



JÚLIA FIGUEIREDO MACHADO

**DOENÇA DE CROHN: EFEITO DE SUPLEMENTO
ALIMENTAR SOBRE O ESTADO NUTRICIONAL DE
PACIENTES SOB TERAPIA COM ANTI-TNF- α E
AZATIOPRINA**

**CAMPINAS
2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

Júlia Figueiredo Machado

**DOENÇA DE CROHN: EFEITO DE SUPLEMENTO ALIMENTAR
SOBRE O ESTADO NUTRICIONAL DE PACIENTES SOB TERAPIA
COM ANTI-TNF- α E AZATIOPRINA**

Orientadora: Profa. Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela

Tese de Mestrado apresentada à Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, para a obtenção do título de **Mestra em Ciências**, área de concentração em **Saúde da Criança e do Adolescente**.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
TESE DEFENDIDA PELA ALUNA JÚLIA FIGUEIREDO
MACHADO E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. MARIA
MARLUCE DOS SANTOS VILELA

Assinatura da orientadora

Campinas
2013

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

M18d

Machado, Júlia Figueiredo, 1983-
Doença de Crohn : efeito de suplemento alimentar
sobre o estado nutricional de pacientes sob terapia com
anti-TNF- α e azatioprina / Júlia Figueiredo Machado. --
Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador : Maria Marluce dos Santos Vilela.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Doença de Crohn. 2. Suplementos dietéticos. 3.
Estado nutricional. I. Vilela, Maria Marluce dos Santos,
1947-. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Crohn's disease : effect of dietary supplement on nutritional status of patients under anti-TNF- α and azathioprine therapy

Palavras-chave em inglês:

Crohn's disease
Dietary supplements
Nutritional status

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Maria Marluce dos Santos Vilela [Orientador]
Roseli Oselka Saccardo Sarni
Antonio de Azevedo Barros Filho

Data da defesa: 31-07-2013

Programa de Pós-Graduação: Saúde da Criança e do Adolescente

Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado

Aluna Júlia Figueiredo Machado

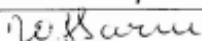
Orientador: Profa. Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela

Membros:

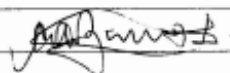
Profa. Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela



Profa. Dra. Roseli Oselka Saccardo Sarni



Prof. Dr. Antonio de Azevedo Barros Filho



Curso de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas.

Data: 31/07/2013

**Ao meu pai Rubens, que me incentivou e contribuiu muito para que
todas as etapas deste trabalho fossem concretizadas com sucesso.**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao apoio financeiro da FAPESP (Processo: 2008/53902-3 e 2011/04750-9) e CAPES.

À minha mãe, pelo incentivo, amor, carinho, compreensão... “Você é essencial para a conquista de cada objetivo meu”.

À minha orientadora, Profa. Marluce, pela oportunidade, confiança e por compartilhar sua sabedoria e experiência.

Ao Dr. Claudio Coy, pela oportunidade de trabalhar com pacientes com Doença de Crohn e pelas orientações essenciais para a conclusão deste trabalho.

Aos professores Dr. Roberto José Negrão e Dr. Antonio de Azevedo Barros, pelas importantes contribuições no exame de qualificação.

Ao CIPED, pelo apoio e por toda estrutura oferecida para a realização do trabalho.

Ao Ambulatório de Doenças Inflamatórias Intestinais do Gastrocentro e a todos os seus profissionais, por me acolher e contribuir com esta pesquisa.

Aos meus pacientes, por colaborarem intensamente com este trabalho.

À enfermeira e amiga Silvana, pelo grande empenho em ajudar, pelo companheirismo, amizade, carinho, risadas... E por estar ao meu lado sempre, mesmo nos momentos mais difíceis.

À Vanessa Oya, pelo companheirismo, carinho, amizade e compreensão.

Às amigas Vanessa Ramalho e Beatriz, por todo companheirismo, amizade, ensinamentos, generosidade e, é claro, pelas boas risadas!

Ao Marcelo, pelos importantes conselhos, amizade e pelos momentos “astrológicos” descontraídos!

À Taís, por me acolher, pelos conselhos, carinho, amizade e compreensão.

À Jéssica, Ana Érica, Jussara, Paulo e Milton, pela amizade e por estarem sempre dispostos a ajudar.

A todos os professores, que de alguma forma contribuíram para a realização da pesquisa.

Aos professores que aceitaram participar da banca avaliadora da minha tese.

Ao meu irmão Daniel e à minha cunhada Ana Eliza pelo apoio e carinho.

Ao meu namorado Betinho, pelo amor, carinho e compreensão.

Aos amigos do CIPED, pelo apoio e contribuição.

Por fim, agradeço a Deus e ao meu anjo da guarda!

*Quando uma criatura humana desperta
para um grande sonho e sobre ele lança
toda a força de sua alma, todo o
uníversono conspira a seu favor!*

Johann von Goethe

Resumo

A Doença de Crohn (DC) é caracterizada por uma inflamação crônica que pode afetar qualquer parte do trato digestivo. Na fase aguda, os sintomas gastrointestinais podem levar à desnutrição. Na remissão da doença, alguns pacientes podem apresentar sobrepeso ou obesidade, o que contribui para aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias pelo tecido adiposo. Com o objetivo de avaliar os efeitos de dois suplementos nutricionais sobre o estado nutricional de pacientes com DC, foi realizado um ensaio clínico, randomizado, duplo-cego, paralelo com dois braços. Os participantes receberam suplemento com proteínas do soro de leite (PSL) ou suplemento com proteínas de soja (PS), durante 16 semanas. A avaliação nutricional foi feita por meio de medidas antropométricas, bioimpedância, recordatório alimentar de 24 horas e dosagens de albumina e pré-albumina. Para a avaliação da atividade da doença foram utilizados o Índice de Atividade da Doença de Crohn (IADC) e a dosagem de proteína C reativa (PCR). Na primeira avaliação (n=68), 93% dos pacientes estavam em remissão da doença (IADC<150), 36% apresentaram sobrepeso ou obesidade e apenas 5% estavam desnutridos. Com relação à ingestão alimentar, mais de 50% dos pacientes tinha um consumo inadequado de cálcio, potássio, e vitaminas A, C e D. Pacientes que estavam sob terapia com anti-TNF- α apresentaram Índice de Massa Corporal (IMC), percentual de gordura corporal (%GC) e prega cutânea tricipital (PCT) maiores do que aqueles sob terapia com, apenas, azatioprina. As 16 semanas de suplementação foram concluídas por 19 pacientes no grupo com PSL e 22 no grupo PS. Os suplementos não tiveram efeitos no IADC e PCR, porém modificaram a composição corporal. Houve aumento da circunferência muscular do braço (CMB), área

muscular do braço corrigida (AMBc) e percentual de massa magra (%MM), e redução da PCT e do %GC, nos dois grupos. O sobrepeso, a obesidade e a ingestão inadequada de micronutrientes foram alterações nutricionais observadas em alguns pacientes com DC deste estudo, e indicam a necessidade de orientações dietéticas para corrigi-las. Os suplementos nutricionais com PSL e PS, após 16 semanas de uso, reduziram a gordura corporal dos pacientes, e poderiam ser utilizados como estratégia para tratar a obesidade. Além disso, a inflamação decorrente do excesso de tecido adiposo poderia ser prevenida, contribuindo para uma melhor evolução clínica.

Abstract

Crohn's Disease (CD) is characterized by a chronic inflammation that affects any part of the gastrointestinal tract. In the acute phase, gastrointestinal symptoms may lead to malnutrition. During disease remission, some patients are overweight or obese; as adipose tissue produces proinflammatory cytokines, its excess may aggravate inflammation. To evaluate the effects of two supplements on nutritional status in CD patients, we performed a prospective, randomized, double-blind, parallel-arm trial. Participants received whey protein (WP) or soy protein (SP) supplement for 16 weeks. Nutritional assessment was performed by anthropometric measurements, bioelectrical impedance, 24-hour dietary recall, serum albumin and pre-albumin. The Crohn's Disease Activity Index (CDAI) and serum C-reactive protein (CRP) were used for the assessment of the disease activity. In the first evaluation (n = 68), 93% of the patients were in clinical remission (CDAI <150), 36% were overweight or obese and only 5% were malnourished. Over 50% of the patients had an inadequate intake of calcium, potassium, and vitamins A, C and D. Patients under treatment with anti-TNF- alpha had body mass index (BMI), body fat percentage (%BF) and tricipital skin fold (TSF) greater than those undergoing azathioprine therapy. Nineteen patients in the WP group and twenty-two in the SP group completed the 16 weeks of supplementation. The supplements had no effect on CDAI and CRP, but contributed to body composition change. The TSF and %BF decreased, whereas mid-arm muscle circumference (MAMC), corrected arm muscle area (CAMA) and body lean percentage (%BL) increased, in the two groups. Some patients in this study presented overweight, obesity or low intake of micronutrients, dietary advice is needed to correct these nutritional

abnormalities. The supplementation with WP and SP may contribute to the reduction of overweight and obesity through reducing body fat and thus contributing to inflammatory control, preventing disease progression.

Lista de Figuras

Capítulo 1

Figure 1. Proportion of CD patients with micronutrient intakes below DRI.....54

Figure 2. Nutritional status of patients with Crohn's disease, according to different nutritional methods. BMI - body mass index; TSF - triceps skin fold; MAMC - mid-arm muscle circumference; CAMA - corrected arm muscle area.....54

Figure 3. Differences within Anti-TNF-alpha and Azathioprine groups (Student t test) for: A – body mass index (BMI), Kg/m²; B - body fat percentage (%BF) and C - triceps skin fold (TSF), mm.....55

Capítulo 2

Figure 1. Flow chart of the randomization of the two groups.....78

Figure 2. Effect of supplemental whey protein (WP) and soy protein (SP) on: a) body fat percentage (%BF); b) body lean percentage (%BL); c) triceps skin fold (TSF); d) mid-arm muscle circumference (MAMC); e) corrected arm muscle area (CAMA). All data are expressed as mean. There were significant differences within groups, $P < 0.05$ (Repeated measures ANOVA).....79

Figure 3. Proportion of CD patients with nutrient intakes below DRI.....80

Lista de Tabelas

Capítulo 1

Table 1. Characteristics of patients with Crohn's disease	52
Table 2. Daily intakes of macronutrients according 24-h food recall	53
Table 3. Differences in nutritional status within Anti-TNF-alpha and Azathioprine group, according sex	53

Capítulo 2

Table 1. Chemical composition of the whey protein (WP) and soy protein (SP) treatment supplements	76
Table 2. Characteristics of patients in the two groups: whey protein (WP) and soy protein (SP)	77

Lista de Abreviaturas e Siglas

AMBc: área muscular do braço corrigida

BF: *body fat*

BL: *body lean*

BMI: *Body Mass Index*

CAMA: *corrected arm muscle area*

CARD9: *caspase recruitment domain 9*

CB: circunferência do braço

CCK: colecistoquinina

CD: *Crohn's Disease*

CDAI: *Crohn's Disease Activity Index*

CMB: circunferência muscular do braço

CU: Colite Ulcerativa

CRP: *C-reactive protein*

DC: Doença de Crohn

DII: Doenças Inflamatórias Intestinais

DRI: *Dietary Reference Intakes*

GC: gordura corporal

HIV: vírus da imunodeficiência humana

IADC: Índice de Atividade da Doença de Crohn

IFN- γ : interferon- γ

IgA: imunoglobulina A

IgE: imunoglobulina E

IgG: imunoglobulina G

IgM: imunoglobulina M

IL-1: interleucina-1

IL-6: interleucina-6

IL-8: interleucina-8

IL-23R: receptor de interleucina-23

IMC: Índice de Massa Corporal

JAK2: *janus kinase 2*

MAC: *mid-arm circumference*

MAMC: *mid-arm muscle circumference*

MM: massa magra

NOD2: *nucleotide-binding oligomerization domain 2*

PCR: proteína C reativa

PCT: prega cutânea tricipital

PS: proteínas da soja

PSL: proteínas do soro de leite

SP: *soy protein*

STAT3: *signal transducer and activator of transcription 3*

TAM: tecido adiposo mesentérico

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa ou *tumor necrosis factor-alpha*

