA 16S efetivado, é necessária uma análise acurada dos resultados, o que inclui a comparação da informação genética com bancos de dados de referência, visando a determinação das suas identidades (LU et al., 2020). Há ferramentas que são utilizadas para realizar a desmultiplexação da biblioteca genômica e realizar a atribuição de taxonomia baseada na região rRNA 16S, como por exemplo o *Quantitative Insights into Microbial Ecology* (QIIME), pacote de *software* amplamente utilizado que realiza a comparação entre as sequências genéticas e um banco de dados de referência, com a capacidade de suportar uma grande quantidade de análises (CAPORASO et al., 2010; BOLYEN, et al., 2019), que auxiliará na determinação das unidades operacionais taxonômicas (OTUs; *Operational taxonomic units*).

Para analisar tais conjuntos de dados complexos utiliza-se um formato que permite análise estatística e interpretação funcional, e uma ferramenta que realiza essa função é o *MicrobiomeAnalyst*. Com o uso desta plataforma *online* é possível a integração das estatísticas e modelos de visualização a partir de dados produzidos, otimizando o estudo do microbioma em uma análise abrangente (DHARIWAL et al., 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar o microbioma intestinal de pacientes com retocolite ulcerativa a partir de amostras fecais e comparar com o microbioma intestinal de indivíduos sem doenças inflamatórias intestinais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a composição da microbiota intestinal de pacientes com retocolite ulcerativa;
- Correlacionar o perfil do microbioma intestinal de pacientes selecionados com retocolite ulcerativa e suas condições clínicas;
- Comparar o microbioma intestinal de pacientes com retocolite ulcerativa com o microbioma intestinal de indivíduos sem doença inflamatória intestinal.

4 METODOLOGIA

Trata-se de um estudo do tipo caso-controle com pacientes voluntários diagnosticados com RCU (grupo teste) e atendidos no Ambulatório do Serviço de Coloproctologia (Amb-Coloprocto) do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes da Universidade Federal de Alagoas (HUPAA/UFAL), além de grupo controle composto por indivíduos saudáveis e sem doenças inflamatórias intestinais. As amostras fecais de ambos os grupos foram armazenadas em um repositório de material fecal e usadas para comparação de perfil do microbioma intestinal com e sem DII (grupo controle).

4.1 Aspectos éticos

O projeto temático em que se enquadra esta pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) e aprovado sob o nº 99615018.2.0000.5013 (ANEXO A), sendo desenvolvido conforme as normas preconizadas na Resolução do Conselho Nacional de Saúde/CNS número 466/12, que trata da pesquisa com seres humanos.

Os pacientes autorizaram sua participação por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) após receberem informações sobre os objetivos e demais procedimentos do projeto, sendo informados acerca da não obrigatoriedade da participação no estudo e recebendo uma cópia assinada do TCLE.

4.2 Local e população de estudo

A pesquisa foi realizada no Ambulatório do Serviço de Coloproctologia (Amb-Coloprocto) do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes da Universidade Federal de Alagoas (HUPAA/UFAL), em associação com o InHaMMI (Instituto de Habilidades Multiprofissional da Microbiota Intestinal da Faculdade de Medicina da UFAL) e LMC (Laboratório de Microbiologia Clínica do Instituto de Ciências Biológicas da UFAL), coordenados pelo Prof. Dr. Manoel Alvaro de Freitas Lins Neto e Profa. Dra. Fernanda Cristina de Albuquerque Maranhão, respectivamente.

A população de estudo (amostragem) foi composta de pacientes atendidos no Amb-Coloprocto do HUPAA com diagnóstico de RCU efetivado e que assinaram o TCLE, sendo

posteriormente aplicados questionários estruturados individualmente, além do preenchimento de ficha clínica específica com base nos dados de prontuários e exames complementares.

Os dados dos pacientes com RCU e dos indivíduos saudáveis foram coletados a partir da aplicação de um questionário estruturado com questões objetivas, que se referiam por exemplo ao perfil sociodemográfico dos voluntários entrevistados, questionamentos relacionados ao acompanhamento da retocolite ulcerativa e resultados de exames variados, como hemograma, PCR e albumina.

Os pacientes com RCU foram avaliados de acordo com a gravidade da doença, o tempo de diagnóstico, os tratamentos realizados e presença de comorbidades diversas, sendo coletados também seus dados sociodemográficos. Foram solicitados exames bioquímicos e hematológicos para acompanhamento da situação clínica atual dos pacientes voluntários do estudo, que foram realizados no HUPAA ou em laboratórios particulares.

4.3 Análise de exames laboratoriais

De acordo com a Portaria Conjunta nº 6 do dia 26 de março de 2020, que aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Retocolite Ulcerativa, o diagnóstico deve ser baseado pela história clínica, exame físico, exames laboratoriais, exame endoscópico (fundamental na obtenção do diagnóstico e classificação da RCU) e achados histopatológicos. Pacientes realizaram coleta de sangue, exames hematológicos e bioquímicos no HUPAA e o exame de dosagem de calprotectina foi realizado pelo InHaMMI. Entre os exames bioquímicos solicitados, foram realizados no HUPAA os exames da Proteína C-reativa (PCR) e Albumina a partir do soro dos pacientes, obtido após a centrifugação das amostras sanguíneas.

O exame de calprotectina é um ensaio para determinar a quantidade de calprotectina fecal (CF), que é uma proteína quelante do cálcio que durante o processo inflamatório no TGI é encontrada em níveis elevados nas fezes devido o recrutamento de neutrófilos, e devido a isso tornou-se um importante marcador bioquímico de DII (LEE, 2016; SALDANHA, 2016). Após a entrega das fezes coletadas individualmente pelos voluntários, foi realizada a transferência de parte da amostra fecal contida em um recipiente coletor estéril para o tubo Calex[®] (Figura 11A), que contém um tampão para efetivar em agitador a diluição da amostra no tampão contido no tubo; seguiu-se com incubação de 10 minutos, conforme orientação do fabricante (*Kit B-CAL-EX, Bühlmann[®]*).

Para dar prosseguimento ao teste, transferiu-se 60µL da solução do tubo Calex® para um cassete do *kit* B-CAL-EX, e após a difusão da solução no cassete houve incubação de 12 minutos para realizar a leitura (Figura 11B). A leitura do resultado em cada cassete foi efetivada no equipamento Bühlmann fCAL® (Bühlmann®) após a validação do cartão correspondente ao lote do cassete, disponibilizando o resultado da quantidade de calprotectina da amostra em µg/g.

Figura 11 - Componentes do *kit* B-CAL-EX para realizar o exame de dosagem de calprotectina (Bühlmann®). A. Cassete de teste. B. Tubo Calex® com tampão.



Fonte: Modificado de IB Doc® da Bühlmann (2021)

A interpretação dos dados de calprotectina se dá em três níveis: quando o resultado é menor que 100µg/g significa que a existência de inflamação é muito improvável e não é sugestivo de DII; quando o resultado está entre 100-250µg/g é sugestivo de inflamação de baixo grau e o ideal é repetir o teste; e quando o resultado é maior que 250µg/g indica que é muito provável que haja inflamação (GEDIIB, 2020). Dentre os exames laboratoriais hematológicos, é recorrente nos hemogramas solicitados para os pacientes com DII a situação de anemia (mulheres Hb < 12 g/dL e homens < 13 g/dL) e trombocitose, de acordo Grupo de Estudos da Doença Inflamatória Intestinal do Brasil (GEDIIB).

4.4 Coleta do material fecal

Tendo em vista as preocupações com Biossegurança e de modo a evitar contaminação do material biológico coletado e do ambiente laboratorial, antes de cada manipulação de amostras biológicas foi realizado o preparo de materiais esterilizados. Todas as vidrarias e materiais diversos passaram por processos de lavagem e esterilização por autoclavagem no LMC/ICBS para uso no InHaMMI/FAMED e no HUPAA/UFAL, a fim de estabelecer as condições estéreis necessárias para a manipulação, filtragem e acondicionamento do material fecal sem alterar a comunidade microbiana primária. Ademais, também foi necessário preparar

soluções estéreis de glicerol (para diluição posterior a 10%) e salina (NaCl 0,9%) utilizadas nas etapas de processamento e estocagem do material fecal coletado.

A coleta de material fecal foi feita de forma individual por cada voluntário do projeto utilizando *kit* de coleta fornecido pela Probiome[®] (Figura 12), acondicionando parte das fezes em recipiente coletor estéril apropriado para transporte em isopor sob leve refrigeração até o HUPAA/UFAL. Adicionalmente, cada voluntário foi instruído a captar uma alíquota do material fecal coletado com inserção de *swab* nas fezes e acondicioná-lo separadamente em recipiente esterilizado do *kit*, visando o rápido encaminhamento ao profissional de saúde ligado ao projeto para envio imediato à Probiome[®].

Figura 12 - Kit para coleta individual de amostra fecal cedido pela Probiome[®].



Fonte: Autora (2021)

4.5 Extração de DNA e amplificação da região 16S (*Metabarcoding*) para análise do microbioma fecal

Uma vez que amostras fecais foram enviadas para a empresa Probiome[®], esta foi a responsável pelo preparo para viabilizar o sequenciamento de DNA visando identificação do microbioma intestinal de cada paciente. A extração de DNA foi efetuada com o *kit* QIAmp PowerFecal DNA (QIAGEN[®]) e as amostras foram então analisadas usando sequenciamento de última geração de alto rendimento da região variável V4 do gene bacteriano 16S do RNA ribossomal (rRNA). Foram usados oligonucleotídeos (*primers*) de amplificação 16S V4 (515F e 808R) com sequências adaptadoras Illumina e DNA polimerase HiFi para amplificação por PCR, realizadas em um sequenciador Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) Dessa forma, foi realizada a amplificação e leitura da região do rDNA (*Ribosomal DNA*) de bactérias contidas nas amostras fecais que proporcionou a identificação da composição microbiana intestinal após a organização dos dados.

Todos os parâmetros de qualidade da execução foram garantidos pela empresa contratada e é importante salientar que as condições de cada etapa (Extração, PCR e sequenciamento) foram determinadas pela empresa Probiome[®], não sendo possível o repasse detalhado devido ao acordo empresarial. Após o preparo decorrido na empresa terceirizada citada, os resultados com avaliação bioinformática preliminar foram enviados ao InHaMMI como arquivos de gráficos compactados, sendo ainda repassados todos os dados brutos gerados para análise bioinformática completa.

4.6 Análises bioinformáticas

Após o sequenciamento de DNA, as *reads* geradas (sequências inferidas de pares de bases – A, T, G e T) correspondentes a parte do fragmento do rDNA 16S tratadas, foram demultiplexadas usando de QIIME2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology, versão 1.9.1; disponível em <http://qiime.sourceforge.net>) (CAPORASO et al., 2010) e regiões de *primers*, sequências ambíguas e quiméricas ou de baixa qualidade foram removidas usando as configurações-padrão para análise posterior. As *reads* de qualidade (sequências tratadas) foram emparelhadas e executadas no QIIME2, sendo então organizadas de acordo com 97% de similaridade para agrupamento em unidades taxonômicas operacionais (OTUs; *operational taxonomic units*). Em seguida, as amostras foram normalizadas por subamostragem (diminuindo o tamanho da amostra para facilitar análises), seguindo então para análises estatísticas e de classificação taxonômica das OTUs.

Para análises estatísticas, criação de gráficos de barras de taxonomia, comparações de diversidade alfa e beta e análise de abundância diferencial, as sequências (*reads*) independentes foram tratadas separadamente e, posteriormente, combinadas. Uma tabela de OTUs normalizada com táxons em formato simples e arquivo de metadados foram carregados para a ferramenta *on line MicrobiomeAnalyst* (disponível em: <http://www.microbiomeanalyst.ca>) (DHARIWAL et al., 2017), onde foram calculadas as porcentagens da abundância de filos, classes, ordens, famílias e gêneros que caracterizavam a MI de cada paciente com RCU e de doadores saudáveis.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização dos pacientes com retocolite ulcerativa

Após a aplicação de questionários estruturados, visando a seleção de pacientes com DIIs com diagnóstico definitivo de RCU, 18 pacientes de ambos os sexos foram selecionados. Os pacientes tinham idades entre 18 e 63 anos e foram diagnosticados entre 2002 e 2019 (Tabela 1), e entre os selecionados, 7 pacientes possuíam outras comorbidades além da RCU, como hepatite autoimune, artrose, diabetes, hipertensão e hemangioma lombar.

Tabela 1 - Perfil sociodemográfico dos pacientes retocolite ulcerativa do HUPAA/UFAL.

Código	Gênero	Idade	Comorbidades	Tabagismo	Etilismo
S196	F	36	-	Não	Sim
S198	M	59	Hepatite Autoimune	Sim	Não
S71	M	40	-	Não	Não
S139	F	63	-	Não	Não
S148	F	60	Hipertensão	Não	Não
S146	F	53	Artrose, diabetes	Não	Não
S72	F	18	-	Não	Não
S79	F	57	-	Não	Não
S8	M	35	Hipertensão	Não	Não
S28	M	52	-	Sim	Não
S76	F	60	-	Sim	Não
S80	F	43	Hipertensão	Não	Não
S68	F	60	Diabetes	Não	Não
S74	F	37	Hemangioma Lombar	Não	Não
S143	F	34	-	Não	Não
S66	F	39	-	Não	Não
S70	F	60	-	Não	Não
S9	F	28	-	Não	Não

(-) Ausência de comorbidade

Fonte: Autora (2021)

Constatou-se a existência de pacientes tabagistas (3) e etilistas (1), mas nenhum dos pacientes acumulava os 2 hábitos. Sete pacientes faziam uso de medicamentos para tratamento das suas comorbidades, como por exemplo, hidroclorotiazida (entre 25mg e 50mg), losartana

potássica (12,5mg e 50mg), insulina NPH (40U), metformina 500mg, rosuvastatina e atenolol 50mg, bem como os medicamentos adalimumabe, corticóides, cetolizumabe, azatioprina e mesalazina para DII.

Entre os glicocorticóides, 9 pacientes estavam em uso de prednisona e 1 com prednisolona, que diferem quanto a biotransformação do fármaco uma vez que prednisona se trata de um pró-fármaco que necessita ser convertida para possuir atividade farmacológica (prednisolona é o metabólito ativo), principalmente pelo metabolismo hepático; sendo assim, com a administração da prednisona ou prednisolona, a ação farmacológica será exercida pela prednisolona (ANVISA, 2021).

5.2 Avaliações dos exames laboratoriais

Exames bioquímicos, calprotectina e hemograma dos pacientes foram solicitados para avaliar a situação geral do quadro clínico e atividade inflamatória da DII. Porém, só foi possível o acesso aos resultados dos hemogramas de 7 pacientes, e um deles apresentou resultados acima dos valores de referência preconizado pelo Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ) patrocinado pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC): valores de referência entre 13,0-16,9 g/dL para homens e para mulheres entre 11,5-14,9 g/dL; leucócitos em homens deve estar entre 2.843 a 9.440 mm³ e em mulheres 2.883 a 9.969 mm³ (Programa Nacional de Controle de Qualidade, 2017; ROSENFELD, L. G. et al., 2019).

Entre os pacientes voluntários com RCU foi constatada colite distal como extensão da doença em 8 (44,44%), e entre estes, 5 apresentavam-se com a doença em remissão (27,75%) e 3 na fase ativa (16,65%). Nove pacientes com RCU apresentaram pancolite (50%), e 7 deles estavam na fase ativa, enquanto apenas 1 paciente apresentou colite distal e pancolite (5,5%), conforme apresentado na Tabela 2. A partir das informações colhidas, foi possível inferir que apenas o paciente S79 apresentou leucocitose no momento da coleta amostral, e este encontrava-se na fase ativa da doença e com pancolite (calprotectina > 1.000 µg/g).