TSF: triceps skin fold

WP: *whey protein*

Sumário

1. Introdução	25
1.1. Doença de Crohn	25
1.2. Nutrição na Doença de Crohn	27
1.3. Suplementos Nutricionais.....	30
1.3.1. Proteínas do Soro de Leite	31
1.3.2. Soja	33
2. Objetivos	35
2.1. Objetivos específicos	35
3. Capítulo 1	37
4. Capítulo 2	57
5. Discussão geral	81
6. Conclusão geral	85
7. Referências Bibliográficas	87
8. ANEXOS	99
ANEXO 1: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	100
ANEXO 2: Análise microbiológica dos suplementos nutricionais	103
ANEXO 3: Trabalho apresentado no V Congresso Brasileiro de Nutrição Integrada e GANEPÃO 2013	105
ANEXO 4: Trabalho aceito pelo 15 th International Congress of Immunology Milan, Italy/2013	106
9. APÊNCICES	107
APÊNDICE 1: Ficha de coleta de dados	108

APÊNDICE 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	111
APÊNDICE 3: Instruções para os participantes da pesquisa	113

1. Introdução

1.1. Doença de Crohn

A Doença de Crohn (DC) e a Colite Ulcerativa (CU) pertencem ao grupo de doenças crônicas, chamado de Doenças Inflamatórias Intestinais (DII). A inflamação na DC ocorre de forma segmentar e transmural, e pode afetar qualquer área do trato gastrointestinal. Os principais sintomas da doença são febre, diarreia, dor abdominal, náuseas e vômitos. Além disso, podem aparecer durante o curso da doença complicações intestinais e extra intestinais, como: obstruções, fístulas, abscessos, anemia, osteoporose, artropatias, pioderma gangrenoso e eritema nodoso (1,2). Existem evidências mostrando que indivíduos com DII apresentam maior risco de desenvolver câncer intestinal (3-6). Acredita-se que a exposição crônica às citocinas inflamatórias e espécies reativas de oxigênio possa ter efeitos carcinogênicos (7).

A incidência da DC é maior em adultos jovens, porém pode afetar indivíduos em qualquer idade. As taxas de incidência anual no norte da América (período de 1990-2000) foi de 7,9 casos por 100.000 e na Europa (período de 2003-2005) foi de 8,6 casos por 100.000 (1). A maioria dos estudos sobre prevalência e incidência das DII foi feito na Europa, existem poucos dados nos países em desenvolvimento. As regiões de maior prevalência são Canadá e Europa, sendo que a Ásia apresenta a menor prevalência. Em 2004, mais de dois milhões de pessoas da Europa e 1,4 milhões de pessoas dos Estados Unidos apresentavam DII (8). Estas doenças são consideradas emergentes, pois suas incidências vêm aumentando em todo o mundo, incluindo regiões, como o Japão (9).

A etiologia da DC não está totalmente elucidada, acredita-se que há uma interação entre fatores ambientais, genéticos e imunológicos (1). Vários fatores ambientais têm sido estudados, como tabagismo, apendicectomia, uso de contraceptivos, dietas, amamentação, infecções e antibióticos (10). O estilo de vida e as influências ambientais têm grande importância na etiologia da doença. Isto é bem demonstrado pelo aumento do risco da doença após a migração para regiões de alta incidência de DII (8).

Muitos grupos de pesquisa avaliaram o genoma humano para a identificação de fatores genéticos associados à doença. A identificação de genes e loci genéticos que contribuem com a susceptibilidade às DII têm melhorado a compreensão das causas da doença. Foram verificados alterações genéticas relacionadas com a desregulação da resposta imune inata à microflora intestinal, aumento da permeabilidade intestinal e alterações na resposta imune adaptativa intestinal (1,11).

Foi descrito que biópsias intestinais de pacientes com DC carregam alelos mutantes no gene *CDH1*, que codifica a proteína E-caderina. Com esta mutação, a E-caderina não cumpre devidamente seu papel na integridade da barreira epitelial, favorecendo a translocação bacteriana (1). Foram observados, também, variantes genéticos de componentes do sistema imune, com efeitos independentes sobre o risco de desenvolver DII. Estes componentes, como *STAT3*, *JAK2*, *CARD9*, *NOD2* e *IL23R*, são importantes na tolerância às bactérias luminais. Evidências experimentais mostram uma resposta imunológica alterada às bactérias luminais de pacientes com polimorfismos no gene *NOD2*. Foram observadas falhas na autofagia de micróbios invasores e indução prejudicada da resposta imune adaptativa de células T (1).

A mucosa intestinal funciona como uma barreira e apresenta receptores capazes de perceber o conteúdo luminal e secretar produtos regulatórios, que irão coordenar uma resposta imune adequada. Na DC ativa, o equilíbrio de células reguladoras e efetoras é perturbado, predominando células T efetoras (T helper1, T helper 2) sobre as células T reguladoras (Th3, Tr). Foram observados que estes pacientes apresentam uma resposta anormal de células T do tipo T-helper 1, com aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interferon-gama (IFN- γ) e IL-12 (interleucina 12) (1,11).

O tratamento da DC baseia-se na manutenção da remissão da doença, período em que os sintomas, inflamação e complicações são controladas. Os corticosteróides e imunomoduladores (azatioprina) são muito utilizados. Recentemente, agentes biológicos foram introduzidos como terapêutica, os quais atuam bloqueando os efeitos de citocinas essenciais na cascata inflamatória, controlando, então, a inflamação. O anti-TNF- α é um anticorpo monoclonal direcionado contra o TNF- α , e tem sido eficiente na indução e manutenção da remissão da doença, melhorando os sintomas e a saúde intestinal de grande parte dos pacientes (12).

1.2. Nutrição na Doença de Crohn

A DC está muito associada com a desnutrição, principalmente na fase ativa da doença. Neste período, os pacientes apresentam diarreia intensa, perdas intestinais de nutrientes, má absorção, dores abdominais, náuseas e vômitos (13). Além disso, o TNF- α está aumentado e tem efeitos catabólicos, induzindo a anorexia e aumentando o gasto

energético basal. A leptina também está aumentada, e sinaliza “falsamente” o hipotálamo um estado de suficiência energética, contribuindo com a anorexia (14). Diante desse quadro, ocorre uma perda significativa de peso corporal.

A magnitude da desnutrição depende de diferentes fatores como: extensão e localização da doença, cirurgias e, principalmente, gravidade da resposta inflamatória sistêmica (13). As deficiências nutricionais podem contribuir com as complicações da DC, aumentando a frequência de internações hospitalares (15).

Com o desenvolvimento de novos medicamentos, como as terapias biológicas, os pacientes com DC permanecem em remissão clínica da doença por períodos mais longos (16). Além disso, estudos estão mostrando que a ingestão de macronutrientes e o Índice de Massa Corporal (IMC) desses doentes estão semelhantes aos de indivíduos saudáveis (17-19). A desnutrição está reduzindo e a obesidade aumentando em pacientes com DC em remissão (20,21).

O impacto da obesidade na DC começou a ser investigado recentemente (22). Sabe-se que a obesidade crônica está associada com uma desregulação do sistema imune, resultando em um estado pró-inflamatório de leve intensidade. Citocinas (IL-6 e TNF- α), adipocinas (leptina, adiponectina e resistina) e neuropeptídeos (substância P) são produzidos pelos adipócitos, macrófagos e linfócitos localizados no tecido adiposo mesentérico (TAM) (23,24). Pacientes com DII, também, apresentam níveis séricos elevados de IL-6 e TNF- α . Estas citocinas estão super expressas no TAM dos pacientes com doença ativa. Assim, obesidade e DII estão associadas com alterações no TAM e

aumento da inflamação, porém uma ligação entre estas duas patologias ainda não foi estabelecida (24).

Mesmo com estas mudanças no estado nutricional dos pacientes com DC, as deficiências de micronutrientes são frequentes (16,25). Estas deficiências são ocasionadas, principalmente, pelas perdas intestinais de nutrientes e má absorção. A diarreia e as fístulas levam às perdas de zinco, cálcio e potássio (16). Por outro lado, na remissão da doença, a ingestão alimentar inadequada parece ser a causa primordial (18).

Restrições dietéticas são comuns entre os pacientes, mesmo após a remissão da doença. Pacientes com DC restringem alimentos como leite, frutas e vegetais, com a finalidade de reduzir os sintomas gastrointestinais. O problema é que estas restrições são mantidas por um longo período, ocasionando deficiências de micronutrientes (13,18, 21). No estudo de Sousa Guerreiro et al. (21), 1/3 dos pacientes em remissão evitava grãos, 1/3 excluía laticínios e 18% restringia vegetais.

A disfunção óssea é uma complicação extra intestinal comum nestes indivíduos. A saúde óssea pode ser afetada pelas citocinas pró-inflamatórias, como as IL-1, IL-6 e TNF- α , que parecem ativar os osteoclastos (26). A vitamina D regula a absorção e homeostase do cálcio, um mineral fundamental na construção e manutenção dos ossos (27). Esta vitamina é obtida, principalmente, pela exposição solar, poucos alimentos contêm este micronutriente (16).

Leite e derivados são fontes de cálcio e muitas vezes são fortificados com vitamina D, porém estes alimentos são evitados pelos pacientes por conterem lactose. Estudos

mostram que 80-86% dos indivíduos com DII apresentam uma ingestão inadequada de cálcio (18,28). Devido ao risco destes doentes apresentarem problemas ósseos, o monitoramento da ingestão e dos níveis séricos de cálcio e vitamina D deve ser feito e suplementos orais podem ser necessários (16). Além desses micronutrientes, já foi observada uma ingestão inadequada de folato, tiamina, beta-caroteno e vitaminas C, B6, A, K e E em indivíduos com DC, independente da atividade da doença (16,18, 28-30).

1.3. Suplementos nutricionais

Suplementos nutricionais específicos podem contribuir com a terapia medicamentosa na indução e manutenção da remissão da DC (31-33). Muitos estudos buscam avaliar os mecanismos destes suplementos na doença. Atuações no estresse oxidativo, na resposta imune e na flora e barreira intestinal são os mais citados (34).

Nos pacientes com DC, os radicais livres liberados na mucosa intestinal têm um papel significativo nas lesões inflamatórias, que se agravam com a redução da glutathione intracelular (um antioxidante) observada nestes indivíduos (35,36). As quantidades deste antioxidante podem ser restauradas por meio da administração dos seus precursores, glutamina e cisteína (34).

A glutamina é o principal substrato energético das células intestinais. Sua administração pode estimular a restauração e integridade intestinal, evitando a translocação intestinal de bactérias e de seus produtos (34). Além disso, o uso da glutamina combinada com a arginina pode reduzir o TNF- α intestinal de pacientes com DC (37).

A flora intestinal apresenta ações imunorreguladoras e participa da fisiopatologia da DC (38). Alterações em sua composição podem estimular o sistema imune, alterar o epitélio e aumentar a permeabilidade intestinal. O uso de pré e pró-bióticos pode ter efeitos benéficos (39). Lindsay et al. (40) verificaram que o uso do fruto oligossacarídeo aumenta as concentrações de bifidobactérias fecal e reduz a atividade da DC. Um estudo com pró-biótico (41) demonstrou que o *Lactobacillus casei* é capaz de prevenir e controlar os efeitos pró-inflamatórios da *Escherichia coli*.

1.3.1. Proteínas do Soro de Leite

Durante a digestão e fermentação gastrointestinal de proteínas, vários peptídeos bioativos e aminoácidos essenciais são liberados. Já foram descritos que estes componentes podem apresentar efeitos anticâncer, antimicrobianos, hipocolesterolêmicos, anti-hipertensivos, antitrombóticos e antiinflamatórios (42).

As proteínas do soro de leite (PSL) são extraídas durante a fabricação de queijos e representam 20% do total de proteínas do leite bovino. Entre os seus componentes estão a β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, glicomacropéptídeos, albumina sérica bovina, lactoferrina e imunoglobulinas (43). Estas proteínas são ricas em aminoácidos essenciais e de cadeia ramificada como: leucina, isoleucina e valina, importantes no crescimento e reparação de tecidos, e cisteína, precursora da glutatona, um importante antioxidante (44).

Em relação às propriedades físico-químicas, sabe-se que as PSL não são coaguladas em condições ácidas e resistem às ações das enzimas do estômago. São rapidamente

digeridas e absorvidas, elevando as concentrações séricas de aminoácidos e estimulando a síntese de novas proteínas (44,45).

As PSL são muito utilizadas como suplemento nutricional por fisiculturistas para ganho na massa muscular. Existe, também, um grande interesse em suas propriedades funcionais. Hoje, elas são reconhecidas como um alimento funcional, que pode apresentar efeitos antimicrobianos e imunológicos (43,44).

As imunoglobulinas, que correspondem a 10–15% das PSL, são constituídas pelas IgG, IgA, IgM, and IgE e possuem funções antioxidantes e imunológicas (46,47). A lactoferrina é, provavelmente, a proteína mais valiosa do soro de leite. Ela pode regular a absorção de ferro no intestino, promover o crescimento de células intestinais, proteger contra infecções e regular a resposta imunológica (43).

A β -lactoglobulina corresponde a aproximadamente 50% do conteúdo protéico do soro. Ela carrega pequenas moléculas hidrofóbicas, como o retinol, podendo atuar na modulação da resposta linfática (43) e reduzindo a absorção intestinal de lipídios (46,47).

A α -lactoalbumina é a segunda proteína mais abundante no soro de leite (15–25%) e vem sendo demonstrado que possui um importante efeito na função de macrófagos e células B e T (48). Ela estimula a proliferação de linfócitos em culturas de sangue humano (49). Além disso, tem alta concentração de triptofano (6%), é rica em lisina, leucina, treonina e cisteína, e pode ligar-se ao cálcio e zinco, favorecendo a absorção dos mesmos (46,47).

Os efeitos no sistema imune das PSL têm sido estudados em várias doenças. Aguilar-Nascimento et al. (50) observaram que fórmulas enterais com PSL podem reduzir a inflamação e aumentar as defesas antioxidante de pacientes idosos com isquemia, por meio

de decréscimos nos níveis de interleucina 6 (IL-6) e aumento dos níveis de glutathione. Outro estudo (51) observou um aumento da glutathione de pacientes infectados pelo HIV. Na DC, foram avaliados os efeitos da glutamina e das PSL na mucosa do intestino, ambas melhoraram a permeabilidade e arquitetura do epitélio intestinal (52).

1.3.2. Soja

A soja é amplamente usada como suplemento alimentar, seu consumo aumentou após a *Food and Drug Administration* aprovar que o consumo de 25g de proteína de soja por dia, junto com uma dieta com baixa quantidade de gorduras saturadas e colesterol pode reduzir o risco de doenças cardiovasculares (53).

Componentes bioativos da soja, como isoflavona, saponinas e lunasina, têm sido estudados por apresentar efeitos benéficos sobre os sintomas da menopausa, risco de osteoporose, doenças cardiovasculares e câncer. A soja pode reduzir o risco de doenças relacionadas à inflamação, como o câncer e diabetes (54-57). A alimentação com isoflavona em camundongos apresentou efeitos protetores no cólon, durante a indução química de tumores (58). A lunasina teve efeitos antioxidantes e antiinflamatórios (redução de TNF- α e IL-6) em macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo de murinos RAW 264.7 (59).

A soja, também, tem mostrado efeitos na composição corporal, dois estudos mostraram que uma dieta rica em proteínas da soja reduz a gordura corporal e preserva a massa magra de indivíduos com sobrepeso (60,61). Na DC, foi encontrado apenas um

estudo, que testou uma dieta enteral rica em proteínas de soja e sem lactose. Esta dieta mostrou efeitos na composição corporal de pacientes em remissão, com aumento de massa magra e de gordura corporal (62).

Com base nas informações citadas acima, consideramos a necessidade de avaliar o papel da proteína da soja e das proteínas do soro de leite bovino como suplementos nutricionais na DC.

2. Objetivos

Verificar mudanças no estado nutricional de pacientes com Doença de Crohn sob terapia com Azatioprina e Anti-TNF- α , durante e após o uso de suplemento com proteínas do soro de leite bovino e com proteínas de soja.

2.1. Objetivos específicos

Verificar o estado nutricional dos pacientes com Doença de Crohn, utilizando os seguintes parâmetros:

- Medidas antropométricas;
- Composição corporal avaliada pela Bioimpedância;
- Níveis séricos de albumina e pré-albumina;
- Ingestão alimentar avaliada pelo Recordatório Alimentar.

Verificar a atividade da doença dos pacientes com Doença de Crohn, por meio do Índice de Atividade da Doença de Crohn (IADC) e dosagem de proteína C reativa (PCR).

Avaliar efeitos dos suplementos sobre os parâmetros nutricionais.

Avaliar efeitos dos suplementos sobre a atividade da doença.

3. Capítulo 1

O capítulo 1 corresponde ao artigo intitulado “Nutritional status of patients with Crohn's Disease in remission, under anti-TNF-alpha and azathioprine therapy”, cujo objetivo foi avaliar o estado nutricional e atividade da doença de pacientes com Doença de Crohn.

Capítulo 1

“Nutritional status of patients with Crohn's disease in remission, under anti-TNF-alpha and azathioprine therapy”

Nutritional Status of Patients with Crohn's Disease in Remission, Under Anti-TNF-alpha and Azathioprine Therapy^{1,2}

Júlia F. Machado³, Cláudio S. R. Coy^{4,6}, Vanessa Oya³, Maria M. S. Vilela^{3,5*}

¹ This research was supported by FAPESP (grant 2008/53902-3 and 2011/04750-9) and CAPES.

² Authors disclosures: J.F. Machado, C.S. Coy, V. Oya and M.M.S. Vilela have no conflicts of interest.

³ Center for Investigation in Pediatrics, Pediatrics Department, Faculty of Medical Sciences University of Campinas, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil.

⁴ Gastrocentro - Coloproctology Unit, Surgery Department, Faculty of Medical Sciences University of Campinas, UNICAMP, Campinas, Sao Paulo, Brazil.

⁵ Current address: Department of Pediatrics, Center for Investigation in Pediatrics, Faculty of Medical Sciences University of Campinas, UNICAMP. Rua Tessalia Vieira de Camargo, 126, CEP 13083-970, Campinas – São Paulo, Brazil.

⁶ Current address: Coloproctology Unit, Surgery Department, Gastrocentro, Faculty of Medical Sciences University of Campinas, UNICAMP. Rua Carlos Chagas, 420, CEP 13083-878, Campinas – Sao Paulo, Brazil.

*To Whom Correspondence should be addressed, e-mail: marluce@fcm.unicamp.br.

ABSTRACT

Crohn's disease (CD) is generally associated with weight loss, but today evidences are showing an increasing number of patients with overweight and obesity. The aim of this study was to assess the nutritional status in patients with CD on anti-TNF-alpha infusions and azathioprine.

Methods: Sixty-eight consecutive patients with CD treated by anti-TNF-alpha with or without azathioprine (AZA) and by only azathioprine were studied. This cross-sectional study evaluated the disease activity by Crohn's Disease Activity Index (CDAI) and serum C-reactive protein (CRP), the nutritional status and body composition by bioimpedance analysis, anthropometry, albumin and pre-albumin dosages. Dietary intake was determined by 24-h dietary recalls. χ^2 method or Fisher exact test and Student t test with 5% of significance were used.

Results: There were 63 (93%) patients in clinic remission (CDAI<150) and those that used only azathioprine (AZA group) had a lower level of CRP. According to the body mass index (BMI), 27% were overweight, 9% obese and 5% malnourished. More than 50% of the patients had an inadequate intake of calcium, potassium, vitamin A, C and D. The proportion of lipids intake was above the Acceptable Macronutrient Distribution Range. Furthermore, the BMI, body fat percent and triceps skin fold means were significantly higher in patients under anti-TNF-alpha with or without azathioprine (anti-TNF-alpha group) than in the AZA group.

Conclusion: Interventions should be taken to correct these nutritional abnormalities.

INTRODUCTION

The etiology of Crohn's disease (CD) is unknown, but genetic susceptibility, altered immune response and environmental factors are involved. The disease course is marked by periods of activity alternating with periods of remission and it is associated with intestinal obstruction, fistulas and abscesses. Pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), IL-6 and IL-8 are increased in CD patients (1).

The TNF-alpha is a catabolic pro-inflammatory cytokine that induces anorexia and increases basal energy expenditure. The anti-TNF-alpha therapy in CD patients is effective in the induction and maintenance of the clinical remission and has reduced the need for surgery and hospitalizations (2,3). The improvement of the disease symptoms and reduction of the catabolic effects from TNF-alpha may have impact on the nutritional status of CD patients.

Obesity and overweight are major public health problems affecting the population with inflammatory bowel disease. CD was associated with weight loss, but today evidences are showing an increasing of Body Mass Index (BMI) and weight (4-6). The weight excess was associated with more severe disease course (7,8).

The nutritional issues involving macronutrients are vanishing with the introduction of new therapies such as biological. During remission of the disease, the energy and macronutrient needs are fulfilled, thus reducing undernutrition. However, the deficiency of micronutrients intake is commonly found in CD patients, even those in remission (9). In the active period of the disease dietary restriction with low consumes of milk, fruit and vegetable are indicated to relieve the gastrointestinal symptoms. However, many patients

keep these restrictions, even during the remission of the disease, because fear of relapse symptoms (4,10).

Our study aimed to evaluate the nutritional status, dietetic intake and disease activity in patients with CD under anti-TNF-alpha and azathioprine (AZA) therapy.

MATERIALS AND METHODS

Trial design. This is a cross-sectional study with 68 patients recruited from Gastrocentro Inflammatory Bowel Disease (IBD) outpatient clinic. The protocol of the study was approved by Ethics Committee of the University of Campinas (CAAE: 10990146000-11). Written informed consent was taken from all the patients.

Patients. The CD patients under azathioprine or anti-tumor necrosis factor-alpha (anti-TNF-alpha) or azathioprine and anti-TNF-alpha were recruited from February to December 2012. Smoker's patients and those who were using other medication were excluded.

Methods. The body composition was measured using bioimpedance analysis. Whole body resistance and reactance were measured using a tetrapolar bioelectrical impedance analyzer (BIODYNAMICS, Model 310e). This analyzer provides data about fat free mass (kilogram), percent body fat and fat mass (kilogram).

Nutritional status was additionally assessed using anthropometric parameters. Body weight was measured by a medical decimal scale to an accuracy of 0.01 kg. Body height was measured to the nearest millimeter using a stadiometer. Body mass index (BMI) was

calculated from weight and height (kilograms per meter squared). Mid-arm circumference (MAC) and triceps skin fold (TSF) were obtained using the tape measure and Lange skin fold caliper. Mid-arm muscle circumference (MAMC) and corrected arm muscle area (CAMA) were calculated from MAC and TSF. All measurements were obtained by the same observer according to the National Health and Nutrition Examination Survey (11) and results were compared with reference values provided by Frisancho AR (12).

For the evaluation of disease's activity, the Crohn's Disease Activity Index - CDAI (13) was used. Blood samples were drawn to determine biochemical parameters, such as serum albumin, pre-albumin and C-reactive protein. The dietary intake was assessed by 24-h recalls. Food portion sizes were estimated by the patients with the help of photos presented to them. Macronutrients and micronutrients were calculated with the help of software for nutrient evaluation (Dietpro 5.i). The Dietary Reference Intakes - DRIs (14-18) were used to evaluate the adequacy of the nutrient intake by each person.

The patients were separated in two groups, one in use of anti-TNF-alpha with or without AZA (anti-TNF-alpha group) and the other in use of only AZA (AZA group).

Statistics. Statistical analyses were performed using SPSS 16.0 software package. Data are expressed as the mean and standard deviation. Data were tested for normality using the Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk tests. The square root was used to normalize the CDAI data before the analysis. Comparison of categorical data between the groups was performed using the χ^2 method or Fisher exact test. Comparison of continuous data between the groups was performed using the Student t test. A level of 5% significance was established.