Tabela 2 - Situação clínica dos pacientes referente a retocolite ulcerativa.

Paciente	Extensão da doença*	Fase da doença	Calprotectina
S196	Colite Distal	Remissão	Positivo
S198	Colite Distal	Remissão	Negativo
S71	Pancolite	Ativa	Positivo
S139	Colite Distal	Remissão	Indeterminado
S148	Colite Distal	Remissão	Negativo
S146	Pancolite	Ativa	Positivo
S72	Pancolite	Remissão	Positivo
S79	Pancolite	Ativa	Positivo
S8	Colite Distal	Ativa	Positivo
S28	Colite Distal	Ativa	Positivo
S76	Colite Distal	Remissão	Negativo
S80	Pancolite	Ativa	Positivo
S68	Pancolite	Ativa	Positivo
S74	Pancolite	Remissão	Negativo
S143	Pancolite	Ativa	Positivo
S66	Pancolite	Ativa	Positivo
S70	Colite Distal	Ativa	Positivo
S9	Pancolite, Colite Distal	Ativa	Positivo

*Período da coleta: 02/2020 à 12/2020

Fonte: Autora (2021)

Entre os pacientes que apresentaram colite distal e em remissão, apenas o paciente S196 demonstrou resultado elevado de calprotectina (419 μ g/g), enquanto que entre os pacientes em remissão e com pancolite como extensão da doença, apenas S72 apresentou valor elevado (795 μ g/g). Todos os pacientes com pancolite ou colite ativa também apresentaram valores altos, mas resultados de >1000 μ g/g foram notáveis nos pacientes S66, S143, S146, S79 e S28.

Na dosagem da albumina obteve-se resultados considerados adequados pelos valores de referência na ampla maioria (Tabela 3), exceto na amostra S9 que estava abaixo do valor de referência (3,5 a 4,8 g/dL). Os exames parasitológicos de fezes indicaram ausência de parasitos em todas as amostras, enquanto o exame de PCR resultou em 8 amostras reagentes e 8 amostras

não-reagentes, a partir de valores abaixo de 5mg/L a amostra é não reagente (REDE SUS-BH, 2016).

Tabela 3 - Exames laboratoriais de pacientes com retocolite ulcerativa.

Código	Calprotectina	Hemoglobina	Leucócitos	PCR	Albumina
S196	419 µg/g	12,4 g/dL	3200/mm ³	Reagente	Adequado
S198	<30 µg/g	-	-	Não Reagente	-
S71	870 µg/g	-	-	Reagente	Adequado
S139	52 µg/g	-	-	Reagente	Adequado
S148	<30 µg/g	-	-	Não reagente	Adequado
S146	>1000 µg/g	14,7 g/dL	5500/mm ³	-	-
S72	795 µg/g	12,6 g/dL	7200/mm ³	Não Reagente	Adequado
S79	>1000 µg/g	13,5 g/dL	11900/mm ³	Reagente	Adequado
S8	351 µg/g	-	-	Não Reagente	Adequado
S28	>1000 µg/g	-	-	Reagente	-
S76	<30 µg/g	-	-	Não Reagente	-
S80	610 µg/g	-	-	Não Reagente	Adequado
S68	876 µg/g	17,2 g/dL	8640/mm ³	Reagente	Adequado
S74	<30 µg/g	13,6 g/dL	5300/mm ³	Não Reagente	Adequado
S143	>1000 µg/g	13 g/dL	7500/mm ³	Reagente	Adequado
S66	> 1000 µg/g	-	-	Não Reagente	Adequado
S70	848 µg/g	-	-	-	-
S9	255 µg/g	9,1 g/dL	-	Reagente	Baixo

(-) Dado não disponível

Fonte: Autora (2012)

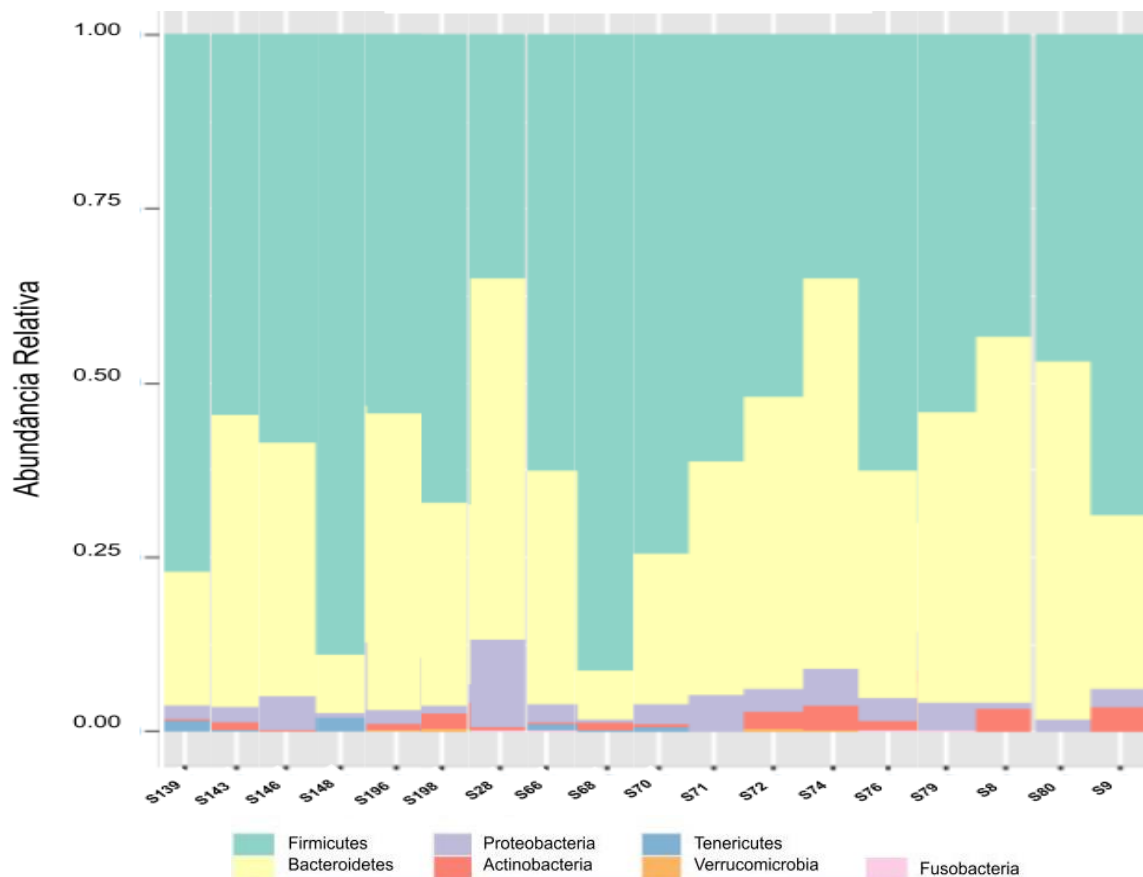
5.3 Identificação da comunidade microbiana em pacientes com retocolite ulcerativa

A técnica de *metabarcoding* foi devidamente aplicada em toda a amostragem enviada à empresa Probiome[®], e após análise por plataformas de bioinformática obteve-se uma lista de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) normalizadas e seus táxons em formato simples, em arquivo de metadados. Várias listas foram geradas após a organização e análise das OTUs através da ferramenta *on-line MicrobiomeAnalyst*, desde filós a gêneros microbianos

majoritários identificados no microbioma de pacientes com RCU e de pessoas sem DIIs. O resultado de cada indivíduo foi avaliado, focando os perfis de pacientes com RCU para depois comparar com os perfis microbianos de indivíduos saudáveis.

A análise de cada amostra de paciente (n= 18) retornou com informações filogenéticas revelando a abundância relativa de bactérias que pertenciam a cada filo (Gráfico 1), sendo constatado que o maiores percentuais eram dos filios Bacteroidetes e Firmicutes, e grande parte das amostras apresentavam também algum percentual dos filios Actinobacteria e Proteobacteria.

Gráfico 1 - Perfil microbiológico quanto à diversidade filogenética de pacientes diagnosticados com retocolite ulcerativa.



Fonte: Autora (2021)

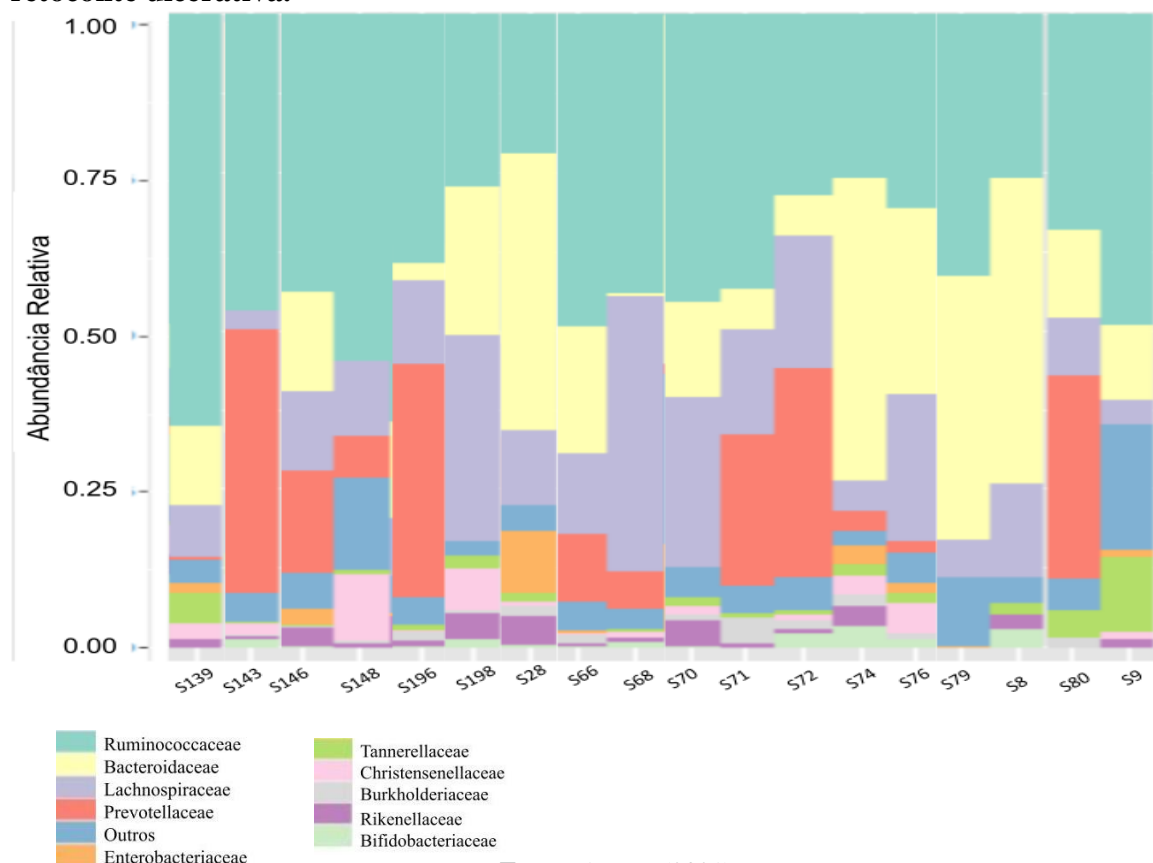
Em relação ao filo Bacteroidetes, identificou-se uma variação da abundância relativa entre as amostras, sendo que o menor percentual encontrado foi em S68 e S148, com cerca de 8%. Dezesesseis amostras (88,89%) apontaram uma abundância do filo Firmicutes em até 86% (S68), seguido do filo Bacteroidetes, em abundância relativa aumentada em 13 pacientes (72,22%), alcançando 63% em S28. Observou-se o filo Proteobacteria apresentou abundância relativa elevada em 13 pacientes (72,22%), chegando a ~12% em S28, enquanto os demais filios

tinham menor expressividade. Aproximadamente 1% do filo Verrucomicrobia foi observado em 3 amostras (S72 ,S98 e S74), e 1% do filo Fusobacteria no paciente S79.

Em relação às famílias bacterianas, houve predominância de Bacteroidaceae, Ruminococcaceae, Lachnospiraceae e Prevotellaceae, mas com importantes variações: de aproximadamente 1% à 54%, 10% à 47%, 1% à 28% e de 1% à 52%, respectivamente. Observou-se também a presença marcante da família Enterobacteriaceae nos pacientes, além de baixas concentrações das famílias Tannerellaceae e Rikenellaceae (Gráfico 2).

Pacientes que apresentaram altos níveis de OTUs representativas da família Prevotellaceae (S143, S196, S72, S80) demonstraram sutilmente uma concentração menor da família Lachnospiraceae. Quanto à família Bacteroidaceae, algumas microbiotas apresentaram concentrações variáveis da família, exceto em S143 que apresentou em sua microbiota ausência de Bacteroidaceae e uma concentração menor em Ruminococcaceae.

Gráfico 2 - Famílias de bactérias identificadas em amostras fecais de pacientes com retocolite ulcerativa.



Os gêneros bacterianos identificados estão dispostos no Gráfico 3, e constatou-se que todos os pacientes apresentam *Faecalibacterium* spp. nas amostras fecais. Também foi

confirmado que os gêneros mais comuns entre mais de 50% das amostras são *Bacteroides*, *Eubacterium_coprostanoligenes_group*, *Faecalibacterium.*, *Lachnospiraceae* NK4A136, *Roseburia*, *Parabacteroides* e *Prevotella_9*.

As amostras de S148 e S68 apresentaram menor abundância de *Bacteroides* spp. e um aumento significativo de OTUs não identificadas, representando cerca de 75% da microbiota total. *Eubacterium_coprostanoligenes_group* estava presente em níveis baixos na maioria dos pacientes, contudo apresentou-se de maneira considerável nas amostras S139, S80 e S9, chegando a quase 30% do microbiota intestinal total em S139. *Klebsiella* spp. foi identificado em apenas três amostras (S146, S28 e S74) em concentrações relativamente baixas, como observado na amostra S146 que teve o valor máximo desse gênero (~2%) (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Gêneros de bactérias identificados nas amostras fecais dos pacientes com retocolite ulcerativa.



Roseburia spp. representou aproximadamente 11% no microbioma de S72, enquanto foram observados níveis variados de *Escherichia-Shigella* nas amostras S139, S28, S76, S9, S143, S71 e S79 (~10%). Em muitos pacientes identificou-se *Parabacteroides* spp. (n= 12),

constatando-se uma maior abundância desse gênero no paciente S9 (~10%). É possível que as diferenças e semelhanças identificadas entre as microbiotas desses pacientes estejam relacionadas às condições clínicas que apresentavam no momento da coleta de amostras fecais, e assim, podem ter contribuído para a variação da abundância relativa no perfil de cada amostra.

5.3.1 Correlação do microbioma com situação clínica do paciente

Uma vez tendo sido identificado o microbioma de pacientes com RCU (n=18), buscou-se entender se há padrões microbianos no trato gastrointestinal que se associam com a doença ou com determinado quadro clínico nos pacientes voluntários. Entre os pacientes, apenas S79 apresentou leucocitose, encontrava-se na fase ativa da doença e com pancolite (calprotectina > 1.000 µg/g), sendo constatada a ausência de famílias, como Bifidobacteriaceae e Prevotellaceae, apresentando como família majoritária Bacteroidaceae em uma concentração quase que 50% da MI total do paciente e presença de *Escherichia-Shigella*.