RESULTS

Table 1 shows the clinical and demographic data of 68 CD patients, of which 28 were using anti-TNF-alpha and nine were taking anti-TNF-alpha plus AZA. The AZA group (n=31) presented C-reactive protein (CRP) mean less than the anti-TNF-alpha group. The majority of patients (93%) were in clinic remission. CDAI >150 was observed in five patients, from them four were in the anti-TNF-alpha group.

Only two patients had serum albumin less than 3.4 g/dl, both used anti-TNF-alpha alone. Eight patients had pre-albumin less than 20 mg/dl, seven were under only anti-TNF-alpha therapy and one used AZA alone.

CRP values greater than 0.5 ml/dl were found in 27 patients (40%), of which 19 were in the anti-TNF-alpha group.

The information about macronutrient intake are summarize in **Table 2**. Most patients had a percentage of carbohydrate, protein and lipids relative to total energy in accordance to DRIs (18). However, 22% of patients consumed a proportion of carbohydrates below of Acceptable Macronutrient Distribution Range (18), while 20% ingested lipids above the recommendation.

Figure 1 shows the percentage of patients with micronutrients intake below of the recommendations. More than 50% of patients had an inadequate intake of calcium, potassium, vitamin A, C and D.

The nutritional assessment showed that 27% of the patients were overweight, 9% were obese and just 5% were malnourished, in according with the classification of the World Health Organization (WHO) for body mass index (BMI).

The mid-arm muscle circumference (MAMC) in 43% and corrected arm muscle area (CAMA) in 53% of patients were indicative of malnourished. On the other hand, triceps skin fold (TSF) showed that 65% were considered overweight or obese (**Figure 2**).

Figure 3 shows the comparison of anti-TNF-alpha and AZA group. The mean of BMI, body fat percent and TSF were significantly higher in the anti-TNF-alpha than AZA group. According to the classification of Frisancho AR (12) to TSF, 55% of patients were overweight or obese in the AZA group and 73% were overweight or obese in the anti-TNF-alpha group.

Table 3 shows the comparison of anti-TNF-alpha and AZA group according sex. Only the BMI mean of men was significantly higher in the anti-TNF-alpha than AZA group ($p=0.019$).

DISCUSSION

The nutritional evaluation showed a significant number of overweight (27%) and obese (9%) in CD patients. Furthermore, the TSF was elevated in the majority of the patients, but MAMC and CAMA were reduced in 43% and 53% of the patients, respectively. These results suggest that the excess of body weight in CD patients is caused by increased body fat. These results confirm Steed et al. (19) that observed 34% overweight and 18% obesity in 295 CD patients.

The excess of weight and body fat in CD patients is associated with a higher incidence of perianal disease, more disease relapse than non-obese patients (7,8).

Furthermore, the obesity is a state of chronic inflammation, mediated by increase of cytokines and adipokines, which may contribute to progression of Crohn's disease (20-22).

In our study, most patients had CDAI <150 (93%) and 60% of the patients had CRP values less than 0.5 ml/dl. Authors demonstrated associations of CRP and CDAI with endoscopic and histologic inflammation (23,24), so both parameters can be used in clinical practice to assess the activity of CD. The CRP appears more sensitive in detecting of low disease activity. We agree with Chamouard et al. (24), who suggested that CRP could be included in the CDAI.

Few patients had low albumin (1%) and pre-albumin (5%), another study (25) found a similar result: 6.7% of CD patients in remission (n=75) had low albumin. We conclude that the remission of the disease contributes to improvement of the nutritional status measured by albumin and pre-albumin.

When comparing the groups, we saw that the anti-TNF-alpha group presented upper mean to BMI, BF percent and TSF. The comparison of these groups according sex shows that only the BMI mean of men was significantly higher in the anti-TNF-alpha than AZA group ($p=0.019$). This suggests that the distribution of men and women in the groups influenced the results. However, we must emphasize that BMI was higher in patients with anti-TNF-alpha. The neutralization of TNF-alpha by biological agent reduces the catabolic effects of this cytokine; this may have contributed to the increase of BMI.

The current studies note that anti-TNF-alpha treatment may contribute with an increase of body fat in CD patients, mainly in total abdominal fat volume (26), an induction of the clinical remission and a gained weight were also demonstrated (27). The reduction of

TNF-alpha and the control of the disease symptoms are possible explanations of the weight gain in these patients.

Some patients had a lipid intake above of the Acceptable Macronutrient Distribution Range (18) and this could contribute to weight gain. Simultaneously, the consuming of many micronutrients was below of the recommendation (14-17), indicating an unbalance in the nourishment of CD patients. Restrictions of foods in the active disease to minimize symptoms of abdominal pain and diarrhea are common among CD patients and contribute with an inadequate alimentary intake (9). Additionally, patients in remission tend to continue excluding some foods reported to aggravate the gastrointestinal symptoms such as grains, dairy, vegetable (4), fruit, meat, peanuts, cereals, yeast, eggs, tea, coffee, and chocolate (28). The consequence of this dietary restriction is a low intake of vitamins and minerals, which require diet counseling all the time to prevent micronutrients deficiencies.

CONCLUSION

This study showed that the nutritional status of CD patients under anti-TNF-alpha with or without AZA and AZA alone is characterized by: excess of weight and body fat, excess of lipids intake and lack of micronutrients intake. The anti-TNF-alpha group presented more weight and body fat than the AZA group.

Interventions to correct these nutritional abnormalities are necessary and the influence of anti-TNF-alpha on nutritional status of patients with Crohn's disease should be investigated.

REFERENCES

1. Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *Lancet*. 2012 Jan 19;381(9862):204.
2. Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF, et al. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet*. 2002 May 4;359(9317):1541-9.
3. Feagan BG, Panaccione R, Sandborn WJ, et al. Effects of adalimumab therapy on incidence of hospitalization and surgery in Crohn's disease: results from the CHARM study. *Gastroenterology*. 2008; 135: 1493–9.
4. Sousa Guerreiro C, Cravo M, Costa AR, Miranda A, Tavares L, Moura-Santos P, et al. A Comprehensive Approach to Evaluate Nutritional Status in Crohn's Patients in the Era of Biologic Therapy: A Case-Control Study. *Am J Gastroenterol*. 2007 Nov;102(11):2551-6.
5. Kugathasan S, Nebel J, Skelton JA, et al. Body mass index in children with newly diagnosed inflammatory bowel disease: observations from two multicenter North American inception cohorts. *J Pediatr* 2007; 151:523–527.
6. Long MD, Crandall WV, Leibowitz IH, Duffy L, del Rosario F, Kim SC, et al. Prevalence and epidemiology of overweight and obesity in children with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2011 Oct;17(10):2162-8.
7. Blain A, Cattan S, Beaugerie L, Carbonnel F, Gendre JP, Cosnes J. Crohn's disease clinical course and severity in obese patients. *Clin Nutr* 2002;21(1):51–57.

8. Hass DJ, Brensinger CM, Lewis JD, Lichtenstein GR. The impact of increased body mass index on the clinical course of Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006 Apr;4(4):482-8.
9. Hwang C, Ross V, Mahadevan U. Micronutrient deficiencies in inflammatory bowel disease: From A to zinc. *Inflammatory bowel diseases*. 2012 Oct;18(10):1961-81.
10. Filippi J, Al-Jaouni R, Wiroth JB, Hébuterne X, Schneider SM. Nutritional deficiencies in patients with Crohn's disease in remission. *Inflamm Bowel Dis*. 2006 Mar;12(3):185-91.
11. National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). Anthropometry Procedures Manual. Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta:(CDCP); 2009.
12. Frisancho AR. New norms of upper limb fat and muscle areas for assessment of nutritional status. *Am J Clin Nutr*. 1981;34:2540-5.
13. Best WR, Bectel JM, Singleton JW, Kern Jr F. Development of a Crohn's disease activity index. *Gastroenterology* 1976;70(3):439e44.
14. Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride. Washington, DC: National Academy Press; 1997.
15. Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, Other B Vitamins, and Choline and Subcommittee on Upper Reference Levels of Nutrients, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate,

- Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. Washington, DC: National Academy Press; 2000.
16. Monsen ER. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. *J Am Diet Assoc.* 2000; 100: 637-40.
 17. Trumbo P, Yates AA, Schlicker S, Poos M. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc. *J Am Diet Assoc.* 2001;101: 294-301.
 18. Trumbo P, Schlicker S, Yates AA, Poos M; Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine, The National Academies. Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids. *J Am Diet Assoc.* 2002;102:1621-30.
 19. Steed H, Walsh S, Reynolds N. A brief report of the epidemiology of obesity in the inflammatory bowel disease population of Tayside, Scotland. *Obes Facts.* 2009;2:370-2.
 20. Karagiannides I, Pothoulakis C. Substance P, obesity, and gut inflammation. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2009 Feb;16(1):47-52.
 21. Bertin B, Desreumaux P, Dubuquoy L. Obesity, visceral fat and Crohn's disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2010 Sep;13(5):574-80.
 22. Siegmund B. Mesenteric fat in Crohn's disease: the hot spot of inflammation? *Gut* 2012;61:3–5.
 23. Solem CA, Loftus EV Jr, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. Correlation of C-reactive protein with clinical, endoscopic, histologic, and

- radiographic activity in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2005; 11: 707-12.
24. Chamouard P, Richert Z, Meyer N, Rahmi G, Baumann R. Diagnostic value of C-reactive protein for predicting activity level of Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2006; 4: 882-7.
 25. Bin CM, Flores C, Alvares-da-Silva MR, Francesconi CF. Comparison between handgrip strength, subjective global assessment, anthropometry, and biochemical markers in assessing nutritional status of patients with Crohn's disease in clinical remission. *Dig Dis Sci.* 2010 Jan;55(1):137-44.
 26. Parmentier-Decrucq E, Duhamel A, Ernst O, Fermont C, Louvet A, Vernier-Massouille G, Cortot A, Colombel J, Desreumaux P, Peyrin-Biroulet L. Effects of infliximab therapy on abdominal fat and metabolic profile in patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2009 Oct;15(10):1476-84.
 27. Vadan R, Gheorghe LS, Constantinescu A, Gheorghe C. The prevalence of malnutrition and the evolution of nutritional status in patients with moderate to severe forms of Crohn's disease treated with Infliximab. *Clin Nutr.* 2011 Feb;30(1):86-91.
 28. Zallot C, Quilliot D, Chevaux JB, Peyrin-Biroulet C, Guéant-Rodriguez RM, Freling E, et al. Dietary beliefs and behavior among inflammatory bowel disease patients. *Inflamm Bowel Dis.* 2013 Jan;19(1):66-72.

TABLE 1 Characteristics of patients with Crohn's disease

	Total (n=68)	Anti-TNF-alpha¹ (n=37)	Azathioprine² (n=31)	p Value³
Age, years - mean (SD)	39.4 (11.5)	39.1 (12.1)	39.7 (10.7)	0.83
Male, n (%)	39 (57.4)	15 (40.5)	24 (77.4)	0.002*
Duration of CD⁴, years - mean (SD)	10.7 (6.9)	10.7 (6.8)	10.4 (6.7)	0.72
Resection⁵, n (%)	39 (57.4)	20 (54.1)	19 (61.3)	0.55
Disease site				
Colon/rectum/anal canal, n (%)	20 (29.4)	12 (32.4)	8 (25.8)	0.02*
SB ⁶ , n (%)	28 (41.2)	19 (51.4)	9 (29.0)	
Colon/rectum/anal canal + SB ⁶ , n (%)	20 (29.4)	6 (16.2)	14 (45.2)	
CDAI⁷, mean (SD)	66.7 (60.8)	75.4 (67.4)	58.7 (51.5)	0.69
Albumin, g/dl - mean (SD)	4.33 (0.56)	4.24 (0.65)	4.47 (0.42)	0.79
Pre-albumin, mg/dl - mean (SD)	29.69 (9.34)	26.9 (9.42)	32.95 (8.26)	0.007*
C reactive protein, mg/dl - mean (SD)	0.69 (0.97)	0.89 (1.20)	0.47 (0.55)	0.035*

¹ Group was using anti-TNF-alpha with or without azathioprine. Anti-TNF-alpha with azathioprine, n=9 (13.2%).

² Group was using only azathioprine.

³ p value calculated by the Student t test for continuous data and χ^2 test for categorical data, to compare anti-TNF-alpha and azathioprine group.

⁴ CD, Crohn's disease; ⁵ number of patients underwent bowel resection; ⁶ SB, small bowel;

⁷ CDAI, Crohn's Disease Activity Index. * p<0.05, significant.

TABLE 2 Daily intakes of macronutrients according 24-h food recall

		Values (g)	Distribution	Intake below	Intake above
		Mean $\pm$ SD	Range	normal*	normal*
			Mean $\pm$ SD	n (%)	n (%)
Macronutrients	Proteins	93.7 $\pm$ 55.2	19.3 $\pm$ 6.7	2 (2.9)	2 (2.9)
	Carbohydrates	231.6 $\pm$ 82.9	49.1 $\pm$ 8.3	22 (32.4)	2 (2.9)
	Lipids	69.3 $\pm$ 31.7	32.0 $\pm$ 7.0	2 (2.9)	20 (29.4)

*Acceptable Macronutrient Distribution Range (18) for proteins: 10-35%, carbohydrates: 45-65%, lipids: 20-35%

TABLE 3 Differences in nutritional status within Anti-TNF-alpha and Azathioprine group, according sex

	Anti-TNF-alpha ¹	Azathioprine ²	p Value ³
Male	n=15	n=24	
Body mass index, kg/m ² - mean (SD)	26.12 (4.6)	23.11 (3.0)	0.019*
Triceps skin fold, mm - mean (SD)	17.75 (6.1)	14.72 (5.3)	0.107
Body fat percentage, % - mean (SD)	23.24 (6.3)	20.21 (6.1)	0.142
Female	n=22	n=7	
Body mass index, kg/m ² - mean (SD)	24.22 (4.4)	22.45 (3.5)	0.344
Triceps skin fold, mm - mean (SD)	27.16 (7.2)	23.38 (9.1)	0.263
Body fat percentage, % - mean (SD)	32.31 (4.6)	30.53 (5.9)	0.408

¹ Group was using anti-TNF-alpha with or without azathioprine.

² Group was using only azathioprine.

³ p value calculated by the Student t test.

* p<0.05, significant.

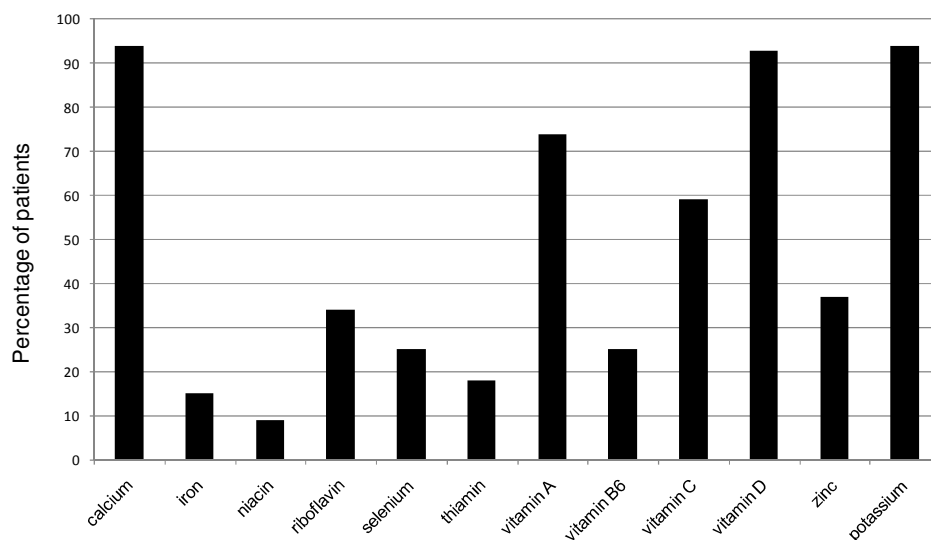


FIGURE 1 Proportion of CD patients with micronutrient intakes below DRIs (14-17).

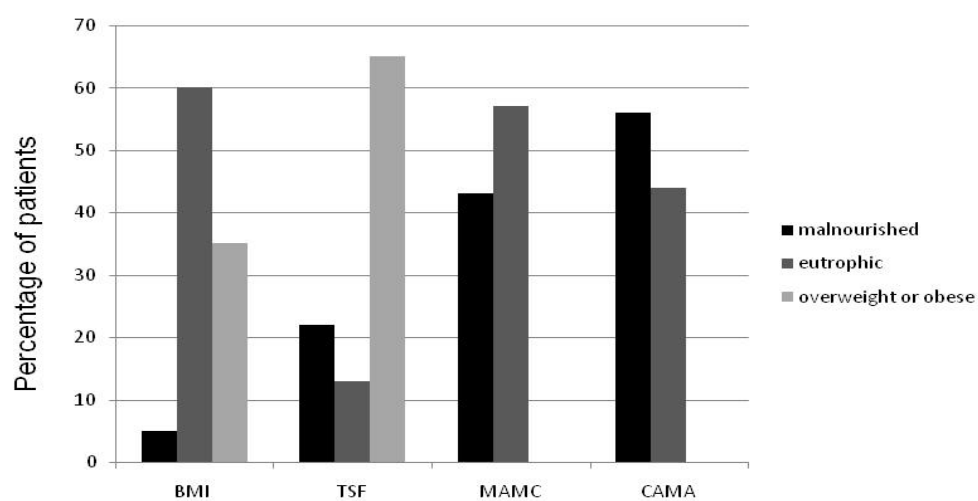


FIGURE 2 Nutritional status of patients with Crohn's disease, according to different nutritional methods. BMI - body mass index; TSF - triceps skin fold; MAMC - mid-arm muscle circumference; CAMA - corrected arm muscle area.

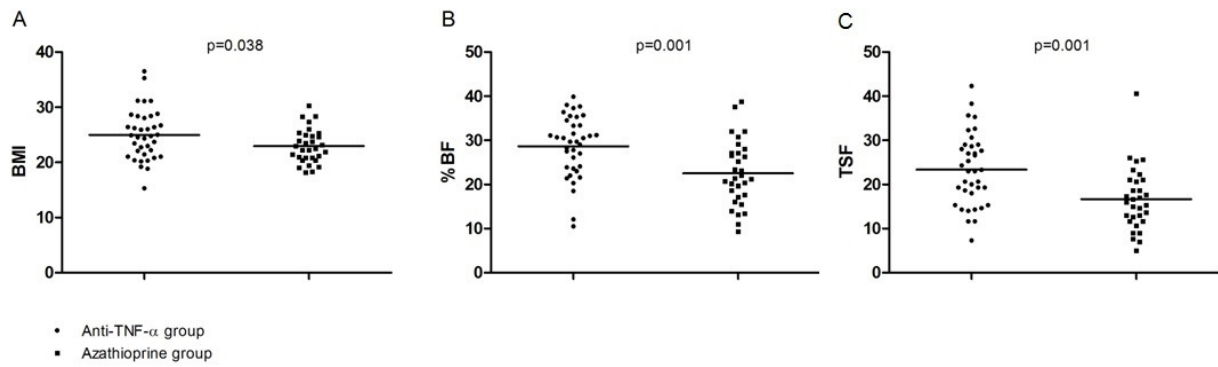


FIGURE 3 Differences within Anti-TNF-alpha and Azathioprine group (Student t test) for: A – Body mass index (BMI), Kg/m²; B - body fat percentage (%BF) and C - triceps skin fold (TSF), mm.

4. Capítulo 2

O capítulo 2 corresponde ao artigo intitulado “Whey and Soy Protein Supplements Change Body Composition in Patients with Crohn’s Disease under Azathioprine and Anti-TNF-alpha Therapy”, cujo objetivo foi avaliar os efeitos dos suplementos nutricionais constituídos de proteínas do soro de leite bovino ou proteínas de soja na composição corporal e atividade da doença de pacientes com Doença de Crohn. O periódico escolhido para a submissão deste artigo foi: *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*.

Capítulo 2

**“Whey and Soy Protein Supplements Change Body
Composition in Patients with Crohn’s Disease under
Azathioprine and Anti-TNF-alpha Therapy”**

Whey and Soy Protein Supplements Change Body Composition in Patients with Crohn's Disease under Azathioprine and Anti-TNF-alpha Therapy

J. F. Machado¹, V. Oya¹, Cláudio S. R. Coy², A. M. Morcillo¹, S. D. Severino¹, C. Wu³, M. M. S. Vilela^{1*}

¹ Center for Investigation in Pediatrics, Pediatrics Department, Faculty of Medical Sciences University of Campinas, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil.

² Gastrocentro - Coloproctology Unit, Surgery Department, Faculty of Medical Sciences University of Campinas, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil.

³ Hilmar Cheese Company, Hilmar, CA, USA.

*Correspondence to: Dra. M. M. Vilela, Center for Investigation in Pediatrics, Pediatrics Department, Faculty of Medical Sciences University of Campinas, Rua Tessalia Vieira de Camargo, 126, CEP 13083-970, Campinas – São Paulo, Brazil. E-mail: marluce@fcm.unicamp.br.

SUMMARY

Background: Crohn's disease (CD) is a chronic transmural inflammation of the gastrointestinal tract of unknown cause. Undernutrition associated with active CD has reduced, however obesity have increased. A production of proinflammatory cytokines from adipose tissue contributes to a chronic inflammatory state.

Aim: This study is a double-blind, randomized clinical trial conducted at the University of Campinas to evaluate the effects of two nutritional supplements on body composition and disease activity of CD patients.

Methods: The patients were split into two groups: one group was supplemented with whey protein and the other, with soy protein. Participants consumed the supplements twice daily and were assessed at three moments: before starting the intervention and after 8 and 16 weeks. The nutritional status and body composition were measured using bioimpedance analysis, anthropometry and albumin and pre-albumin dosages. Dietary intake was determined by 24-h dietary recalls. The disease activity was evaluated by Crohn's Disease Activity Index and serum C-reactive protein dosage. **Results:** Forty-one patients concluded the study; 29% were overweight or obese. There were no significant differences between the groups in all measured parameters before and during the study. Both supplements changed body composition similarly during the study. Triceps skin fold thickness ($p < 0.001$) and body fat percentage ($p = 0.001$) decreased, whereas mid-arm muscle circumference ($p = 0.004$), corrected arm muscle area ($p = 0.005$) and body lean percentage ($p = 0.001$) increased. **Conclusions:** These different sources of protein changed body composition. The reduction of body fat could contribute to inflammatory control in CD patients while preventing progression of the disease.

INTRODUCTION

Crohn's disease (CD) is a chronic inflammatory disease of the gastrointestinal tract. Complications such as obstruction, fistulas and abscesses can appear during the course of the disease.¹ An international expert group developed a definition of early Crohn's (Paris definition) for use in future disease modification trials. The identification of patients with early Crohn's enables an early intervention, which may prevent the arising of complications and improve gastrointestinal functioning, changing the natural history of the disease.²

Undernutrition associated with active Crohn's disease has been reduced after the development of new therapies and early interventions.³ Nowadays, a greater proportion of patients are in clinical remission although overweight and obesity have also occurred.^{3, 4} It has been demonstrated that a production of proinflammatory cytokines from adipose tissue such as tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), interleukin six (IL-6) and adipokines are elevated in obesity, contributing to a chronic inflammatory state.⁵ This inflammatory state may have detrimental effects in CD, creating a favorable environment for gut inflammation and progression of disease.⁶ Obese patients with CD have a higher incidence of anoperineal complications and shorter time to first surgery than the non-obese.^{7, 8}

Dietary strategies such as those with high-protein have been proposed to reduce body weight and fat. Soy protein (SP) reduces body fat in obese rats and whey protein (WP) in obese humans has the same effect.⁹⁻¹¹ Intake of protein has been shown to favorably influence satiety, thermogenesis and body composition but the mechanisms which affect body composition are yet unknown.¹²

Studies are seeking to improve the inflammation and clinical outcomes of CD patients through nutritional therapies.¹³⁻¹⁵ WP is a dietary protein supplement composed of alpha-lactalbumin, beta-lactoglobulin, lactoferrin and cysteine, which have antioxidant effects and may reduce the production of inflammatory cytokines.^{16, 17} Whey protein concentrate supplementation stimulated glutathione synthesis and, possibly, decreased the occurrence of associated co-infections in HIV infected children.¹⁸ Reduction in IL-6 and an increase in glutathione were observed in patients with ischemic stroke under enteral diet containing WP.¹⁹ Beneficial effects on the immune system and body composition of nutritional supplements may improve the quality of life of patients with CD.