A partir da análise do microbioma de pacientes com colite distal em remissão, observou-se a predominância da família Prevotellaceae (40%) no paciente S196, que apresentava PCR-positivo, indicando uma possível inflamação, assim como o indicador inflamatório calprotectina com valor elevado (419 µg/g). Demais pacientes com colite distal em remissão apresentaram *Bacteroides* spp. e *Faecalibacterium* spp. com abundância relativa elevada.

Os pacientes S8, S28 e S70 se encontravam com colite distal ativa, e com valores altos de calprotectina (351µg/g, 1000µg/g e 848µg/g, respectivamente), e em todos havia predominância da família Bacteroidaceae, chegando a 53,54% no paciente S28. Entre os pacientes que apresentavam colite distal ativa, apenas S28 tinha a presença de *Escherichia-Shigella*, e em nível considerável (~13%).

A família Prevotellaceae apresentou-se prevalente em 4 pacientes com pancolite ativa (S146, S80, S143 e S71), representando quase metade de seus microbiomas, e todos se encontravam com as taxas de calprotectina elevadas. No caso do paciente S71, além da dominância desta família apresentou também cerca de 25% da família Ruminococcaceae e dos gêneros *Faecalibacterium*, *Prevotella_9* e *Eubacterium_coprostanoligenes_group* nesses pacientes.

Entre os pacientes que apresentavam o estado clínico em remissão e pancolite como extensão da doença, S74 e S72 apresentaram <30µg/g e 795µg/g do marcador de inflamação

calprotectina, respectivamente. S74 tinha cerca de 50% em abundância de Bacteroidaceae e variedade de outras famílias em menores proporções, enquanto que o paciente S72 apresentou menor variedade, e a que estava presente de maneira proeminente era Prevotellaceae e apenas 5% de Bacteroidaceae. Houve predominância de *Bacteroides* spp. e *Faecalibacterium* spp. em S74, mas no paciente S72 *Prevotella_9* (~30%) foi dominante e apresentou níveis baixos de *Bacteroides* spp. (~5%).

Alguns pacientes com RCU em pancolite ativa (S9 e S68) mostraram-se com microbiomas distintos quando comparamos com os microbiomas dos demais pacientes em mesma situação clínica, como por exemplo o paciente S68, que apresentou grande quantidade de OTUs sem identificação (aproximadamente 70%). No paciente S9 não se observou a presença da família Prevotellaceae, mas uma abundância relativa maior de *Eubacterium_coprostanoligenes_group*, diminuição de *Faecalibacterium* ssp. e *Bacteroides* spp., além da presença de *Escherichia-Shigella*.

Na Tabela 4 é possível observar algumas semelhanças identificadas entre os microbiomas de pacientes com RCU em fase ativa e em remissão. Entre as divergências observadas, constatou-se a presença significativa de Prevotellaceae em pacientes na fase ativa, enquanto em pacientes com a doença em remissão a mesma foi bastante reduzida.

Tabela 4. Caracterização geral do microbioma de pacientes com retocolite ulcerativa em fase ativa e em remissão de acordo com conteúdo de unidades taxonômicas.

Unidades taxonômicas	Fase ativa	Remissão	n*
Firmicutes	↑	↑	10/7
Bacteroidetes	↑	↑	9/4
Proteobacteria	↑	↑	10/3
Ruminococcaceae	↑	↑	11/6
Prevotellaceae	↑	↓	6/5
Enterobacteriaceae	↑	↑	3/3
Lachnospiraceae	↓	↓	4/7
<i>Faecalibacterium</i> spp.	↓	↓	5/4
<i>Bacteroides</i> spp	↓	↓	6/4
<i>Escherichia-Shigella</i>	↑	↑	5/2

*amostragem total de pacientes com as características apresentadas em fase ativa/remissão da doença.

↓Abundância relativa diminuída, marcado em vermelho.

↑Abundância relativa aumentada

Fonte: Autora (2021)

Nos pacientes com mais divergências quanto às famílias e gêneros (S9 e S68) observamos diferentes extensões da doença RCU, uma vez que ambos apresentaram calprotectina alta (255µg/g e 876µg/g) e foram PCR-reagentes. O paciente S68 apresentava-se em pancolite e o paciente S9 com pancolite e colite distal, e ambos estavam na fase ativa da doença, entretanto, apenas S9 apresentou baixa dosagem de albumina. Outras variáveis podem estar envolvidas para determinar tais mudanças em cada paciente.

As análises filogenéticas referentes aos pacientes S68 e S9 indicaram resultados semelhantes, sendo os filos predominantes Firmicutes, Bacteroidetes e Actinobacteria. As famílias Lachnospiraceae e Tannerellaceae estavam presentes em ambos pacientes com abundâncias relativas diferentes, em relação à Tannerellaceae apresentou-se baixa em S68 e alta em S9 e Lachnospiraceae baixa em S9 e alta em S68. Notavelmente constatou-se diferença

quanto à família Enterobacteriaceae, ausente em S68, e presente em S9, e também em relação aos gêneros nesses 2 pacientes. Havia 10% de *Faecalibacterium* spp. e cerca de 70% de OTUs não identificadas em S68, enquanto no paciente S9, *Eubacterium_coprostanoligenes_group* (~20%) foi predominante, seguido pelos gêneros *Parabacteroides* (~8%) e *Ruminococcaceae* UCG_002 (~8), além de menores concentrações de *Faecalibacterium* spp. (~2%) e presença de *Escherichia-Shigella*. No Quadro abaixo tem-se os principais achados clínicos nos pacientes avaliados junto às informações acerca de seus respectivos microbiomas.

Tabela 5 - Organização das características clínicas associadas com o perfil do microbioma de pacientes com retocolite ulcerativa.

Paciente	Condição Clínica		Perfil do microbioma	
	Exames	Fase	Famílias	Gêneros
S79	Leucocitose; PCR reagente (+); Calprotectina > 1.000 µg/g	Ativa: Pancolite	Ausência das famílias Bifidobacteriaceae e Prevotellaceae; abundância de Bacteroidaceae.	Ausência dos gêneros <i>Prevotella</i> e <i>Eubacterium</i> ; presença de <i>Escherichia-Shigella</i> .
S71	PCR reagente (+); Calprotectina: 870 µg/g	Ativa: Pancolite	Abundância de Prevotellaceae; menor presença de Tannerellaceae, Rikenellaceae e Bifidobacteriaceae.	Abundância dos gêneros <i>Prevotella</i> e <i>Faecalibacterium</i> ; gênero <i>Bacteroides</i> diminuído.
S146	Calprotectina >1000 µg/g	Ativa: Pancolite	Presença da família Enterobacteriaceae.	Abundância dos gêneros <i>Prevotella</i> e <i>Faecalibacterium</i> .
S80	PCR não reagente (-); Calprotectina: 610 µg/g	Ativa: Pancolite	Abundância de Prevotellaceae. Em níveis diminuídos: Ruminococcaceae Bacteroidaceae e Lachnospiraceae.	Abundância de <i>Prevotella</i> spp. e <i>Eubacterium</i> spp.
S68	PCR reagente (+); Calprotectina: 876 µg/g	Ativa: Pancolite	Ausência da família Bacteroidaceae e menor concentração na família Prevotellaceae.	Grande parte do microbioma sem identificação. Baixa concentração de <i>Faecalibacterium</i> spp. e <i>Prevotella</i> spp.
S143	PCR reagente (+); Calprotectina >1000 µg/g	Ativa: Pancolite	Abundância de Prevotellaceae, com diminuição de Lachnospiraceae.	Abundância do gênero <i>Prevotella</i> .
S66	PCR não reagente (-); Calprotectina > 1000 µg/g	Ativa: Pancolite	Abundância de Ruminococcaceae. Níveis menores de Prevotellaceae	Abundância dos gêneros <i>Faecalibacterium</i> .
S9	PCR reagente (+); hipoalbuminemia;	Ativa: Pancolite,	Abundância de Ruminococcaceae. Família	Ausência de <i>Prevotella</i> spp. Abundância do gênero

	Calprotectina: 255 µg/g	Colite Distal	Prevotellaceae ausente e presença de Enterobacteriaceae.	<i>Eubacterium</i> e presença de <i>Escherichia-Shigella</i> .
S72	PCR não reagente (-); Calprotectina: 795 µg/g	Remissão: Pancolite	Abundância da família Prevotellaceae. Presença diminuída de Bacteroidaceae.	Abundância dos gêneros <i>Prevotella</i> .
S74	PCR não reagente (-); Calprotectina <30 µg/g	Remissão: Pancolite	Abundância de Bacteroidaceae. Presença de Enterobacteriaceae.	Abundância de <i>Bacteroides</i> spp. Ausência de <i>Prevotella</i> spp.
S196	PCR reagente (+); Calprotectina 419 µg/g	Remissão: Colite Distal	Abundância da família Prevotellaceae. Menores níveis em Bacteroidaceae e Tannerellaceae.	Abundância do gênero <i>Prevotella</i> .
S198	PCR não reagente (-); Calprotectina Calprotectina < 30 µg/g	Remissão: Colite Distal	Abundância de Lachnospiraceae. Ruminococcaceae diminuído e ausência da família Prevotellaceae.	Abundância dos gêneros <i>Bacteroides</i> e ausência de <i>Prevotella</i> ..
S139	PCR reagente (+); Calprotectina: 52 µg/g	Remissão: Colite Distal	Abundância em Ruminococcaceae, e presença da família Enterobacteriaceae.	Abundância do gênero <i>Eubacterium</i> . Presença de <i>Escherichia-Shigella</i> e nível ínfimo de <i>Prevotella</i> .
S148	PCR não reagente (-); Calprotectina <30 µg/g	Remissão: Colite Distal	Abundância de Ruminococcaceae.	Grande parte do microbioma sem identificação Presente em níveis baixos os gêneros <i>Faecalibacterium</i> e <i>Ruminococcaceae</i> . <i>Bacteroides</i>
S76	PCR não reagente (-); Calprotectina <30 µg/g	Remissão: Colite Distal	Abundância de Bacteroidaceae. Presença de Enterobacteriaceae.	Ausência do gênero <i>Prevotella</i> e presença de <i>Escherichia-Shigella</i> .
S8	PCR não reagente (-); Calprotectina 351 µg/g	Ativa: Colite Distal	Abundância de Bacteroidaceae. Família Prevotellaceae ausente.	Ausência de <i>Prevotella</i> spp. Abundância de <i>Bacteroides</i> spp.
S28	PCR reagente (+); Calprotectina >1000 µg/g	Ativa: Colite Distal	Abundância de Bacteroidaceae e Enterobacteriaceae. Família Prevotellaceae ausente.	Ausência de <i>Prevotella</i> spp. e presença de <i>Escherichia- Shigella</i> ; Abundância de <i>Bacteroides</i> spp.
S70	Calprotectina: 848 µg/g	Ativa: Colite Distal	Ausência da família Prevotellaceae.	Ausência de <i>Prevotella</i> ssp. Abundância dos gêneros <i>Lachnospiraceae</i> e <i>Faecalibacterium</i> .

Fonte: Autora (2021)

5.4 Perfil e identificação da comunidade microbiana intestinal de indivíduos saudáveis (sem doenças inflamatórias intestinais)

Com a aplicação de questionário estruturado, apenas 5 indivíduos saudáveis foram selecionados para compor o repositório de material fecal do HUPAA/FAMED-UFAL, visando inicialmente a análise do material fecal para comparação do microbioma dos mesmos com pacientes portadores de DIIs. Os voluntários tinham idade entre 23 e 46 anos, e nenhum apresentava comorbidades ou hábitos tabagistas, assim como nenhum deles utilizava medicamentos de uso contínuo. Já em relação ao consumo de prebióticos, apenas a voluntária S317 alegou que fazia uso até o momento da aplicação do questionário (Tabela 6).

Tabela 6 - Perfil sociodemográfico dos indivíduos saudáveis selecionados após aplicação de questionário.

Código do paciente	Gênero	Idade	Comorbidades	Tabagismo	Etilismo
S29	F	37	Não	Não	Não
S31	M	46	Não	Não	Sim
S26	F	28	Não	Não	Sim
S22	F	40	Não	Não	Sim
S317	F	23	Não	Não	Sim

Fonte: Autora (2021)

Em relação ao *metabarcoding* de amostras fecais dos indivíduos sem DII, observamos uma variação de filos, famílias e gêneros entre eles, sendo possível identificar semelhanças entre os microbiomas. Os filos Firmicutes e Bacteroidetes foram predominantes, enquanto os demais filos (Proteobacteria, Actinobacteria, Tenericutes), apresentaram-se em menores concentrações (Gráfico 4).

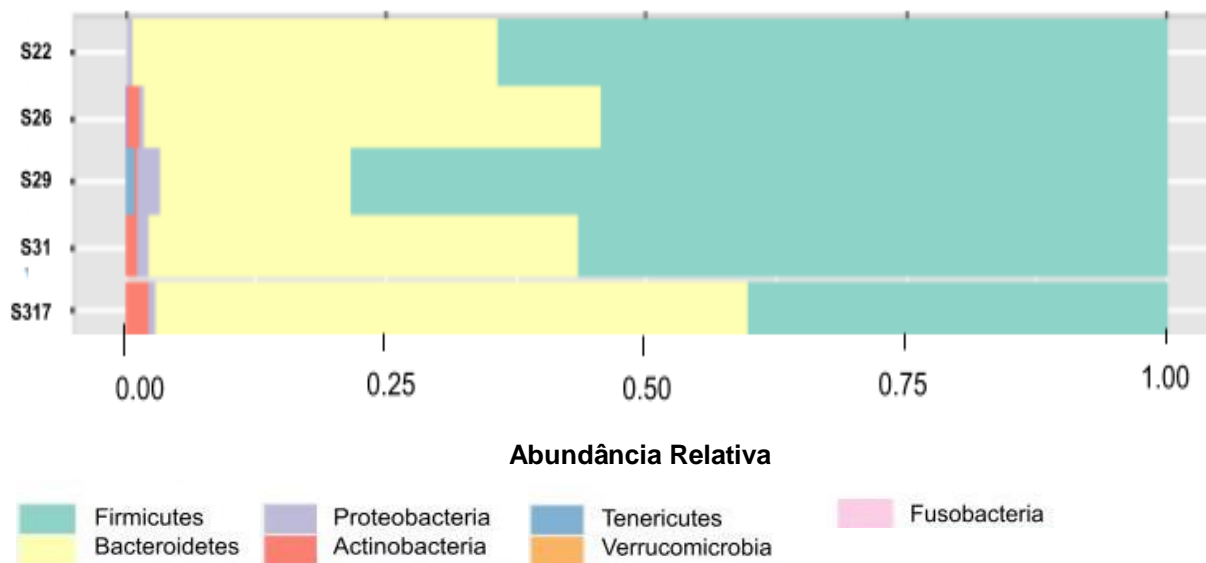
Houve bastante distribuição de famílias identificadas no microbioma dos indivíduos sem DIIs, e algumas com abundância relativa mais significativa, como Ruminococcaceae, Bacteroidaceae, Lachnospiraceae e Prevotellaceae. A família Prevotella não foi identificada em todos os microbiomas, mas a mesma apresentou-se em maior abundância em S31 (~48%) e estava ausente em S26.