The objective of this study was to evaluate the effect of Whey Protein (WP) and Soy Protein (SP) nutritional supplements on body composition and disease activity in CD patients.

MATERIALS AND METHODS

Trial design. This was a randomized, double-blind, parallel-arm, 16-week study, conducted in line with CONSORT recommendations and registered in the Brazilian Clinical Trials Registry. Patients with Crohn's Disease were recruited from February to October 2012 in the Inflammatory Bowel Disease outpatient clinic at the University Medical School of Campinas, SP - Brazil. The sample size was based on the results of our previous open-label²⁰ and calculated to determine a 15% change in body fat percentage ($P=0.05$) with 80% power among each group comparison.

Patients. The trial included CD patients treated with azathioprine or anti-tumor necrosis factor-alpha (anti-TNF-alpha) or azathioprine and anti-TNF-alpha and excluded smokers and those who were using other medication or nutritional supplements.

Trial protocol. The protocol of the study was approved by the Ethics Committee of the University of Campinas (CAAE: 10990146000-11). Written informed consent was taken from all the patients after they read an information sheet explaining the purpose, benefits and risks of the trial. Those who fulfilled the inclusion criteria were randomized for the trial.

A random number sequence, generated by Microsoft Office Excel 12.0 (Office 2007), was used to designate the treatment assignment. We used blocks of size 2 at random to create the allocation sequence. Patients were randomized 1:1 for each group: one supplemented with a concentrate of whey protein (WP) donated by Hilmar Cheese and the other, with an isolate soy protein (SP) from Probiótica (compositions specified in **Table 1**). Randomization and allocation was conducted by the “blinded” researcher.

WP and SP were provided as identical sachets with 15g and 12g of supplement, respectively. Sachets were packed in bags with a code for each supplement, A or B. Both patients and researchers were unaware of the treatment assignment. Patients were advised to consume two sachets per day (amounting to 22.4g of protein) mixed with food or a cold beverage immediately after opening the sachet, for 16 weeks. All patients remained on an unrestricted diet and did not receive nutritional advice.

Compliance was checked every two weeks by phone and also by counting the number of packets not consumed.

Prior to the start of the intervention and after 8 and 16 weeks, patients were assessed by the “blinded” researcher.

Follow-up Assessment. The body composition in the three evaluations was measured at the same period of the day, using bioimpedance analysis. Whole-body resistance and reactance were measured using a tetrapolar bioelectrical impedance analyzer in accordance with the manufacturer’s guidelines (BIODYNAMICS, Model 310e). This analyzer provides data on lean mass and fat mass. Nutritional status was additionally assessed using anthropometric parameters. Body weight was measured by a medical decimal scale to an accuracy of 0.01 kg. Body height was measured to the nearest millimeter using a stadiometer. Body mass index (BMI) was calculated from weight and height (kilograms per meter squared) and classified according to the World Health Organization.²¹ Mid-arm circumference (MAC) and triceps skin fold thickness (TSF) were obtained using the tape measure and Lange skin fold caliper. Mid-arm muscle circumference (MAMC) and corrected arm muscle area (CAMA) were calculated from MAC and TSF. All measurements were obtained by the same observer according to the National Health and Nutrition Examination Survey²² and results were compared with reference values provided by Frisancho AR.²³

For the evaluation of disease activity, the Crohn’s Disease Activity Index – CDAI²⁴ was used. Blood samples were drawn to determine biochemical parameters, serum albumin, pre-albumin and C-reactive protein (CRP), measured by routine methods in use at the University of Campinas Medical School.

The dietary intake was assessed by 24-h recalls, before of the intervention and after 8 and 16 weeks. Food portion sizes were estimated by the patients with the help of photos

shown to them. Macronutrients and micronutrients were calculated with the help of software for nutrient evaluation (Dietpro 5.i). Tables of the Dietary Reference Intakes - DRIs²⁵⁻²⁹ were used to evaluate the adequacy of the nutrient intake.

Statistics. Statistical analyses were performed using SPSS 16.0 software package. Data are expressed as the mean and standard deviation. Data were tested for normality using the Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk tests. The following transformations were used before the analysis: Log (weight), $\sqrt{\text{TSF}}$, Log (CAMA), Log (CRP), Blom (CDAI). The correlations between the biochemical and clinical measurements were calculated employing a bivariate correlation with a non-parametric distribution (Spearman's rho). Comparison of categorical data between the groups was performed using the χ^2 method or Fisher exact test. Comparison of continuous data between the groups was performed using the Student t test for the normal data or Mann-Whitney test for the non-normal data. One-Way Repeated ANOVA was used for comparison of continuous data between the different times in which the patients were evaluated. For non-normal data the Friedman test was used. A level of 5% significance was established.

RESULTS

Patient cohort. Twenty-seven patients did not complete the study (10 men and 17 women). Of these patients, 51.9% were under anti-TNF-alpha therapy, 33.3% were under azathioprine therapy and the remainder used both drugs. Concerning BMI, 51.9% were eutrophic, 33.3% overweight, 7.4% obese and 7.4% malnourished. Only one patient had a

CDAI greater than 150 (166), and BMI of 36.5 kg / m². Various reasons contribute for these patients leave the study: diarrhea, nausea, supplement taste, forgetfulness and allergy.

Forty-one patients (19 to WP, 22 to SP) completed the 16-week supplementation period and were used for subsequent analyses. The flowchart of the randomized trial is shown in **Figure 1**. Clinical data and demographics of the groups were considered homogeneous for comparisons (**Table 2**).

Biochemical and clinical outcomes. There was no difference in statistical analysis either in the between-groups or in the within-groups to albumin, pre-albumin, CRP and CDAI. In the first evaluation, 90.2% of patients (n=37) were in remission (CDAI<150) and in the following evaluations, 95% (n=39) were in remission. For the whole group, a significant positive correlation between the CDAI and CRP ($r = 0.36$, $P = 0.019$) was noted. Furthermore, CDAI and CRP were negatively correlated with albumin ($r = -0.39$, $P = 0.012$; $r = -0.54$, $P < 0.001$) and pre-albumin ($r = -0.31$, $P = 0.046$; $r = -0.65$, $P < 0.001$).

Nutritional outcome. The nutritional status assessed by BMI was similar between the groups. At the beginning of the study, 19.5% of patients were overweight and 9.8% obese with maintenance of this nutrition status during the study period. However, one patient was malnourished but became eutrophic during the study.

Both supplements changed body composition, but there were no differences between the groups. Body fat percentage (**Figure 2A**) and TSF (**Figure 2C**) decreased, whereas body lean percentage (**Figure 2B**), MAMC (**Figure 2D**) and CMA (**Figure 2E**) increased.

Dietary Intake. For the whole group, the daily energy of the first dietary recall was 1962.8 ± 646.0 kcal/day and the percentage of carbohydrate, protein and lipids relative to total energy were, respectively: $49.1 \pm 8.4\%$; $18.3 \pm 5.1\%$; $32.6 \pm 7.6\%$, which were in accordance with the DRIs. These results no changed during the trial. However, there was a significant reduction in the proportion of lipids within the WP group. Before the intervention $34.4 \pm 8.6\%$ of total energy was lipids, and 16 weeks after, this proportion went down to $30.6 \pm 6.4\%$. Fiber intake did not differ between WP group (12.0 ± 4.7 g/day) and SP group (16.5 ± 12.5 g/day), and did not match the DRIs.

Intake of micronutrients did not change during the study and was not different between groups. We observed some deficiencies of the micronutrient intake in comparison with the DRIs. **Figure 3** shows the proportion of patients whose nutrient intake was below the recommendation, in the first evaluation.

DISCUSSION

The results of this double blind study demonstrated that nutritional supplementation with WP or SP in patients with CD changed body composition, but had no effects on the disease activity. Several studies have evaluated the efficacy of enteral formulations to control the disease activity in CD patients, inducing remission.^{13, 14} In our study, most patients were in remission and the CDAI remained unchanged during the study. We observed a weak but significant correlation of CRP with CDAI. Other authors demonstrated an association of CRP with clinical activity, endoscopic and histologic inflammation.^{30, 31} Therefore, both parameters can be used in clinical practice to assess the activity of Crohn's disease.

Recent research has shown an increased number of overweight and obese IBD patients.³ Steed et al.⁴ observed 18% obese and 38% overweight in 489 patients with IBD. We found 19.5% overweight and 9.8% obese in CD patients. Obesity and CD were associated with development of mesenteric fat, which produces proinflammatory adipokines.³² The excess of these adipokines in CD patients with obesity may have adverse effects during the course of the disease.⁷

Filippi et al.³³ reported that CD patients in remission had daily energy and macronutrient intake similar to healthy control groups, although micronutrient deficiencies were frequent. Our analysis of the food consumed revealed that the energy and macronutrient intakes were adequate, but many patients had inadequate consumption of fiber, calcium, potassium and vitamins A, C and D. This has also been observed in others studies.^{33, 34} The reason is that many of these patients have lactose intolerance and avoid the consumption of milk and other dairy products. Furthermore, diets that exclude vegetables and fruit are often recommended to improve gastrointestinal symptoms in patients with active disease and the majority of patients continue with this diet even after remission.^{33, 35} Oral supplements of calcium and vitamin D are often required, due to the risk of bone disease.³⁵ Diet counseling is important and has been effective in the repairing of nutrient deficiencies.³⁶

In the medical literature, we did not find evaluations of the effects of WP or SP on body composition of CD patients. On the other hand, for patients who are overweight or obese, the supplementation of different kinds of proteins is the object of many studies. These authors suggested that an ingestion of a high-protein diet influences body fat, protein

synthesis, thermogenesis and satiety. These effects, however, depend on the amino acids present in each type of protein.¹²

The supplementation of obese subjects with a mixture of WP for 12 weeks led to higher reductions of body fat than the control group who had consumed glucose.¹⁰ Baer et al.³ compared the supplementation of obese individuals with WP, SP and carbohydrates. At the end of the study the WP group had less body fat than the carbohydrate group. However, the SP group did not differ from the carbohydrate group. Our study did not show differences in the body composition between the WP and SP groups. However, the two protein sources produced the same effects in body composition after 16 weeks of supplementation, a reduction in body fat and an increase in lean mass.

The strength of this clinical trial is in the fact that the nutritional intervention was a double-blind with randomization of the CD patients, who had homogeneous clinical and demographic characteristics and same drug therapy. The absence of a placebo group, and using the bioelectrical impedance method which is not the gold standard for evaluating body composition, leads to limitations in the study. However, no placebo was found with similar organoleptic characteristics of a supplement and the use of the anthropometric method supports the results of the bioimpedance.

In conclusion, this study shows that Whey and Soy proteins change the body composition of patients with Crohn's disease. The majority of patients in this study were in remission and the number of overweight and obese patients was significant. However, many patients also had a low intake of micronutrients. It is clear that dietary advice is needed to correct these nutritional abnormalities. The supplementation with Whey and Soy proteins may contribute to reducing overweight and obesity through reducing body fat and

could contribute to inflammatory control in CD patients. These effects of the Whey and Soy proteins have not been reported before in patients with Crohn's disease.

ACKNOWLEDGEMENTS

Declaration of personal interests: None.

Declaration of funding interests: This study was funded by the São Paulo Research Foundation (FAPESP: grant 2008/53902-3 and 2011/04750-9) and CAPES. No other support, writing assistance, data analysis support was provided.

AUTHORSHIP STATEMENT

Guarantor of the article: MMSV.

Author contributions: Study design and interpretation of data: JFM+CSRC+AMM+MMSV; Collection of data: JFM+VO+SDS; Provided essential material (Whey Protein): CW; Analysis of data: JFM+AMM+MMSV; Drafting the manuscript: JFM and MMSV. All authors approved the final version of the manuscript.