Entre as famílias com menor abundância relativa destacam-se Tannerellaceae e Rikenellaceae, pois apenas em S317 essas famílias apresentaram-se em maior abundância (Gráfico 5), sendo constatada ainda a ausência da família Enterobacteriaceae no microbioma de todos os indivíduos da amostra (n=5).

Bacteroides spp., *Prevotella_9* e *Faecalibacterium* spp. foram os gêneros dominantes na MI de indivíduos sem DII, sendo que S31 apresentou presença significativa de *Prevotella_9* (~45%), diferenciando-se das demais amostras. O gênero *Faecalibacterium* foi encontrado em abundância nesses microbiomas, chegando a até 30% em uma das amostras (S31).

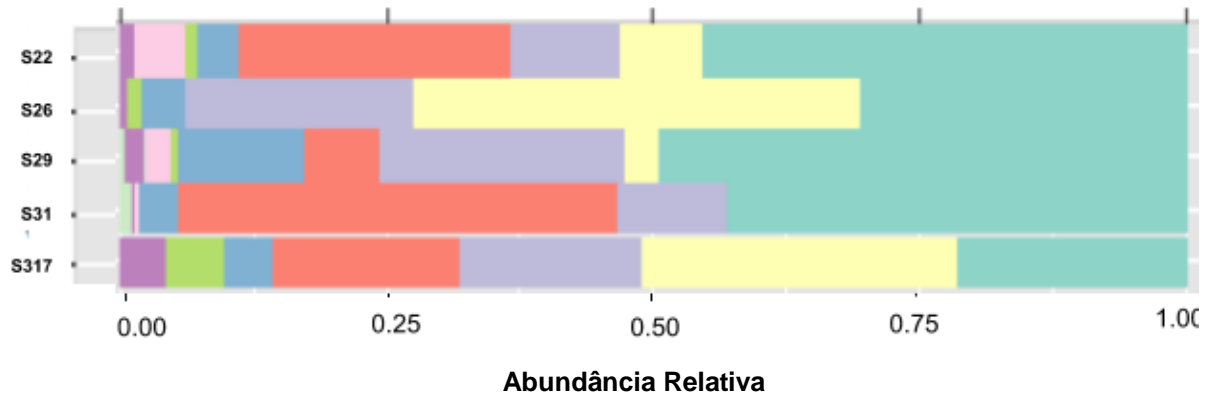
Os gêneros *Ruminococcaceae* UCG_002, *Lachnospiraceae* NK4A136, *Parabacteroides* spp., *Roseburia* spp. e *Eubacterium_coprostanoligenes_group* estavam presentes em menor abundância relativa nas amostras; contudo, *Eubacterium_coprostanoligenes_group*, apresentou-se com valores expressivos em S29 (~13%). Outros gêneros identificados em alta nessas amostragens foram *Parabacteroides* e *Roseburia*, com aproximadamente 4% e 5%, em S317, respectivamente, além de ausência de *Escherichia-Shigella* em todos os voluntários (Gráfico 6).

Gráfico 4 - Filos de bactérias identificados nas amostras fecais de indivíduos sem doenças inflamatórias intestinais.



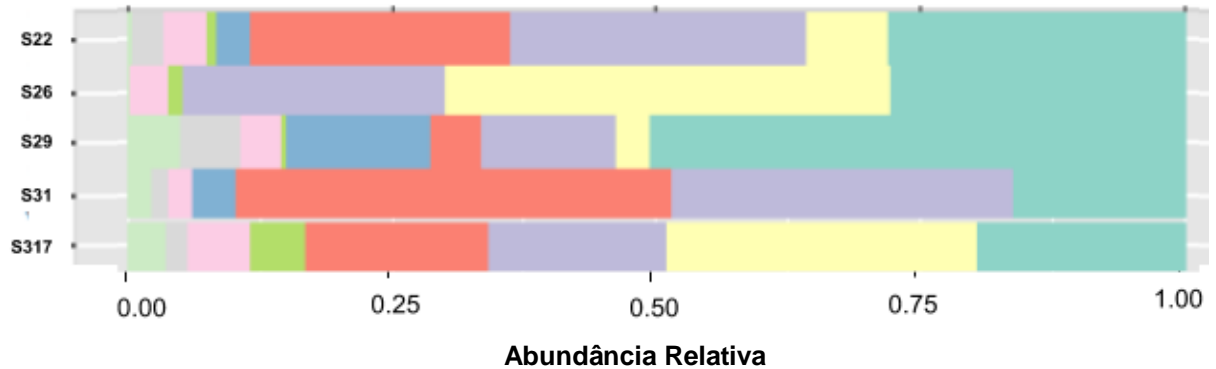
Fonte: Autora (2021)

Gráfico 5 - Famílias de bactéria identificadas nas amostras fecais de indivíduos sem doenças inflamatórias intestinais.



Fonte: Autora (2021)

Gráfico 6 - Gêneros de bactérias identificados nas amostras fecais de indivíduos sem doenças inflamatórias intestinais.



Fonte: Autora (2021)

5.4.1 Comparação entre microbiomas de indivíduos saudáveis e portadores de retocolite ulcerativa

A partir dos resultados obtidos dos microbiomas de pacientes com RCU e dos indivíduos sem DII, constatou-se que o filo Bacteroidetes esteve presente em todos os

voluntários analisados. Entretanto, em duas amostras de pacientes (S68 e S148) observamos uma diminuição significativa desse filo (cerca de 8%). As demais amostras dos pacientes e dos indivíduos sem DII apresentaram abundância relativa maior referente ao filo Firmicutes em concentrações que variaram de ~28% a 87%, seguido de Bacteroidetes (~22% a 64%).

O filo Proteobacteria encontrava-se em alguns pacientes de maneira mais expressiva (S146, S198, S28, S70, S71, S72, S74, S76 e S9), chegando a ~10% (S28), enquanto que os indivíduos sem DII apresentaram uma menor abundância relativa de proteobactérias, com concentração máxima de ~2% (S317). Em relação ao filo Actinobacteria, constatou-se que em 13 amostras de pacientes as concentrações foram até 1% da microbiota total, enquanto que no grupo controle esse filo estava presente em 4 de 5 amostras, com valores acima de 1% em 3 destas (S26, S31 e S317).

Os indivíduos saudáveis apresentaram níveis quantitativos mais baixos nas famílias Tannerellaceae e Rikenellaceae; entretanto, observou-se que os níveis eram sutilmente maiores em relação às amostras dos pacientes. A família Enterobacteriaceae não foi encontrada no microbioma dos voluntários sem DIIs, diferente do observado no microbioma de 8 pacientes, enquanto que a família Bacteroidaceae estava em alta em ambos os grupos (pacientes RCU e indivíduos sem DII), com abundâncias relativas entre 30% a 45%.

A família Prevotellaceae foi confirmada em 4 voluntários saudáveis (S22, S29, S31 e S317), apresentando-se em maior abundância no microbioma S31 (~45%). Entre os pacientes, S143 apresentou 48% da família Prevotellaceae, enquanto que em 8 pacientes confirmou-se a ausência dessa família e nos demais pacientes haviam concentrações variadas. *Eubacterium_coprostanoligenes_group* teve presença mais significativa entre as amostras dos indivíduos saudáveis, estando ausente em S26 e S317, diferente do observado no grupo com RCU, com abundância relativa diminuída majoritariamente nas amostras (S148, S28, S66, S68, S70, S71, S72, S74, S76 e S79). Também não foi possível constatar a presença de *Escherichia-Shigella* em indivíduos saudáveis (Tabela 7).

Tabela 7. Comparativo entre os microbiomas de pacientes com retocolite ulcerativa e indivíduos sem doenças inflamatórias intestinais.

Unidades taxonômicas	Paciente com RCU	Sem DII	n*
Bacteroidetes	↑	↑	13/5
Firmicutes	↑	↑	16/5
Actinobacteria	↓	↑	13/3
Proteobacteria	↑	↓	13/4
Tannerellaceae	↓	↓	10/4
Rikenellaceae	↓	↓	10/3
Lachnospiraceae	↓	↑	11/3
<i>Faecalibacterium</i> spp.	↓	↑	9/5
<i>Eubacterium</i> spp.	↓	↑	10/3
<i>Escherichia-Shigella</i>	↑	↓	7/0

*amostragem total com as características apresentadas em pacientes com RCU/indivíduos sem DII.

↓ Abundância relativa diminuída

↑ Abundância relativa aumentada

Fonte: Autora (2021)

6 DISCUSSÃO

O presente estudo focou na identificação do microbioma de pacientes com RCU, buscando similaridades e variações na abundância relativa de filos, famílias e gêneros. Os dados revelaram que pacientes com RCU, independente da fase clínica apresentada, apresentaram abundância relativa elevada dos filos Bacteroidetes, Firmicutes e Proteobacteria. Em seguida, buscou-se avaliar as diferenças mais significativas entre esses pacientes e indivíduos saudáveis sem DIIs que doaram material fecal para o repositório de material fecal do InHaMMI. Os resultados observados correlacionam-se com o que foi relatado por Santoru e colaboradores (2017) em estudo com metagenômica e metabolômica que analisou amostras fecais de pacientes com DII, identificando o aumento desses filos nos pacientes com DII, exceto pela diminuição do filo Bacteroidetes (cerca de 33,63% no grupo DII), gerando aumento na razão entre Bacteroidetes e Firmicutes e caracterizando disbiose.

Os filos Bacteroidetes e Firmicutes tem grande importância no TGI por promoverem a homeostase no microbioma intestinal, mas quando há discrepâncias na relação entre ambos (F/B) é um indicativo de disbiose que pode gerar quadro de doença; por exemplo, quando Bacteroidetes está aumentado há possibilidade de DII, enquanto o aumento de Firmicutes está ligado à obesidade (STOJANOV et al., 2020; ABENAVOLI et al., 2019; KOPF et al., 2018).

Corroborando com os resultados obtidos do presente estudo, o filo Proteobacteria apresentou-se aumentado nos resultados de Santoru e colaboradores (2017), com cerca de 13,67% no microbioma dos pacientes com DII, e esse aumento sugere uma relação significativa do filo e a DII. Avaliação do microbioma de roedores como modelos de colite após sequenciamento do 16S rRNA sugeriu que respostas imunes desreguladas promovem o crescimento de proteobactérias que, por sua vez, promovem inflamação intestinal (MAHARSHAK et al., 2013).

As proteobactérias incluem enterobactérias (família Enterobacteriaceae), identificadas em níveis aumentados nos pacientes com RCU de Alagoas. Esta família tem sido associada como um dos marcadores da disbiose, pois normalmente é observada na MI saudável em concentrações próximas a 0,1% (WINTER et al., 2013; OOI et al., 2018; MORGAN et al., 2012). O estudo de Sassone-Corsi e colaboradores (2016) demonstraram a primeira evidência de que as microcinas são responsáveis pela competição das enterobactérias com as demais bactérias em um intestino inflamado, e enterobactérias produtoras de microcinas tem vantagem no meio competitivo em relação a outras bactérias devido à ação antibacteriana dessa proteína.

Avaliações das MI a partir de amostras fecais e biópsias indicou aumento de enterobactérias em pacientes DII, principalmente *Escherichia-Shigella* (MORGAN et al., 2012), assim como constatamos no presente estudo.

Maharshak e colaboradores (2013) relataram diminuição do filo Actinobacteria em camundongos com deficiência em IL-10 (interleucina anti-inflamatória) como modelo de DII, assim como os resultados obtidos no presente estudo. Membros do gênero *Bifidobacterium* do filo Actinobacteria contribui para a homeostase do hospedeiro devido a capacidade de *Bifidobacterium* spp. digerir monossacarídeos, sendo considerado como um dos gêneros que podem ser utilizados na terapia probiótica das DIIs (HIDALGO-CANTABRANA et al., 2017).

Microbiomas de camundongos selvagens como modelo de colite exacerbado confirmaram abundância relativa elevada de membros de Prevotellaceae (ELINAV et al., 2011), assim como observado na presente pesquisa. *Prevotellaceae*_ UCG_001 (da família Prevotellaceae) foi aumentada em camundongos com câncer colorretal e colite induzidos, principalmente na presença de tumores na mucosa intestinal: viu-se que aumentou em 6 vezes a sua concentração no microbioma da fêmea em relação ao macho (IBRAHIM et al., 2019). Membros dessa família podem atuar prejudicando na função de barreira da mucosa por meio da produção de sulfatases que degradam os oligossacarídeos do muco (ELINAV et al., 2011; RODRÍGUEZ-PIÑEIRO et al, 2015).

Já em relação às famílias, constatamos o aumento de Ruminococcaceae e diminuição de Lachnospiraceae nos pacientes com RCU, e pesquisas anteriores apontam situação similar, em amostras fecais frescas de pacientes RCU com diminuição de Lachnospiraceae (15, 78%) e de *Ruminococcus* spp. (0,42%) (ZHANG et al., 2019). Em camundongos com colite e deficientes de IL-10 observaram-se níveis baixos de membros de famílias produtoras de AGCCs (Lachnospiraceae e Ruminococcaceae), e os produtos destas bactérias são importantes na manutenção da homeostase intestinal (KANG et al., 2018).

Dai e colaboradores (2021) confirmaram a presença de *Roseburia* spp., *Faecalibacterium* spp. e *Eubacterium_coprostanoligenes_group* em abundância relativa baixa, assim como constatamos nos pacientes avaliados; sabe-se que membros dos gêneros *Roseburia* e *Faecalibacterium* são responsáveis pela produção de AGCCs, fonte de energia primária para células epiteliais do cólon, trazendo indícios de que essas alterações na microbiota benéfica deve estar associada à DII (MA et al., 2018). *Eubacterium_coprostanoligenes_group* tem sido relatado como atuante na degradação do colesterol intestinal com a formação de produtos mal

absorvidos pela MI como o coprostanol, e com a redução da quantidade de colesterol absorvida pela MI há uma contribuição para a homeostase intestinal do indivíduo (VLACIL et al., 2020).

Patógenos comumente em baixa abundância, como *Escherichia-Shigella*, se multiplicam mais no tecido inflamatório devido às condições estabelecidas que geram a disbiose, como a diminuição de bactérias benéficas que atuam suprimindo esse aumento (ZENG et al., 2017). Pacientes chineses com RCU apresentaram níveis elevados de *Escherichia* spp. em seu microbioma (~8-44%) (CHEN et al, 2017), coincidindo com os resultados identificados entre os pacientes com RCU do presente estudo. A família Enterobacteriaceae apresenta-se em concentrações elevadas em condições clínicas que envolvem inflamação, como DII, contribuindo potencialmente para a patogênese do desenvolvimento da doença (ZENG et al., 2017; MORGAN et al, 2012).

Nos pacientes com RCU, há infiltração de células do sistema imunológico para a mucosa intestinal, caracterizando a resposta inflamatória exacerbada na doença (ZHANG; SHI, 2020), gerando um ambiente propício para micro-organismos transitórios com potencial patogênico. Observamos no microbioma do paciente com leucocitose a presença de *Escherichia-Shigella* e ausência de *Bifidobacterium* spp., gênero atuante na restauração da função da barreira da mucosa alterada (SHEN et al., 2018), e que demonstrou proteção contra colite induzida em camundongos com níveis de AGCCs aumentados (SINGH et al., 2020).

A variação de calprotectina fecal (FC) em pacientes com RCU está ligada proporcionalmente à migração de neutrófilos para a mucosa intestinal, refletindo a gravidade da inflamação da mucosa e auxiliando a distinguir entre DII ativa ou inativa (SCHOEPFER et al., 2013). Franzosa e colaboradores (2019) reforçam que a ampla variação no perfil metabólico e metagenômico nas amostras fecais dos indivíduos com RCU possivelmente podem ser explicadas também pelos níveis de inflamação ativa dos mesmos.