REFERENCES

1. Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *Lancet* 2012; **380**: 1590-605.
2. Peyrin-Biroulet L, Billioud V, D'Haens G, *et al.* Development of the Paris definition of early Crohn's disease for disease-modification trials: results of an international expert opinion process. *Am J Gastroenterol* 2012; **107**: 1770-6.
3. Guerreiro CS, Cravo M, Costa AR, *et al.* A comprehensive approach to evaluate nutritional status in Crohn's patients in the era of biologic therapy: a case-control study. *Am J Gastroenterol* 2007; **102**: 2551-6.
4. Steed H, Walsh S, Reynolds N. A brief report of the epidemiology of obesity in the inflammatory bowel disease population of Tayside, Scotland. *Obes Facts* 2009; **2**: 370-2.
5. Boutros M, Maron D. Inflammatory bowel disease in the obese patient. *Clin Colon Rectal Surg* 2011; 24(4):244-52.
6. Karagiannides I, Pothoulakis C. Obesity, innate immunity and gut inflammation. *Curr Opin Gastroenterol* 2007; **23**: 661-6.
7. Blain A, Cattan S, Beaugerie L, Carbonnel F, Gendre JP, Cosnes J. Crohn's disease clinical course and severity in obese patients. *Clin Nutr* 2002; **21**: 51-7.
8. Hass DJ, Brensinger CM, Lewis JD, Lichtenstein GR. The impact of increased body mass index on the clinical course of Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; **4**: 482-8.

9. Aoyama T, Fukui K, Takamatsu K, Hashimoto Y, Yamamoto T. Soy protein isolate and its hydrolysate reduce body fat of dietary obese rats and genetically obese mice (yellow KK). *Nutrition* 2000; **16**: 349–354.
10. Frestedt JL, Zenk JL, Kuskowski MA, Ward LS, Bastian ED. A whey-protein supplement increases fat loss and spares lean muscle in obese subjects: a randomized human clinical study. *Nutr Metab (Lond)* 2008; **5**:8.
11. Baer DJ, Stote KS, Paul DR, Harris GK, Rumpler WV, Clevidence BA. Whey protein but not soy protein supplementation alters body weight and composition in free-living overweight and obese adults. *J Nutr* 2011; **141**: 1489-94.
12. Gilbert JA, Bendsen NT, Tremblay A, Astrup A. Effect of proteins from different sources on body composition. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2011; **21**(Suppl. 2): B16-31.
13. Beattie RM, Schiffrin EJ, Donnet-Hughes A, *et al.* Polymeric nutrition as the primary therapy in children with small bowel Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1994; **8**: 609-15
14. Fell JM, Paintin M, Arnaud-Battandier F, *et al.* Mucosal healing and a fall in mucosal pro-inflammatory cytokine mRNA induced by a specific oral polymeric diet in paediatric Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; **14**: 281-9.
15. Gerasimidis K, Talwar D, Duncan A, *et al.* Impact of Exclusive Enteral Nutrition on Body Composition and Circulating Micronutrients in Plasma and Erythrocytes of Children with Active Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis* 2012; **18**: 1672-81.
16. Middleton N, Jelen P, Bell G. Whole blood and mononuclear cell glutathione response to dietary whey protein supplementation in sedentary and trained male human subjects. *Int J Food Sci Nutr* 2004; **55**: 131-41.

17. Yamaguchi M, Yoshida K, Uchida M. Novel functions of bovine milk-derived alpha-lactalbumin: anti-nociceptive and anti-inflammatory activity caused by inhibiting cyclooxygenase-2 and phospholipase A2. *Biol Pharm Bull* 2009; **32**: 366-71.
18. Moreno YF, Sgarbieri VC, Da Silva MN, Toro AA, Vilela MM. Features of Whey Protein Concentrate Supplementation in Children with Rapidly Progressive HIV Infection. *Journal of Tropical Pediatrics* 2006; **52**: 34-8.
19. de Aguilar-Nascimento JE, Prado Silveira BR, Dock-Nascimento DB. Early enteral nutrition with whey protein or casein in elderly patients with acute ischemic stroke: a double-blind randomized trial. *Nutrition* 2011; **27**: 440-4.
20. Davanço T, Oya V, Coy CSR, *et al.* Nutritional supplementation assessment with whey proteins and TGF- β in patients with Crohn's disease. *Nutr Hosp* 2012; **27**: 1286-92.
21. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Geneva: World Health Organization; 2000 (WHO Technical Report Series No. 894).
22. National Center for Health Statistics. Introduction to NHANES <http://www.cdc.gov/nchs/about/majornhanes/intro_mec.htm> (2007).
23. Frisancho AR. New norms of upper limb fat and muscle areas for assessment of nutritional status. *Am J Clin Nutr* 1981; **34**: 2540-5.
24. Best WR, Beckett JM, Singleton JW, Kern F Jr. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 1976; **70**: 439-44.
25. Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Calcium,

- Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride. Washington, DC: National Academy Press; 1997.
26. Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, Other B Vitamins, and Choline and Subcommittee on Upper Reference Levels of Nutrients, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. Washington, DC: National Academy Press; 2000.
 27. Monsen ER. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. *J Am Diet Assoc* 2000; **100**: 637-40.
 28. Trumbo P, Yates AA, Schlicker S, Poos M. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc. *J Am Diet Assoc* 2001; **101**: 294-301.
 29. Trumbo P, Schlicker S, Yates AA, Poos M; Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine, The National Academies. Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids. *J Am Diet Assoc* 2002; **102**: 1621-30.
 30. Solem CA, Loftus EV Jr, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. Correlation of C-reactive protein with clinical, endoscopic, histologic, and radiographic activity in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005; **11**: 707-12.
 31. Chamouard P, Richert Z, Meyer N, Rahmi G, Baumann R. Diagnostic value of C-reactive protein for predicting activity level of Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; **4**: 882-7.

32. Bertin B, Desreumaux P, Dubuquoy L. Obesity, visceral fat and Crohn's disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010; **13**: 574-80.
33. Filippi J, Al-Jaouni R, Wiroth JB, Hebuterne X, Schneider SM. Nutritional deficiencies in patients with Crohn's disease in remission. *Inflamm Bowel Dis* 2006; **12**: 185-91.
34. Vagianos K, Bector S, McConnell J, et al. Nutrition assessment of patients with inflammatory bowel disease. *J Parenter Enteral Nutr* 2007; **31**: 311-319.
35. Hwang C, Ross V, Mahadevan U. Micronutrient deficiencies in inflammatory bowel disease: from A to zinc. *Inflamm Bowel Dis* 2012; **18**: 1961-81.
36. Zallot C, Quilliot D, Chevaux JB, et al. Dietary beliefs and behavior among inflammatory bowel disease patients. *Inflamm Bowel Dis* 2013; **19**: 66-72.

Table 1

Chemical composition of the whey protein (WP) and soy protein (SP) treatment supplements ¹

	WP	SP
	g/100g	
Protein	73.5	90.0
Moisture	6.3	6.0
Total fat	13.9	0.5
Total carbohydrate	6.6	1.0
Alanine	5.0	3.9
Arginine	3.3	7.3
Cystine	2.3	1.3
Phenylalanine	3.5	5.1
Glycine	2.1	3.9
Histidine	1.9	2.2
Isoleucine	5.8	4.2
Leucine	10.3	7.6
Lysine	8.6	5.9
Methionine	3.1	1.2
Proline	5.9	5.5
Serine	5.5	5.0
Tyrosine	3.2	3.5
Threonine	6.3	3.4
Tryptophan	1.1	1.5
Valine	5.3	4.6
Aspartic acid	10.9	11.2
Glutamic acid	16.9	20.5
Isoflavone	0.0	0.2

¹ Chemical compositions were determined by Institute of Food Technology, São Paulo, Brazil and Department of Food and Nutrition, Faculty of Food Engineering, State University of Campinas, São Paulo, Brazil.

Table 2

Characteristics of patients in the two groups: whey protein (WP) and soy protein (SP).

Characteristics	Initial groups			The groups that completed the study		
	WP (n=34)	SP (n=34)	p Value ¹	WP (n=19)	SP (n=22)	p Value ¹
Mean (SD) age, years	39.1 (12)	39.8 (11.2)	0.81	40.8 (12.4)	39.6 (9.4)	0.74
Male, n (%)	23 (67.3)	16 (47.0)	0.09	15 (78.9)	14 (63.6)	0.28
Mean (SD) duration of CD² years	11 (7.1)	11.5 (6.6)	0.76	9.3 (6.2)	11.1 (7.2)	0.40
Mean (SD) CDAI³	68.5 (62.7)	64.7 (59.6)	0.8	86.4 (73.6)	62.9 (65.8)	0.07
Resection, n (%)	21 (61.8)	18 (52.9)	0.46	9 (47.4)	12 (54.5)	0.65
Disease site						
Colon/rectum/anal canal, n (%)	12 (35.3)	8 (23.5)		9 (47.4)	5 (22.7)	
SB ⁴ , n (%)	11 (32.4)	17 (50.0)	0.32	5 (26.3)	10 (45.5)	0.23
Colon/rectum/anal canal + SB ⁴ , n (%)	11 (32.4)	9 (26.5)		5 (26.3)	7 (31.8)	
Medication						
Azathioprine, n (%)	18 (52.9)	13 (38.2)		11 (57.9)	11 (50)	
Anti-TNF-alpha, n (%)	12 (35.3)	16 (47.1)	0.48	6 (31.6)	8 (36.4)	0.88
Azathioprine + Anti-TNF-alpha, n (%)	4 (11.8)	5 (14.7)		2 (10.5)	3 (13.6)	

¹ p Values calculated by the Student t test for continuous data and χ^2 test or Fisher exact test for categorical data.

² CD, Crohn's disease; ³ CDAI, Crohn's Disease Activity Index; ⁴ SB, small bowel

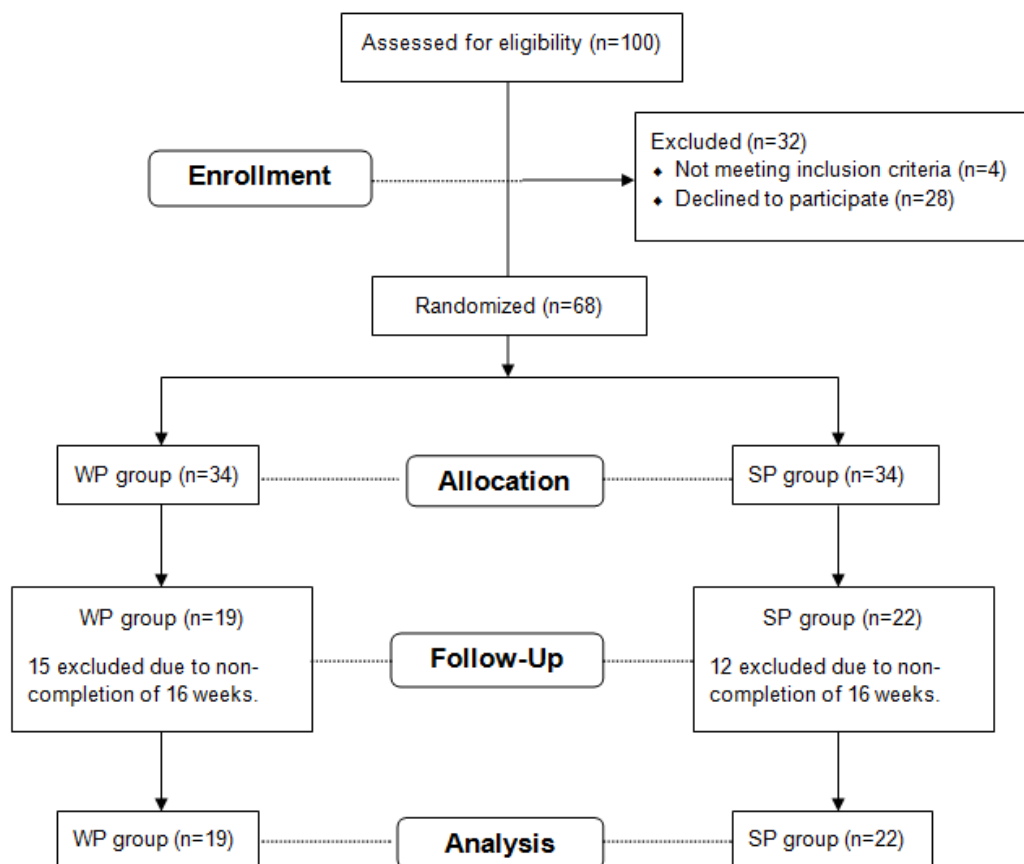


FIGURE 1 Flow chart of the randomization of the two groups.