A disbiose intestinal facilita a expansão de famílias como Prevotellaceae e de *Escherichia-Shigella* (WEISS et al., 2017), constatadas nos pacientes avaliados. Os pacientes em remissão apresentaram também abundância de bactérias produtoras de AGCCs (*Bacteroides* spp. e *Faecalibacterium* spp.) em relação aos pacientes da fase ativa, de acordo com os resultados da CF, e tal melhora na condição clínica pode ser associada a vários fatores, como a resposta aos medicamentos utilizados (ADAMS; BORNEMANN, 2013).

Os pacientes com RCU apresentam Tannerellaceae e Rikenellaceae em níveis relativamente baixos quando comparados a indivíduos saudáveis, o que foi já constatado no microbioma de pacientes com RCU por Alam e colaboradores (2020), e pode ser indicador de possível relação entre sua concentração e a manutenção da homeostase intestinal. Entre os principais representantes dessas famílias tem-se *Parabacteroides* spp. (Tannerellaceae), identificado na barreira da mucosa intestinal em camundongos sem doença, e *Alistipes* spp. (Rikenellaceae), que apresenta a capacidade de produzir AGCCs a partir de aminoácidos (JAKOBSSON et al., 2015; FENG et al, 2015). Esses resultados sugerem que a redução dessas famílias pode ser um dos fatores que contribuem para progressão ou estabelecimento de um estado inflamatório no paciente com RCU.

Em relação a Tannerellaceae, ainda não se sabe se está ligada à manutenção da homeostase intestinal com função específica no microbioma (WANG et al., 2020), mas a família Rikenellaceae apresenta-se em abundância em modelo animal com colite após tratamento com *Akkermansia muciniphila*, espécie com potencial probiótico para mucosa afetada por colite, proporcionando melhores condições para micro-organismos benéficos (BIAN et al., 2019).

As comunidades microbianas que compõem o TGI diferem entre os indivíduos por diversos fatores (idade, dieta e outros), podendo ser considerado um microbioma saudável quando apresenta biodiversidade microbiológica elevada de filos e gêneros específicos (RUAN et al., 2020). Os indivíduos saudáveis apresentam níveis baixos ou ausência do filo Proteobacteria, somando-se a isso a alta abundância de bactérias como *Bacteroides* spp. (ARUMUGAM et al., 2011; NOOR et al, 2010), que possui capacidade de digerir carboidratos provenientes da dieta; os microbiomas que apresentam abundância de *Prevotella* spp. apresentam maior degradação das glicoproteínas do muco que reveste a camada mucosa intestinal, devido à capacidade de degradação do muco por bactérias deste gênero (ARUMUGAM et al., 2011),

As bactérias produtoras de butirato, como *Roseburia* spp. e *Faecalibacterium* spp., apresentam-se em maior abundância na MI de indivíduos saudáveis, contribuindo na manutenção da camada protetora intestinal (MACHIELS et al., 2014). A contribuição das famílias Tannerellaceae e Rikenellaceae para o microbioma saudável ainda não está claro; contudo, são identificadas em indivíduos saudáveis em níveis maiores quando comparados a microbiomas associados à RCU (ALAM et al., 2020; OSAKA et al., 2017). Em relação à

Escherichia-Shigella, a sua presença não é identificada significativamente no microbioma saudável, sendo um marcador da disbiose intestinal devido ao potencial altamente competitivo e patogênico na mucosa local (ANDERSON et al., 2016; CATTANEO et al, 2017).

Pacientes em estado crítico com barreira intestinal hiperpermeável e desregulação da resposta inflamatória tem um ambiente mais favorável ao desenvolvimento de patobioma, microbiota com aumento de bactérias potencialmente patogênicas (Moron et al., 2019). Tal situação pode ocorrer quando proteobactérias encontram-se aumentadas no MI de pacientes com RCU, conforme constatamos no pacientes, podendo ter presença considerada como possível biomarcador ou mesmo alvos terapêuticos para algumas doenças, como a DII (WEINGARDEN; VAUGHN, 2017; TANG, 2017).

Já em relação à indivíduos saudáveis, sem DIIs, enterobactérias são observadas em níveis baixos em indivíduos saudáveis, pois a integridade da mucosa e o conjunto da MI dificultam sua expansão (ZENG et al., 2017). O microbioma saudável tem forte presença das famílias Ruminococcaceae e Lachnospiraceae que podem diminuir com o avanço da idade (BIAGE et al., 2016), e ambas fomentam a homeostase. Membros da Lachnospiraceae convertem ácidos biliares primários em secundários facilitando a resistência à colonização contra patógenos intestinais, contribuindo para a homeostase intestinal (SORBARA et al., 2020).

É importante tratar da quantidade mais baixa de indivíduos saudáveis no grupo controle, o que não garantiu alta equidade em relação ao grupo teste de pacientes com RCU, pois seria ideal ter uma composição mais próxima entre indivíduos do grupo teste e grupo controle para uma correlação mais adequada em estudos tipo caso-controle. Os voluntários do grupo teste são doadores regulares do repositório de material fecal do HUPAA/FAMED-UFAL, e passaram por minuciosa triagem por questionários específicos e exames laboratoriais para serem selecionados quando muitos não podem se tornar doadores de material fecal visando o transplante de microbiota fecal. Os indivíduos saudáveis tem a possibilidade de realizar a doação de material fecal múltiplas vezes, uma vez que o material permanece estável por longo período quando armazenado em suspensão a -80 °C, e por isso não é necessário um número elevado de doadores saudáveis para compor um repositório de material fecal (TERVEER et al., 2017). Um país do leste europeu estabeleceu seu repositório de material fecal com apenas 8 indivíduos saudáveis que foram selecionados por meio de aplicação de questionário e análise de exames entre 112 voluntários (NAKOV et al., 2021), e o acompanhamento de poucos

doadores garante aos pacientes acesso a amostra confiável ao transplante de microbiota fecal (TMF).

A avaliação dos microbiomas intestinais de pacientes com RCU possibilita conhecer padrões de disbiose e identificar possíveis relações entre o hospedeiro doente e os microrganismos do local, buscando entender a sua interferência na promoção da saúde e da doença (WANG et al., 2015). O microbioma intestinal saudável tem uma radutor e maior diversidade de bactérias benéficas, e já foi constatado que quando transferido por colonoscopia para um ambiente intestinal em situação de RCU por meio de transplante de microbiota fecal (TMF) promove uma redução significativa na produção de IFN γ (citocina pró-inflamatória) na mucosa do paciente, em até 4 semanas pós-TMF, devido ao aumento de determinados microrganismos que levaram a uma melhora clínica dos pacientes (JACOB et al., 2017; COSTELLO et al, 2019).

A comparação dos padrões observados em pacientes com o microbioma de indivíduos saudáveis trouxe informações importantes, e o aumento de pesquisas nessa direção pode auxiliar no desenvolvimento de novas terapias, seja aperfeiçoando probióticos direcionados à recomposição de microbiotas relacionadas a doenças específicas para um estado de MI considerado mais saudável, ou dando subsídios para maior entendimento acerca de microbiomas saudáveis, e assim facilitar a busca por doadores visando o apoio e aumento do uso de terapias ainda consideradas alternativas como o TMF.

7 CONCLUSÃO

- A caracterização do microbioma de pacientes com RCU indicou aumento do filo Proteobacteria e da família Enterobacteriaceae, além de diminuição das famílias Tannerellaceae e Rikenellaceae;
- Pacientes com RCU apresentaram abundante presença de membros da família Prevotellaceae e diminuição de bactérias do gênero *Roseburia* spp. e *Faecalibacterium* spp.
- Houve redução na abundância relativa da família Bifidobacteroidaceae e presença de enterobactérias no microbioma intestinal do paciente que apresentou discreta leucocitose;
- Constatou-se variação no microbioma de pacientes com RCU de acordo com o grau de inflamação em que se encontravam, com diminuição de *Bacteroides* spp. e *Faecalibacterium* spp. em situação clínica de RCU ativa;
- *Escherichia-Shigella* estava ausente em indivíduos saudáveis, mas presente no microbioma de pacientes com RCU, podendo a presença dessas enterobactérias ser considerada um marcador da disbiose intestinal da RCU;
- Diferenças significativas em relação à família Lachnospiraceae (produtores de AGCCs) e *Parabacteroides* spp. foram constatadas entre os microbiomas de pacientes com RCU e de indivíduos saudáveis, e a diminuição observada nos pacientes deve favorecer a manutenção do estado clínico;

REFERÊNCIAS

- ABENAVOLI, L. et al. Gut Microbiota and Obesity: A Role for Probiotics. **Nutrients**, vol. 11, 2019. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31703257/>>
- ADAMS, S. M.; BORNEMANN, P. H. Ulcerative colitis. **American family physician**, vol. 87, 2013. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23939448/>>
- AGUIAR, F.J.B et al. C-reactive protein: clinical applications and proposals for a rational use. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 59, 2013. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23440147/>>
- ALAM, M.T et al. Microbial imbalance in patients with inflammatory bowel disease at different taxonomic levels. **Gut Pathog**, 2020. Disponível em:<<https://doi.org/10.1186/s13099-019-0341-6>> Acesso em: 20/08/2021.
- ALLOCATI, N. et al. *Escherichia coli* in Europe: an overview. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, 2013. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24287850/>>
- ANDERSON, M.; SANSONETTI, P. J.; MARTEYN, B. S. Shigella Diversity and Changing Landscape: Insights for the Twenty-First Century. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, vol. 6 45, 2016. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27148494/>>
- ARANE, K.; GOLDMAN, R. D. *Fusobacterium* infections in children. **Canadian family physician Medecin de famille canadien**, vol. 62,10. 2016. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27737977/>>
- ARUMUGAM, M. et al. Enterotypes of the human gut microbiome. **Nature**, 2011, p. 174-80. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21508958/>>
- BAJER, L. et al. Distinct gut microbiota profiles in patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. **World journal of gastroenterology**, 2017.
- BARKA, E.A. et al. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**. Vol. 80,1 1-43, 2015.
- BECKER, C.; NEURATH, M. F.; WIRTZ, S. The Intestinal Microbiota in Inflammatory Bowel Disease. **ILAR J.**, 2015.
- BELZER, C. et al. Microbial Metabolic Networks at the Mucus Layer Lead to Diet-Independent Butyrate and Vitamin B12 Production by Intestinal Symbionts. **mBio**, 2017.
- BELZER, C.; DE VOS, W. M. Microbes inside—from diversity to function: the case of Akkermansia. **ISME J**. 2012. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22437156/>>
- BIAGI, E. et al. Gut microbiota and extreme longevity. **Current Biology**, vol. 26. 6, 2016. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27185560/>>
- BIAN, X. et al. Administration of *Akkermansia muciniphila* Ameliorates Dextran Sulfate Sodium-Induced Ulcerative Colitis in Mice. **Frontiers in microbiology**, 2019.

BOLYEN, E. et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature biotechnology**, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Bulário eletrônico**. Disponível em:<<https://consultas.anvisa.gov.br/#/bulario/q/?nomeProduto=PREDNISONA>>. Acesso em: 08/10/2021

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Conjunta Nº 6, de 26 de março de 2020. **Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Retocolite Ulcerativa**. Brasília, DF. 2020. Disponível em:< <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2020/April/01/PCDT-Retocolite-Ulcerativa.01.04.2020.pdf>> Acesso em: 02/08/2021.

BUENDÍA, E. et al. Gut microbiota components are associated with fixed airway obstruction in asthmatic patients living in the tropics. **Relatórios científicos**, vol. 8,1 9582, 2018. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29941875/>>

BUHLMANN. **IBDoc Instruções de uso: Pacientes e utilizadores**. 2019. Disponível em:<https://www.ibdoc.net/wp-content/uploads/2019/01/LF-IBDOC8_IFU-CE_V4.0-BR_2019-01-22.pdf>. Acesso em:12/10/2021.

CAPORASO, J.G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nat Methods**. 2010. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20383131/>>

CAPUTO, A. et al. Pan-genomic analysis to redefine species and subspecies based on quantum discontinuous variation: the Klebsiella paradigm. **Biology direct**, vol. 10 55, 2015. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26420254/>>

CARVALHO, R. et al. Metagenomic Approaches for Investigating the Role of the Microbiome in Gut Health and Inflammatory Diseases. **IntechOpen**. 2017.

CATTANEO, A. et al. Association of brain amyloidosis with pro-inflammatory gut bacterial taxa and peripheral inflammation markers in cognitively impaired elderly. **Neurobiology of aging**, vol. 49, 2017.

CHEN, D. et al. Effects of Appendectomy on the Onset and Course of Ulcerative Colitis in Chinese Patients. **Gastroenterology research and practice**. 2018. Disponível em:<<https://doi.org/10.1155/2018/2927891>> Acesso em: 24/06/2021

CHEN, G. et al. Partners of patients with ulcerative colitis exhibit a biologically relevant dysbiosis in fecal microbial metacommunities. **World Journal of Gastroenterology**, 2017. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28740351/>>

CHEN, Y. et al. Fusobacterium nucleatum facilitates ulcerative colitis through activating IL-17F signaling to NF- κ B via the upregulation of CARD3 expression. **The Journal of pathology**, 2020. Disponível em:<<https://doi.org/10.1002/path.5358>>. Acesso em: 24/07/2021

CHU, H. et al. Gene-microbiota interactions contribute to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Science**, vol. 352.6289, 2016.

- CONSÓRCIO DO PROJETO MICROBIOMA HUMANO. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**, 2012. Disponível em:<
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22699609/>>
- COSTELLO, S. P. et al. Effect of Fecal Microbiota Transplantation on 8-Week Remission in Patients With Ulcerative Colitis: A Randomized Clinical Trial. **JAMA**, 2019.
- DAI, L. et al. Gut Microbiota and Related Metabolites Were Disturbed in Ulcerative Colitis and Partly Restored After Mesalamine Treatment. **Frontiers in pharmacology**, vol. 11 620724, 2021.
- DAMMAN, C.J. et al. Low-Level Engrafting and Improvement after Single Administration of Fecal Microbiota for Patients with Ulcerative Colitis. **PLoS Um**, 2015. Disponível em:<
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26288277/>>
- DANESE, S.; FIOCCHI, C. Ulcerative colitis. **The New England journal of medicine**. 2011, p. 1713-25.
- DERRIEN, M.; BELZER, C.; DE VOS, W. M. *Akkermansia muciniphila* and its role in regulating host functions. **Microbial pathogenesis**, v. 106, 2017. Disponível em:<
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26875998/>>
- DHARIWAL, A. et al. MicrobiomeAnalyst - a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. **Nucleic Acids Research**, 2017.
- DONALDSON, G.P. et al. Intestinal microbiota uses immunoglobulin A for mucosal colonization. **Science**, v. 360.6390, 2018.
- DONALDSON, G. P.; LEE, M. S.; MAZMANIAN, S. Gut biogeography of the bacterial microbiota. **Nature reviews. Microbiology**, 2016.
- DURANTI, S. et al. Elucidating the gut microbiome of ulcerative colitis: bifidobacteria as novel microbial biomarkers. **FEMS microbiology ecology**, v. 92.12, 2016. Disponível em:<
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27604252/>>
- ELINAV, E. et al. NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. **Cell**, v. 145.5, p. 745-57, 2011.
- EMERY, D. C. et al. 16S rRNA Next Generation Sequencing Analysis Shows Bacteria in Alzheimer's Post-Mortem Brain. **Front Aging Neurosci**. v. 9 195, 2017. Disponível em:<
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28676754/>>
- EVERARD, A. et al. Crosstalk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. **Process of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110.22, 2013.
- FENG, Q. et al. Gut microbiome development along the colorectal adenoma-carcinoma sequence. **Nature communications**, v. 6 6528, 2015. Disponível em:<
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25758642/>>

FORBES, J.D. et al. A comparative study of the gut microbiota in immune-mediated inflammatory diseases—does a common dysbiosis exist?. **Microbiome**, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s40168-018-0603-4>>. Acesso em: 24/07/2021

FRANZOSA, E.A. et al. Gut microbiome structure and metabolic activity in inflammatory bowel disease. **Nature microbiology**, 2019.

FUJIO-VEJAR, S. et al. The gut microbiota of healthy chilean subjects reveals a high abundance of the phylum verrucomicrobia. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1221, 2017.

GAJENDRAN, M. et al. A comprehensive review and update on ulcerative colitis. **Dis Seg.**, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30837080/>>

GAO, B.; GUPTA, R.S. Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum Actinobacteria. **Microbiology and molecular biology reviews** : MMBR. vol. 76,1, p. 66-112, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22390973/>>

GARRETT, W. S. et al. Enterobacteriaceae act in concert with the gut microbiota to induce spontaneous and maternally transmitted colitis. **Cell host & microbe**, v. 8,3, p. 292-300, 2010.

GEVERS, D. et al. The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease. **Cell host & microbe**. V. 15,3, p. 382-392, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24629344/>>

GLASSNER, K.L.; ABRAHAM, B.P.; QUIGLEY, E.M.M. O microbioma e a doença inflamatória intestinal. **J. Alergia Clin. Immunol.**, 2020.

Grupo de Estudos da Doença Inflamatória Intestinal do Brasil (GEDIIB). **Atualização em doenças inflamatórias intestinais: Conectando ciência à prática diária**. São Paulo, 2020. Disponível em: <https://gediib.org.br/wp-content/uploads/2020/09/Livro_GEEDIB_2019_Rev2-2.pdf> Acesso em: 25/09/2021.

GORVITOVSKAIA, A.; HOLMES, S.P.; HUSE, S.M. Interpreting Prevotella and Bacteroides as biomarkers of diet and lifestyle. **Microbiome**, 2016.

HANSEN, J. et al. The role of mucosal immunity and host genetics in defining intestinal commensal bacteria. **Current opinion in gastroenterology**, v. 26.6, 2010. Doi:10.1097/MOG.0b013e32833f1195

HANSEN, S.G.K.; SKOV, M.N.; JUSTESEN, U.S. Two Cases of *Ruminococcus gnavus* Bacteremia Associated with Diverticulitis. **Journal of Clinical**, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/JCM.03382-12>>. Acesso em: 24/07/2021.

HENKE, M.T. et al. *Ruminococcus gnavus*, a member of the human gut microbiome associated with Crohn's disease, produces an inflammatory polysaccharide. **Proc Natl. Acad. Sci**, 2019.

HEROVEN, A. K. et al. RNA-based mechanisms of virulence control in Enterobacteriaceae. **RNA biology**, v. 14,5, p. 471-487, 2017.

HIDALGO-CANTABRANA, C. et al. Bifidobacteria and Their Health-Promoting Effects. **Microbiology spectrum**, 2017.

HIIPPALA, K. et al. The Potential of Intestinal Commensals in Strengthening Intestinal Barrier Function and Relieving Inflammation. **Nutrients**, 2018. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30060606/>>

HOLD, G. L. et al. Oligonucleotide probes that detect quantitatively significant groups of butyrate-producing bacteria in human feces. **Applied and environmental microbiology**, v. 69,7, p. 4320-4, 2003.

HOLLISTER, E. B. et al. Compositional and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effects on human health. **Gastroenterology**, v. 146,6, p. 1449-58, 2014. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24486050/>>

HOSHINO, T.; INAGAKI, F. Application of Stochastic Labeling with Random-Sequence Barcodes for Simultaneous Quantification and Sequencing of Environmental 16S rRNA Genes. **PLoS One**. v. 12,1 e0169431, 2017. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28052139/>>

HOSSEINI, E. et al. Propionate as a health-promoting microbial metabolite in the human gut. **Nutrition reviews**, v. 69,5, p. 245-58, 2011.

HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**, v. 486,7402, p. 207-214, 2012.

IBRAHIM, A. et al. Colitis-induced colorectal cancer and intestinal epithelial estrogen receptor beta impact gut microbiota diversity. **International journal of câncer**, v. 144,12, p. 3086-3098, 2019.

ILJAZOVIC, A. et al. Modulation of inflammatory responses by *Prevotella* gastrointestinal spp. From associations to functional studies. **Int. J. Med. Microbiol**, 2021.

IMHANN, F. et al. Interplay of host genetics and gut microbiota underlying the onset and clinical presentation of inflammatory bowel disease. **Gut**, p. 108-119, 2018, 2016.

JACOB, Vinita et al. Single Delivery of High-Diversity Fecal Microbiota Preparation by Colonoscopy Is Safe and Effective in Increasing Microbial Diversity in Active Ulcerative Colitis. **Inflammatory bowel diseases** vol. 23,6, p. 903-911, 2017.

JACOBSON, A.N. et al. The Lipooligosaccharide Biosynthesis of *Bacteroides thetaiotaomicron*. **mBio**, vol. 9,2, 2018. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29535205/>>

JAKOBSSON, H. E et al. The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier. **EMBO reports**, vol. 16,2, p. 164-77, 2015. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25525071/>>

JALANKA, J. et al. Colonic Mucosal Microbiota and Association of Bacterial Taxa with the Expression of Host Antimicrobial Peptides in Pediatric Ulcerative Colitis. **International journal of molecular sciences**, v. 21,17 6044, Aug. 2020.

- JANDHYALA, S. M. et al. Role of the normal gut microbiota. **World journal of gastroenterology**, v. 21,29, p. 8787-803, 2015. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26269668/>>
- JOHANSSON, M.E.V.; HANSSON, G.C. Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. **Nature reviews. Immunology**, v. 16,10, p. 639-49, 2016. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27498766/>>
- JOHNSON, E. L. et al. Microbiome and metabolic disease: revisiting the bacterial phylum Bacteroidetes. **Journal of molecular medicine**, vol. 95,1, p. 1-8, 2017. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27900395/>>
- KANG, S. et al. Dysbiosis of fecal microbiota in Crohn's disease patients as revealed by a custom phylogenetic microarray. **Inflammatory bowel diseases**, v. 16,12, p. 2034-42, 2010. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20848492/>>
- KANG, Y. et al. Goji Berry Modulates Gut Microbiota and Alleviates Colitis in IL-10-Deficient Mice. **Molecular nutrition & food research**, v. 62,22, 2018.
- KATAOKA, K. Intestinal microbiota and its role in human health and disease. **J. Med. Invest**, 2016. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27040049/>>
- KHAN, K.J. et al. Antibiotic therapy in inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. **Am. J. Gastroenterol**, 2011.
- KIM, H. et al. Co-Culture with *Bifidobacterium catenulatum* Improves the Growth, Gut Colonization, and Butyrate Production of *Faecalibacterium prausnitzii*: In Vitro and In Vivo Studies. **Microorganisms**, 2020.
- KIM, S.; JAZWINSKI, S.M. Intestinal Microbiota and Healthy Aging: A Mini-Review. **Gerontology**, 2018. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30025401/>>
- KITAMOTO, S. et al. The Intermucosal Connection between the Mouth and Gut in Commensal Pathobiont-Driven Colitis. **Cell**, v. 182,2, p. 447-462.e14., 2020. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32758418/>>
- KITTANA, H. et al. Commensal *Escherichia coli* Strains Can Promote Intestinal Inflammation via Differential Interleukin-6 Production. **Front Immunol**, 2018.
- KOBAYASHI, T. et al. Ulcerative colitis. Disease Primers. **Nat. Rev. Dis. Primers**, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41572-020-0205-x>>. Acesso em: 29/07/2021
- KOPF, J. C. et al. Role of whole grains versus fruits and vegetables in reducing subclinical inflammation and promoting gastrointestinal health in individuals affected by overweight and obesity: a randomized controlled trial. **Nutrition journal**, v. 17,1 72. 2018. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30060746/>>
- KOSTIC, A.D. et al. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. **Genome research**, v. 22, n. 2, p. 292-298, 2012.

- KOTLOFF, K. L. et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. **Lancet (London, England)**, v. 382,9888, p. 209-22, 2013.
- KOWALSKA-DUPLAGA, K. et al. Differences in the intestinal microbiome of healthy children and patients with newly diagnosed Crohn's disease. **Sci Rep.**, 2019. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31827191/>>
- KOZIK, A.J. et al. Comparison of the fecal, cecal, and mucus microbiome in male and female mice after TNBS-induced colitis. **PLoS One**, 2019.
- KUMP, P. et al. The taxonomic composition of the donor's gut microbiota is an important factor influencing the effectiveness of faecal microbiota transplantation in refractory ulcerative colitis. **Aliment Pharmacol Ther**, 2018.
- KURUKULASURIYA, S. P. et al. Slipped-Strand Mispairing in the Gene Encoding Sialidase NanH3 in *Gardnerella* spp. **Infection and immunity**, v. 89,3 e00583-20, 2021.
- LA ROSA, S.L et al. The human gut Firmicute Roseburia intestinalis is a primary degrader of dietary β -mannans. **Nat Commun**, 2019.
- LAPÉBIE, P. et al. Bacteroidetes use thousands of enzyme combinations to break down glycans. **Nature communications**, v. 10,1 2043. 2019. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31053724/>>
- LARSEN, J. M. The immune response to Prevotella bacteria in chronic inflammatory disease. **Immunology**, v. 151,4, p. 363-374, 2017. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28542929/>>
- LEE, J. Fecal Calprotectin in Inflammatory Bowel Disease. **Korean J Gastroenterol**, v.67(5), p. 233-7, 2016. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27206433/>>
- LEWIS, A. L. et al. Discovery and characterization of de novo sialic acid biosynthesis in the phylum Fusobacterium. **Glycobiology**, v. 26,10, p. 1107-1119, 2016. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27613803/>>
- LI, F. et al. Alterations to the Gut Microbiota and Their Correlation With Inflammatory Factors in Chronic Kidney Disease. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 9 206. 2019.
- LIMA, R.P.E et al.. Avaliação dos níveis séricos de proteína C-reativa em indivíduos com periodontite: um estudo piloto. **Braz J Periodontol**, v. 6, n. 1, p. 13-9, 2016
- LIU, H. et al. *Fusobacterium nucleatum* exacerbates colitis by damaging epithelial barriers and inducing aberrant inflammation. **J. Dig. Dis.**, 2020.
- LIU, L. et al. *Fusobacterium nucleatum* Aggravates the Progression of Colitis by Regulating M1 Macrophage Polarization via AKT2 Pathway. **Frontiers in immunology**, v. 10 1324. 2019.

LOPEZ-SILES, M. et al. Alterations in the Abundance and Co-occurrence of *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* in the Colonic Mucosa of Inflammatory Bowel Disease Subjects. **Front Cell Infect Microbiol.** 2018.

LU, J.; SALZBERG, S. L. Ultrafast and accurate 16S rRNA microbial community analysis using Kraken 2. **Microbiome**, v. 8(1), p. 124, 2020.

LUGLI, G.A. et al. Comparative genomic and phylogenomic analyses of the Bifidobacteriaceae family. **BMC genomics**, vol. 18,1 568. 2017. Disponível em:<
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28764658/>>

MA, H. et al. Fecal microbial dysbiosis in Chinese patients with inflammatory bowel disease. **World journal of gastroenterology**, vol. 24,13, p. 1464-1477, 2018. Disponível em:<
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29632427/>>

MACHIELS, K. et al. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. **Gut**, vol. 63,8, p. 1275-83, 2014.

MAGNE, F. et al. The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Intestinal Dysbiosis in Obese Patients? **Nutrients**, 2020. Disponível em:<
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32438689/>>

MAHARSHAK, N. et al. Altered enteric microbiota ecology in interleukin 10-deficient mice during development and progression of intestinal inflammation. **Gut microbes**, vol. 4,4, p. 316-24, 2013.

MANDAL, R.S.; SAHA, S.; DAS, S. Metagenomic surveys of gut microbiota. **Genomics Proteomics Bioinformatics**. 2015. Disponível em:<
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26184859/>>

MAZZAWI, T., et al. The kinetics of gut microbial community composition in patients with irritable bowel syndrome following fecal microbiota transplantation. **PLoS One**. 2018. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30427836/>>

MEIJER, B. J.; DIELEMAN, L. A. Probiotics in the treatment of human inflammatory bowel diseases. **Journal of clinical gastroenterology**, 45 Suppl, S139–S144, 2011. Disponível em:<<https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e31822103f7>>. Acesso em:29/07/2021.

MIQUEL, S et al. *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health. **Current opinion in microbiology**, vol. 16,3, p. 255-61, 2013. Disponível em:<
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23831042/>>

MIRSEPASI-LAURIDSEN, H.C. et al. *Escherichia coli* Pathobionts associated with inflammatory bowel disease. **Clin. Microbiol. Rev.**, 2019.

MORGAN, X. C et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. **Genome biology**, vol. 13,9 R79. 2012.

MORON, R. et al. The Importance of the Microbiome in Critically Ill Patients: Role of Nutrition. **Nutrients**, v. 11,12 3002. 2019.

- NAKOV, R. et al. Establishment of the first stool bank in an Eastern European country and the first series of successful fecal microbiota transplantations in Bulgaria. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 25,1, p. 390-396, 2021.
- NEURATH, M.F.; LEPPKES, M. Ulcerative Colitis Resolution. **Semin Immunopathol.** 2019. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31278430/>>
- NICHOLSON, J. K. et al. Host-gut microbiota metabolic interactions. **Science**, v. 336,6086, p. 1262-7, 2012.
- NOOR, S. O. et al. Ulcerative colitis and irritable bowel patients exhibit distinct abnormalities of the gut microbiota. **BMC gastroenterology**, vol. 10 134. 2010.
- ÖÇAL, R. et al. A relação proteína C-reativa/albumina é um fator prognóstico e preditivo na surdez súbita?. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 86, p. 180-184, 2020.
- OOI, C. Y. et al. Impact of CFTR modulation with Ivacaftor on Gut Microbiota and Intestinal Inflammation. **Scientific reports**, v. 8,1 17834. Dec. 2018.
- ORDÁS, I.; ECKMANN, L. et al. Ulcerative Colitis. **Lanceta**. 2012 Nov. Doi: 10.1016/S0140-6736(12)60150-0.
- OSAKA, T. et al. Meta-Analysis of Fecal Microbiota and Metabolites in Experimental Colitic Mice during the Inflammatory and Healing Phases. **Nutrients**, v. 9,12 1329. Dec. 2017.
- PILARCZYK-ZUREK, M. et al. The dual role of Escherichia coli in the course of ulcerative colitis. **BMC Gastroenterol.** 2016. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27724868/>>
- PIO, A. Doenças inflamatórias intestinais surgem da interação de quatro fatores fundamentais. **Saúde Plena**, 2014. Disponível em: <<https://www.uai.com.br/app/noticia/saude/2014/05/19/noticias-saude,192402/doencas-inflamatorias-intestinais-surgem-da-interacao-de-quatro-fatore.shtml>>. Acessado em: 16/09/2021
- POLKADE, A.V. et al. Quorum Sensing: An Under-Explored Phenomenon in the Phylum Actinobacteria. **Frontiers in microbiology**. v. 7 131. 10, feb. 2016.
- PORTER, R.J. et al. Ulcerative colitis: Recent advances in the understanding of disease pathogenesis. **F1000Research**, vol. 9, 2020. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32399194/>>
- PREIDIS, G. A.; VERSALOVIC, J. Targeting the human microbiome with antibiotics, probiotics, and prebiotics: Gastroenterology enters the metagenomics Era. **Off J. Aga Institute**, v. 136, p. 2015-2031, 2009.
- PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE. **Valores de referência hematológicos para adultos e crianças**. 2017. Disponível em:<<https://www.pncq.org.br/uploads/2019/VNH2019.pdf>>. Acesso em: 01/10/2021
- QU, F. et al. Plasmid-encoding extended-spectrum β -lactamase CTX-M-55 in a clinical *Shigella sonnei* strain, China. **Future microbiology**, v. 9,10, p. 1143-50, 2014.

QUAGLIARIELLO, A. et al. Effect of Bifidobacterium breve on the Intestinal Microbiota of Coeliac Children on a Gluten Free Diet: A Pilot Study. **Nutrients**, v. 8,10 660. 2016.

RANDIS, T. M.; RATNER, A. J. Gardnerella and Prevotella: Co-conspirators in the Pathogenesis of Bacterial Vaginosis. **The Journal of infectious diseases**, v. 220,7, p. 1085-1088, 2019.

RANGSEEKAEW, P.; PATHOM-AREE, W. Cave Actinobacteria as Producers of Bioactive Metabolites. *Frontiers in microbiology*. v. 10 387. 2019.

REDE SUS-BH. **Manual de exames laboratoriais**. Prefeitura de Belo Horizonte, 2016. Disponível em: <https://prefeitura.pbh.gov.br/sites/default/files/estrutura-de-governo/saude/2018/documentos/Laboratorios/manual_exames_laboratoriais_rede_SUS-BH.pdf>. Acesso em: 13/10/2021.

RIZZATTI, G. et al. Proteobacteria: A Common Factor in Human Diseases. **BioMed research international**. 2017. Disponível em:<<https://doi.org/10.1155/2017/9351507>>. Acesso em: 25/08/2021.

RODRÍGUEZ-PIÑEIRO, A. M.; JOHANSSON, M. E. V. The colonic mucus protection depends on the microbiota. **Gut microbes**, vol. 6,5, p. 326-30, 2015.

ROSENFELD, L. G. Valores de referência para exames laboratoriais de hemograma da população adulta brasileira: Pesquisa Nacional de Saúde. **Rev. bras. epidemiol.** 22 (Suppl 02), 2019. Disponível em:<<https://doi.org/10.1590/1980-549720190003.supl.2>> . Acesso em: 08/10/2021.

RUAN, W. et al. Healthy Human Gastrointestinal Microbiome: Composition and Function After a Decade of Exploration. **Digestive diseases and sciences**, vol. 65,3, p. 695-705, 2020.

RUETER, C.; BIELASZEWSKA, M. Secretion and Delivery of Intestinal Pathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors via Outer Membrane Vesicles. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, 2020. Disponível em:<<https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00091>>. Acesso em: 12/08/2021.

SALDANHA, G.J.V. Utilidade de Calprotectina Fecal na Doença Inflamatória Intestinal em idade pediátrica. Tese (Mestrado em Integrado em Medicina. Universidade de Lisboa). Lisboa, Portugal. (2016).Disponível em: <<https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/26722/1/GoncaloJVSaldanha.pdf>>. Acesso em: 13/10/2021.

SALEM, F. et al. Gut microbiome in chronic rheumatic and inflammatory bowel diseases: Similarities and differences. **United European gastroenterology journal**, v. 7, n. 8, p. 1008-1032, 2019.

SANSCHAGRIN, S.; YERGEAU, E. Next-generation sequencing of 16S ribosomal RNA gene amplicons. **J Vis Exp**. 2014. Disponível em:<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25226019/>>

SANTORU, M.L. et al. Cross sectional evaluation of the gut-microbiome metabolome axis in an Italian cohort of IBD patients. **Sci. Rep.** 2017. Disponível em:<<https://doi.org/10.1038/s41598-017-10034-5>>. Acesso em: 15/08/2021.

SASSONE-CORSI, M. et al. Microcins mediate competition among Enterobacteriaceae in the inflamed gut. **Nature**, v. 540,7632, p. 280-283, 2016.

SATISH KUMAR, C.S.V. et al. Immunomodulatory effects of Bifidobacterium bifidum 231 on trinitrobenzenesulfonic acid-induced ulcerative colitis in rats. **Research in veterinary science**. v. 110, p. 40-46, 2017.

SCHIRMER, M. et al. Dynamics of metatranscription in the gut microbiome of inflammatory bowel disease. **Microbiology of Nature**, v. 3,3, p. 337-346, 2018.

SCHOEPFER, A. M. et al. Fecal calprotectin more accurately reflects endoscopic activity of ulcerative colitis than the Lichtiger Index, C-reactive protein, platelets, hemoglobin, and blood leukocytes. **Inflammatory bowel diseases**, vol. 19,2, p. 332-41, 2013.

SCOTT, K.P. et al. Manipulating the gut microbiota to maintain health and treat disease. **Microb. Ecol. Health Dis.** 2015. Disponível em:<
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25651995/>>

SEGAL, J. P. et al. Ulcerative colitis: an update. **Clinical medicine**, v. 21,2, p. 135-139, 2021. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33762374/>>

SEKIZUKA, T. et al. Characterization of Fusobacterium varium Fv113-g1 isolated from a patient with ulcerative colitis based on complete genome sequence and transcriptome analysis. **PLoS Um.** 2017.

SEM AUTOR. Coloscopie Virtuelle par scanner. Centre de Radiologie Belledonne, 2019. Disponível em:<https://radiologiebelledonne.fr/radiobel_scanner_colo.html>. Acesso em: 16/09/2021

SHEN, Z. et al. Relationship between intestinal microbiota and ulcerative colitis: Mechanisms and clinical application of probiotics and fecal microbiota transplantation. **World journal of gastroenterology**, v. 24,1. 2018.

SHIN, N.; WHON, T. W.; BAE, J. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. **Trends in biotechnology**, v. 33,9, p. 496-503, 2015. Disponível em:<
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26210164/>>

SINGH, S. et al. Anti-inflammatory Bifidobacterium strains prevent dextran sodium sulfate induced colitis and associated gut microbial dysbiosis in mice. **Sci Rep.** 2020. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33122795/>>

SOKOL, H. et al. Fungal microbiota dysbiosis in IBD. **Gut**. v. 66(6), p. 1039-1048, 2017. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26843508/>>

SORBARA, M. T. et al. Functional and Genomic Variation between Human-Derived Isolates of Lachnospiraceae Reveals Inter- and Intra-Species Diversity. **Cell host & microbe**, v. 28,1, p. 134-146, 2020.

STANGE, E.F.; SCHROEDER, B.O. Microbiota and mucosal defense in IBD: an update. **Specialist Rev. Gastroenterol. Hepatol**, v. 13(10), p. 963-976 2019. Disponível em:<
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31603356/>>

STOJANOV, S. et al. The Influence of Probiotics on the Firmicutes/Bacteroidetes Ratio in the Treatment of Obesity and Inflammatory Bowel disease. **Microorganisms**, v. 8,11 1715. Nov. 2020.

STRAUSS, J. et al. Invasive potential of gut mucosa-derived *Fusobacterium nucleatum* positively correlates with IBD status of the host. **Inflammatory bowel diseases**, v. 17,9, p. 1971-8, 2011.

SUN, M. et al. Combined Signature of Fecal Microbiome and Plasma Metabolome in Patients with Ulcerative Colitis. **Med. Sci. Monit.** 2019. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31055592/>>

TAHARA, T. et al. *Fusobacterium* detected in colon biopsy and clinicopathological features of ulcerative colitis in Japan. **Dig. Dis. Sci.** v. 60(1), p. 205-10, Jan 2015. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25102986/>>

TAHARA, T. et al. Potential link between *Fusobacterium* enrichment and DNA methylation accumulation in the inflammatory colonic mucosa in ulcerative colitis. **Oncotarget**. v. 8,37, p. 61917-61926, 2017.

TANG, W. H.; KITAI, T.; HAZEN, S. L. Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease. **Circ Res**. v. 120(7), p.1183-1196, 2017.

TANNOCK, G. W. Molecular assessment of intestinal microflora. **The American journal of clinical nutrition**, v. 73,2, p. 410S-414S, Suppl 2001. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11157350/>>

TERVEER, E. M. et al. How to: Establish and run a stool bank. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, vol. 23,12, p. 924-930, 2017.

TETT, A. et al. The *Prevotella copri* Complex Comprises Four Distinct Clades Underrepresented in Westernized Populations. **Cell host & microbe**, v. 26,5, p. 666-679, 2019.

THORKILDSEN, L. T. et al. Dominant fecal microbiota in newly diagnosed untreated inflammatory bowel disease patients. **Gastroenterology research and practice**, 2013

TURRONI, F. et al. Visão geral da genômica e ecológica do gênero *Bifidobacterium*. **Jornal internacional de microbiologia alimentar**, v. 149, n. 1, pág. 37-44, 2011

UNGARO, R. et al. Ulcerative colitis. **Lancet**, v. 389, p. 1756-1770, 2017. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27914657/>>

VACCA, M. et al. The controversial role of Human Gut Lachnospiraceae. **Microorganisms**. v. 8(4), p. 573, 2020. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32326636/>>

VENTURA, M. et al. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 71,3, p. 495-548, 2007.

VESTBY, L. K. et al. Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. **Antibiotics** (Basel, Switzerland) vol. 9,2 59. Feb. 2020.

VIGSNÆS, L.K. et al. Gram-negative bacteria are responsible for the main differences between the faecal microbiota of patients with ulcerative colitis and healthy controls. **Micróbios Benef.**, 2012.

VLACIL, A. et al. Deficiency of Nucleotide-binding oligomerization domain-containing proteins (NOD) 1 and 2 reduces atherosclerosis. **Basic research in cardiology**, vol. 115,4 47. 2020.

WANG, Wei-Lin et al. Application of metagenomics in the human gut microbiome. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21,3, p. 803-14, 2015.

WANG, Y. et al. Phylogenomics of expanding uncultured environmental Tenericutes provides insights into their pathogenicity and evolutionary relationship with Bacilli. **BMC genomics**, v. 21,1 408. 2020.

WEINGARDEN, A.R.; VAUGHN, B.P. Intestinal microbiota, fecal microbiota transplantation, and inflammatory bowel disease. **Gut microbes**, vol. 8,3, p. 238-252, 2017.

WEISS, G. A.; HENNET, T. Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 74,16, p. 2959-2977, 2017.

WEXLER, AARON G.; GOODMAN, ANDREW L. An insider's perspective: Bacteroides as a window into the microbiome. **Nature microbiology**, v. 2, n. 5, p. 1-11, 2017.

WINTER, S. E et al. The dynamics of gut-associated microbial communities during inflammation. **EMBO reports**, v. 14,4, p. 319-27, 2013. Disponível em:<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23478337/>>

XU, J. et al. 5-Aminosalicylic Acid Alters the Gut Bacterial Microbiota in Patients With Ulcerative Colitis. **Frontiers in microbiology**, v. 9 1274. Jun. 2018. Disponível em:<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29951050/>>

XU, Jihao et al. *Faecalibacterium prausnitzii*-derived microbial anti-inflammatory molecule regulates intestinal integrity in diabetes mellitus mice via modulating tight junction protein expression. **J Diabetes**, v. 12(3), p.224-236, 2020.

XU, L. et al. Systematic review with meta-analysis: breastfeeding and the risk of Crohn's disease and ulcerative colitis. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 46(9), p. 780–789, 2017. Disponível em:<<https://doi.org/10.1111/apt.14291>>. Acesso em: 10/08/2021.

YANG, H. et al. Quyushengxin Formula Causes Differences in Bacterial and Phage Composition in Ulcerative Colitis Patients. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, 2020. Disponível em:<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32454865/>>

YE, B. D.; MCGOVERN, D.P.B. Genetic variation in IBD: progress, clues to pathogenesis and possible clinical utility. **Expert review of clinical immunology**, v. 12,10, p. 1091-107, 2016.

ZAKERSKA-BANASZAK, O. et al. Dysbiosis of gut microbiota in Polish patients with ulcerative colitis: a pilot study. **Scientific reports**, v. 11,1 2166. Jan. 2021.

ZENG, M. Y. et al. Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. **Mucosal immunology**, v. 10,1, p. 18-26, 2017. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27554295/>>

ZHANG, J.; SHI, G. Lymphocyte infiltration and key differentially expressed genes in the ulcerative colitis. **Medicine**, v. 99,35, e21997, 2020. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32871953/>>

ZHANG, Y. et al. Gut microbiota contributes to the distinction between two traditional Chinese medicine syndromes of ulcerative colitis. **World journal of gastroenterology**, v. 25,25, p. 3242-3255, 2019.

ZHOU, Y.; ZHI, F. The lowest level of bacteroides in the gut microbiota is associated with inflammatory bowel disease: a meta-analysis. **BioMed international research**, 2016. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27999802/>>

ZHOU, Y. et al. Alterations in Gut Microbial Communities Across Anatomical Locations in Inflammatory Bowel Diseases. **Frontiers in nutrition**, v. 8 615064. Feb. 2021. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33718417/>>

ZHU, W. et al. Precision editing of the gut microbiota ameliorates colitis. **Nature**, v. 553,7687, p. 208-211, 2018. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29323293/>>

ZUO, G.; XU, Z.; HAO, B. Shigella strains are not clones of Escherichia coli but sister species in the genus Escherichia. **Genomics, proteomics & bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 61-65, 2013.

APÊNDICE

APÊNDICE 1 - QUESTIONÁRIO ESTRUTURADO UTILIZADO NA PESQUISA



CADASTRO INDIVIDUAL TRANSPLANTE DE MICROBIOTA FECAL

RECEPTOR

DATA: __/__/____

Identificação

Em caso de paciente menor de 18 anos, solicitar dados do responsável (Nome completo, grau de parentesco, gênero, data de nascimento, nacionalidade, estado civil, CPF e RG, endereço, e-mail e telefone)

CÓDIGO DO PACIENTE - HUPAA

CÓDIGO DA PESQUISA (iniciais do nome + número cadastro)

NOME COMPLETO: _____

CPF: _____ RG: _____

E-MAIL: _____ TELEFONE: () _____

ENDEREÇO: _____

BAIRRO: _____ MUNICÍPIO: _____

ESTADO: _____

DATA DE NASCIMENTO: __/__/____ IDADE: _____ SEXO: (1) F (2) M

NACIONALIDADE: (1) Brasileiro (2) Naturalizado (3) Estrangeiro

MUNICÍPIO E UF DE NASCIMENTO: _____ (____)

ESTADO CIVIL: _____

NOME DA MÃE: _____

ETNIA: (1) Negro (2) Branco (3) Pardo (4) Índio (5) Amarelo

Antecedentes

TABAGISMO: (1) SIM (2) NÃO

Há quanto tempo? _____ Quantos cigarros por dia? _____ () EX-Tabagista Parou há quantos anos? _____

ETILISMO: (1) SIM (2) NÃO Quanto na semana? _____

COMORBIDADES: (1) SIM (2) NÃO

(1) Diabetes Mellitus (2) Hipertensão Arterial (3) Dislipidemia (4) Câncer

(5) Anemia (6) Depressão (7) Outros

Quais? _____

USO DE MEDICAÇÃO: (1) SIM (2) NÃO

(1) Metformina _____ mg	(4) Hidroclorotiazida _____ mg	(7) Atenolol _____ mg
(2) Glibenclamida _____ mg	(5) Losartana Potássica _____ mg	(8) Propranolol _____ mg
(3) Insulina _____ U	(6) Captopril _____ mg	(9) Sinvastatina _____ mg

(10) Outros

Quais: _____



CIRURGIAS: (1) SIM (2) NÃO

Quais? _____

EM USO DE PREBIÓTICO OU PROBIÓTICO? (1) SIM (2) NÃO

Qual? _____

Doença inflamatória intestinal

DIAGNÓSTICO:

Retocolite Ulcerativa (1) Doença de Crohn (2) Colite Indeterminada (3)

ANO DO DIAGNÓSTICO:

INÍCIO DOS SINTOMAS:

SINTOMAS:

(1) Diarréia (2) Náuseas (3) Constipação (4) Anorexia (5) Plenitude.

EXTENSÃO DA DOENÇA:

(1) Pancolite (2) Colite proximal (3) Colite distal (4) Doença ileal

FASE DA DOENÇA NA DATA DA CONSULTA:

Ativa (1) Remissão (2)

GRAU DE ATIVIDADE DA DOENÇA: Leve (1) Moderado (2) Grave (3)

MANIFESTAÇÕES EXTRAINTestinais: (1) SIM (2) NÃO Quais? _____

(1) Dores articulares (2) Visão turva (3) Manifestações dermatológicas (4) Outras

Quais? _____

MEDICAÇÕES EM USO:

(1) Sulfassalazina Desde: _____ Dose: _____ (5) Prednisona Desde: _____ Dose: _____

(2) Mesalazina Desde: _____ Dose: _____ (6) Infliximab Desde: _____ Dose: _____

(3) Azatioprina Desde: _____ Dose: _____ (7) Adalimumabe Desde: _____ Dose: _____

(4) Loperamida (Imosec) _____ (8) Supositório _____

Fez corticoide no início do biológico? (1) SIM (2) NÃO

Qual? _____

Exames

HEMOGLOBINA / HEMATÓCRITO: _____ / _____

LEUCÓCITOS / SEGMENTADOS / BASTÕES: _____ / _____ / _____

PCR: _____

ALBUMINA: _____



CALPROTECTINA: _____

COLONOSCOPIA: _____

MAYO ENDOSCÓPICO: _____

SES-CD: _____

VIT. D: _____

VIT. B12: _____

FERRITINA: _____

FERRO: _____

ZINCO: _____

Coleta das fezes

DATA DA COLETA DAS FEZES: ____/____/____ LOCAL DA COLETA DAS FEZES: _____

DATA DA ENTREGA DAS FEZES: ____/____/____

DATA DO CONGELAMENTO DAS FEZES: ____/____/____

TOTAL DE HORAS ENTRE COLETA E ENTREGA DAS FEZES _____

RECEBIDO POR: _____

Avaliação Nutricional

PESO: _____ KG ALTURA: _____ CM IMC ATUAL: _____ KG/M² CLASSIFICAÇÃO: _____

Transplante fecal

DATA DO TRANSPLANTE DE MICROBIOTA: ____/____/____

TEMPO DE RETIRADA DO COLONOSCÓPIO: _____ minutos

ANTIBIÓTICO:

INTERCORRÊNCIAS DO PROCEDIMENTOS:

EFEITOS ADVERSOS:

OBSERVAÇÕES:

APÊNDICE 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Eu _____, fui convidado(a) a participar como voluntári(o,a) do estudo “Eficácia Clínica do Transplante da Microbiota Intestinal em Pacientes com DIIs” recebi do Prof. Dr Manoel Álvaro de Freitas Lins Neto, chefe do Serviço de Coloproctologia do HUPAA-UFAL- Universidade Federal de Alagoas, responsável por sua execução, as seguintes informações que me fizeram entender sem dificuldades e sem dúvidas os seguintes aspectos:

- Que o estudo se destina a: avaliar a eficácia do transplante da microbiota intestinal em paciente com doenças inflamatórias intestinais;
- Que a importância deste estudo é a de: auxiliar os médicos, nutricionistas e demais profissionais da área da saúde para que tenham um melhor conhecimento sobre a nossa realidade e assim possam oferecer um atendimento mais adequado e individualizado aos pacientes portadores de doença inflamatória intestinal;
- Que os resultados que se desejam alcançar são os seguintes: melhorar e alterar o prognóstico e tratamento das doenças inflamatórias intestinais, evitar o uso de medicações de alto custo e melhorando ou evitando o tratamento convencional;
- Que a coleta de dados deste estudo começará em Setembro de 2019 e Setembro de 2021;
- Que o estudo será feito da seguinte maneira: para o estudo serão necessários coletar os dados: gênero, idade, altura, peso, dobra cutânea tricípital, circunferência do braço; que não trarão nenhum risco à sua saúde. Também serão coletados exames laboratoriais como: proteína-C-reativa, albumina, hemograma, calprotectina fecal que será pelo exame de fezes. Esses dados coletados não terão nenhum risco ao senhor(a), e não trazem nenhum tipo de dano e essas medidas não causam dor.
- Os exames laboratoriais, serão colhidos durante seu acompanhamento ambulatorial e não serão acrescentados nenhuma coleta extra para o projeto. Os pacientes que não aceitarem participar do projeto ou aqueles que não se adequam aos critérios propostos permanecerão tendo o mesmo acompanhamento.
- O termo de responsabilidade da realização do exame de colonoscopia se encontra em anexo a este documento, com todas as implicações associadas ao procedimento;
- Que eu participarei das seguintes etapas: entrevista inicial, avaliação nutricional, com coleta de dados: altura, peso, dobra cutânea tricípital, circunferência do braço; exames laboratoriais de sangue e a coleta de fezes;
- Que os incômodos que poderei sentir com a minha participação são os seguintes: a punção venosa durante a coleta de sangue e leve pressão na aferição da dobra cutânea tricípital, algum possível constrangimento para entrega das fezes coletadas;
- Que os possíveis riscos à minha saúde física e mental seriam aqueles relacionados às etapas de coleta das fezes, coleta de sangue e colonoscopia;
- Que estão previstos alguns efeitos adversos após o procedimento como: diarreia, dor abdominal, abdômen distendido, gases, constipação, náuseas, vômito, dor de cabeça, febre. Porém esses efeitos resolvem nas primeiras 48 horas após o procedimento. E, se acontecer, devo comunicar a equipe médica;
- Que terei toda assistência da equipe que realizarão as coletas: médicos, enfermeiros, nutricionistas, técnicos de enfermagem, entre outros;
- Que a minha participação será acompanhada com a assistência da equipe multiprofissional do ambulatório de Coloproctologia do HUPAA;
- Que, sempre que desejar, serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo;
- Que eu serei informado sobre o resultado final da pesquisa, assim como resultado dos meus exames realizados;
- Que, a qualquer momento, eu poderei recusar a continuar participando do estudo e, também, que eu poderei retirar meu consentimento, sem que isso me traga qualquer penalidade ou prejuízo;
- Que as informações conseguidas através da minha participação não permitirão a identificação da minha pessoa, exceto aos responsáveis pelo estudo, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto;
- Que o estudo não acarretará nenhuma despesa para o participante da pesquisa; E será garantida a indenização (nexo causal) judicial ou extra-judicial pela equipe de pesquisa se porventura ocorrer algum tipo de dano durante a participação do indivíduo no período da pesquisa.

- Que eu receberei uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- Finalmente, tendo eu compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo e estando consciente dos direitos, das responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a participação implicam, concordo em autorizar a participação e para isso eu DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

Endereço d(o,a) paciente e/ou responsável

Domicílio: (rua, praça, conjunto):
 Bloco: /Nº: /Complemento:
 Bairro: /CEP/Cidade: /Telefone:
 Ponto de referência:

Contato de urgência: Júnia Elisa Carvalho de Meira / Lucas Correia

Domicílio: Residencial Sauaçuhy,
 Bloco: Complemento:
 Bairro: Ipioca /CEP: 57039-740 /Cidade: Maceió /Telefone: (82) 981817755
 Ponto de referência:

Endereço da responsável da pesquisa:

Nome: Júnia Elisa Carvalho de Meira / Lucas Correia
 E-mail: junia.meira@gmail.com / ucas0@hotmail.com (preferência por contato via email)
 Telefone: (82) 981817755 (Junia) / (82) 98809-5957 (Lucas)
 Ponto de referência:

ATENÇÃO: Para informar ocorrências irregulares ou danosas durante a sua participação no estudo, dirija-se ao:

Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas
Prédio da Reitoria, 1º Andar, Campus A. C. Simões, Cidade Universitária
Telefone: 3214-1041, Maceió-AL

Maceió, ___/___/___	
Assinatura ou impressão datiloscópica d(o,a) voluntári(o,a) ou responsável legal e rubricar as demais folhas	Nome e Assinatura do(s) responsável (eis) pelo estudo (Rubricar as demais páginas)

ANEXO

ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALAGOAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estruturação e Implantação do banco de fezes no Hospital Universitário Professor Alberto Antunes para o Transplante de Microbiota Intestinal

Pesquisador: MANOEL ALVARO DE FREITAS LINS NETO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 99615018.2.0000.5013

Instituição Proponente: Universidade Federal de Alagoas

Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.009.245

Apresentação do Projeto:

A proposta deste projeto é oferecer uma nova alternativa de abordagem através do transplante de microbiota intestinal, com a estruturação e implementação do primeiro um banco de fezes naregião do Nordeste. Trata-se de um estudo observacional do tipo coorte prospectivo, longitudinal visando avaliar a os resultados da implantação de um banco de fezes focando material fecal de doadores saudáveis que podem melhorar o prognóstico de diversos pacientes com DII na rede pública de Alagoas e de outros estados nordestinos.

O pesquisador responsável e sua equipe

suspenderão ou encerrarão esta pesquisa imediatamente ao perceber irregularidades que ofereçam riscos ou danos à saúde do doador ou dos profissionais envolvidos.

Objetivo da Pesquisa:

Implementar e estruturar o banco de fezes no Hospital Universitário Prof.

Alberto Antunes da Universidade Federal de Alagoas para realizar transplantes de microbiota intestinal.

Definir protocolos para obtenção, armazenamento e manipulação do material fecal;

Criar cadastro eletrônico de doadores;

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n - Campus A . C. Simões,

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 57.072-900

UF: AL **Município:** MACEIO

Telefone: (82)3214-1041

E-mail: comitedeeticaufal@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALAGOAS



Continuação do Parecer: 3.009.245

Identificar a microbiota intestinal de doadores a partir do material fecal por sequenciamento da região 16S do rDNA (Metagenômica);
Identificar e quantificar o conjunto de metabólitos presentes no material fecal de doadores (Metabolômica);
Avaliar a viabilidade do banco de fezes no contexto da saúde pública durante o período de dois anos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

BENEFÍCIOS:

A estruturação do banco de fezes trata-se de uma inovação tecnológica que vem sendo implementada no mundo inteiro. Temos como objetivo principal implementar a criação de um espaço que possa oferecer uma nova alternativa ao tratamento das doenças do aparelho digestivo e outras especialidades afins.

O fato do método apresentar um resultado imediato satisfatório, com uma significativa melhora dos sintomas, pode também contribuir de forma definitiva nos custos diretos e indiretos ao paciente e também ter uma influência direta no sistema único de saúde, de acordo com a análise de custo-efetivo realizado recentemente na conferência do consenso europeu sobre transplante da microbiota intestinal na prática clínica (Camarota, G.et al.2016)

RISCOS: Riscos ao paciente: como esse projeto inclui apenas o a implantação e estruturação do banco de fezes, onde neste primeiro momento não será realizado o transplante do material fecal, não existirá risco ao paciente eminente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante e trará benefícios a toda a população alagoana e nordestina de uma maneira geral.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos apresentados corretamente.

Recomendações:

As recomendações previstas em parecer do CEP foram respondidas satisfatoriamente. A pesquisa não fará transplante fecal e sim apenas instalação um banco de fezes.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Protocolo Aprovado

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n - Campus A . C. Simões,

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 57.072-900

UF: AL

Município: MACEIO

Telefone: (82)3214-1041

E-mail: comitedeeticaufal@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALAGOAS



Continuação do Parecer: 3.009.245

Prezado (a) Pesquisador (a), lembre-se que, segundo a Res. CNS 466/12 e sua complementar 510/2016:

O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado e deve receber cópia do TCLE, na íntegra, por ele assinado, a não ser em estudo com autorização de declínio;

V.S^a. deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade por este CEP, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata;

O CEP deve ser imediatamente informado de todos os fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É responsabilidade do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas a evento adverso ocorrido e enviar notificação a este CEP e, em casos pertinentes, à ANVISA;

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

Seus relatórios parciais e final devem ser apresentados a este CEP, inicialmente após o prazo determinado no seu cronograma e ao término do estudo. A falta de envio de, pelo menos, o relatório final da pesquisa implicará em não recebimento de um próximo protocolo de pesquisa de vossa autoria.

O cronograma previsto para a pesquisa será executado caso o projeto seja APROVADO pelo Sistema CEP/CONEP, conforme Carta Circular nº. 061/2012/CONEP/CNS/GB/MS (Brasília-DF, 04 de maio de 2012).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1177395.pdf	31/10/2018 09:22:56		Aceito
Cronograma	CronogramaprojetoINHAMMliversao1.pdf	31/10/2018 09:21:48	JUNIA ELISA CARVALHO DE	Aceito

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n - Campus A . C. Simões,

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 57.072-900

UF: AL

Município: MACEIO

Telefone: (82)3214-1041

E-mail: comitedeeticaufal@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALAGOAS



Continuação do Parecer: 3.009.245

Cronograma	CronogramaprojetoINHAMMIversao1.pdf	31/10/2018 09:21:48	MEIRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOInhammi_CEP_versao1.pdf	31/10/2018 09:21:27	JUNIA ELISA CARVALHO DE MEIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLProjetoInhammidoador.pdf	31/10/2018 09:18:49	JUNIA ELISA CARVALHO DE MEIRA	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	declaracaoprojetoinhammi.pdf	26/09/2018 12:46:55	JUNIA ELISA CARVALHO DE MEIRA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	cartafernandamaranhaoassinada.pdf	24/09/2018 11:46:47	JUNIA ELISA CARVALHO DE MEIRA	Aceito
Orçamento	orcamento_detalhado.pdf	11/09/2018 14:36:30	JUNIA ELISA CARVALHO DE MEIRA	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoINHAMMiassinada.pdf	11/09/2018 14:25:47	JUNIA ELISA CARVALHO DE MEIRA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CartaanuenciaLuizCaetanopdf.pdf	11/09/2018 14:14:18	JUNIA ELISA CARVALHO DE MEIRA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CartaAceiteufal.pdf	11/09/2018 14:11:40	JUNIA ELISA CARVALHO DE MEIRA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MACEIO, 08 de Novembro de 2018

**Assinado por:
Luciana Santana
(Coordenador(a))**

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n - Campus A . C. Simões,
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 57.072-900
UF: AL **Município:** MACEIO
Telefone: (82)3214-1041 **E-mail:** comitedeeticaufal@gmail.com