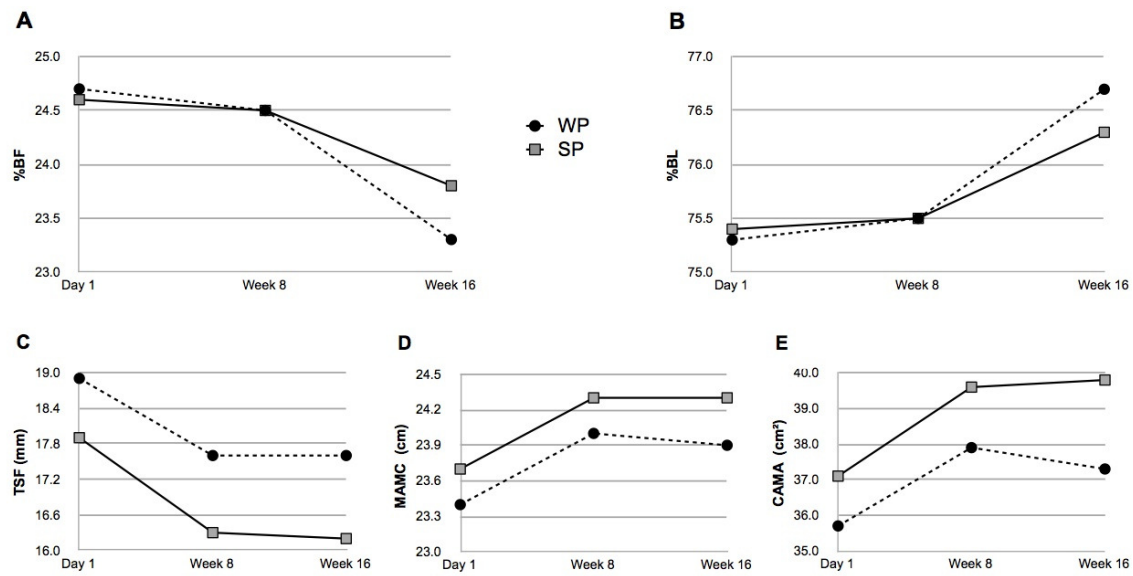


FIGURE 2 Effect of supplemental whey protein (WP) and soy protein (SP) on: a) body fat percentage (%BF); b) body lean percentage (%BL); c) triceps skin fold (TSF); d) mid-arm muscle circumference (MAMC); e) corrected arm muscle area (CAMA). All data are expressed as mean. There were significant differences within groups, $P < 0.05$ (Repeated measures ANOVA).

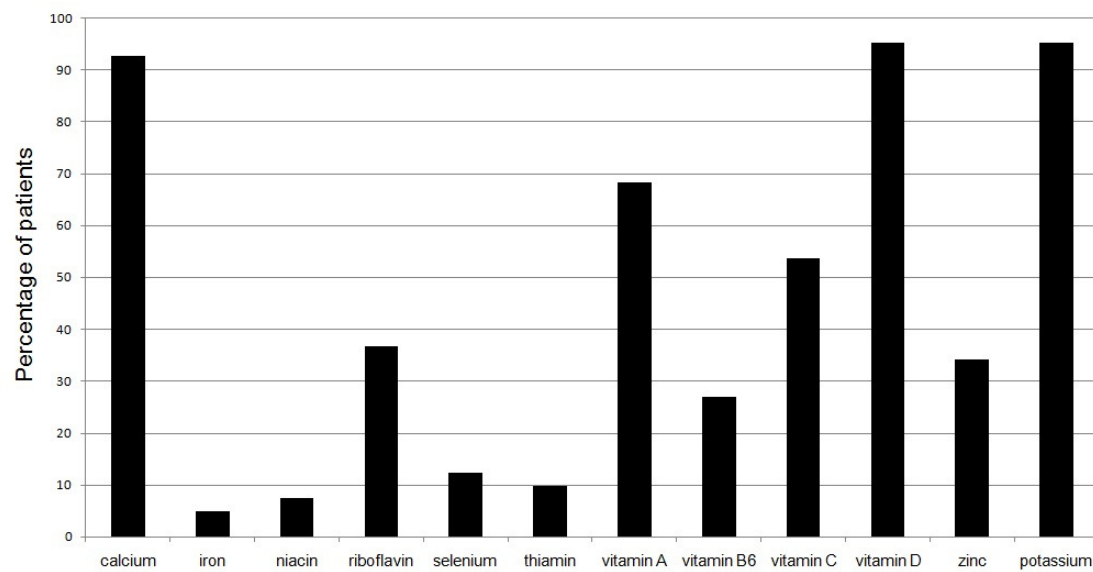


FIGURE 3 Proportion of CD patients with nutrient intakes below DRIs.

5. Discussão Geral

Ao longo desse estudo, a desnutrição em pacientes com DC foi rara, porém o sobrepeso e a obesidade foram mais frequentes. Estudos europeus e norte americano confirmam nossos resultados. Pacientes portugueses com DC (n=78), em remissão ou atividade inflamatória leve, apresentavam uma taxa de 32% de sobrepeso e 8% de obesidade (21). Na Escócia, pesquisadores avaliaram 489 indivíduos com DII e observaram que 38% tinham sobrepeso e 18% eram obesos (63). Na população pediátrica, um estudo multicêntrico feito nos Estados Unidos, com 1598 crianças com DII, encontrou um percentual de 23,6% de sobrepeso ou obesidade (64). O excesso de peso é um problema de saúde mundial, que atingiu a população com DII. Estudos são necessários para investigar os efeitos desse distúrbio nutricional no curso e tratamento da DC.

Silva et al. (65) observaram que os pacientes com DC mais sintomáticos e com valores de PCR mais elevados foram aqueles com maior quantidade de gordura corporal. Ainda está em especulação se existe o envolvimento dos adipócitos mesentéricos na PCR aumentada e no curso da doença. Pacientes com PCR elevada têm maior número de recaídas graves (66); além disso, esta proteína está associada à inflamação revelada por endoscopia e histologia e ao nível sérico de TNF- α (67).

No capítulo 1, foi verificado que o IMC, %GC e PCT foram mais elevados no grupo de pacientes em tratamento com anti-TNF- α , do que no grupo em monoterapia com azatioprina. Além disso, ao classificar a PCT de acordo com o sexo e idade, encontramos uma proporção maior de sobrepeso e obesidade no grupo com anti-TNF- α . Dessa forma, existe a possibilidade do anti-TNF- α contribuir com o excesso de peso e gordura corporal.

No estudo de Vadan et al. (13), a maioria dos pacientes com DC em atividade (90%) responderam ao anti-TNF- α e entraram em remissão. Estes pacientes tiveram um ganho de peso progressivo, tanto os desnutridos, quanto os eutróficos. Outro estudo (68), encontrou um aumento de 18% no volume total da gordura abdominal de pacientes com DC, após 8 semanas em uso de anti-TNF- α . Este aumento foi superior ao encontrado em indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), em terapia com Indinavir e Ritonavir, antiretrovirais, conhecidos por induzir a lipodistrofia (69). O impacto do uso do anti-TNF- α também foi investigado em indivíduos com espondiloartropatia. Após dois anos de tratamento, foi observado um aumento de peso significativo dos pacientes, principalmente de gordura corporal (70). O mecanismo de ação desta terapia sobre o estado nutricional de indivíduos com DC não foi esclarecido. Supõe-se que este medicamento reduz os efeitos catabólicos da inflamação e que os sintomas gastrointestinais são amenizados, melhorando o apetite e promovendo o ganho de peso dos pacientes (13).

Na fase ativa da DC, dietas restritivas são normalmente indicadas com a finalidade de aliviar os sintomas gastrointestinais. Os próprios pacientes tendem a não tolerar alguns tipos de alimentos, restringindo, ainda mais, suas dietas. Zallot et al. (25) investigaram o comportamento alimentar de pacientes com DII e notaram que 10-40% evitavam o consumo de frutas e vegetais. Além disso, o consumo de cereais, chocolates, laticínios, gorduras e adoçantes artificiais já foram associados às crises de intolerância alimentar nestes doentes (71,72).

As restrições alimentares podem levar às deficiências nutricionais. No estudo de Sousa Guerreiro et al. (21) houve um baixo consumo de cálcio, vitamina C, E e K, devido a exclusão de leites e vegetais. Nós observamos que os pacientes tinham uma ingestão

inadequada de vários micronutrientes, principalmente de cálcio, potássio e vitaminas D, A e C. Uma hipótese para este resultado é que mesmo em remissão da doença, os pacientes continuam excluindo de suas dietas alimentos ricos em vitaminas e sais minerais, como frutas e verduras. Além disso, excluem alimentos fontes de cálcio e vitamina D, como leite e derivados. Acredita-se que estes pacientes tenham medo de que ocorra uma recidiva da doença e dos sintomas gastrointestinais ao voltar a consumir tais alimentos. Porém, não existe até o momento, nenhuma evidência científica relacionando a ingestão destes alimentos com recidivas da doença.

A ingestão de suplementos com PSL ou com PS, por 16 semanas, reduziu a gordura corporal e aumentou a massa magra de pacientes com DC. Ambos os suplementos não modificaram o IADC destes indivíduos, que permaneceram em remissão da doença (capítulo 2).

Efeitos na composição corporal de suplementos nutricionais com PSL e PS foram pouco explorados na DC. O uso de uma dieta enteral exclusiva (Modulen; Nestlé) melhorou a massa magra de crianças com doença ativa (73) e uma dieta enteral rica em PS aumentou a massa magra de pacientes em remissão (62). Este anabolismo muscular decorrente do uso de suplementos ricos em proteínas, também, foi observado em outras doenças, como Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (74) e Polimialgia Reumática (75).

O uso destes suplementos, também, foi avaliado na população com obesidade. Baer et al. (76) estudaram os efeitos dos suplementos PSL e PS por 23 semanas, sem restrições na dieta. No final da suplementação, o grupo PSL apresentou peso e gordura corporal significativamente menor do que o grupo que consumiu carboidrato e o grupo PS apresentou peso e composição corporal semelhantes ao grupo com carboidrato. Ainda em

obesos (77), restrição em 500 calorias e suplementação com PSL (20g por dia) ou glicose (20g por dia), por 12 semanas, reduziu o peso de ambos os grupos. Porém, os indivíduos que ingeriram PSL apresentaram maiores perdas de peso e maiores reduções no percentual de gordura.

Autores sugerem que as proteínas têm maior poder de saciedade e termogênese quando comparadas com outros nutrientes. Acredita-se que as PSL apresentam um poder maior de saciedade, pois o glicomacropéptido, presente nestas proteínas, é capaz de estimular a produção da colecistoquinina (CCK), um importante modulador da saciedade (78,79). As PSL demonstraram ser mais potentes no estímulo da CCK do que a caseína e a soja (80,81). Pal e Ellis (80) observaram uma redução significativa no apetite e na ingestão alimentar após o consumo de 50g de PSL, quando comparado com o consumo de quantidades iguais de proteína de atum, peru ou albumina do ovo.

Existe a hipótese de que as PSL sejam mais efetivas na redução do peso e da gordura corporal, porém, neste estudo, os efeitos destas proteínas em pacientes com DC foram semelhantes aos efeitos das PS (capítulo 2).

6. Conclusão Geral

A maioria dos pacientes deste estudo estava em remissão clínica da doença e apresentaram uma ingestão adequada de macronutrientes e deficiente de micronutrientes. A desnutrição foi rara ao longo deste estudo (5%) e o sobrepeso e a obesidade foram mais frequentes. Este estado nutricional alterado de pacientes com DC em remissão, indica fortemente que orientações dietéticas devem ser recomendadas para mudar hábitos alimentares e prevenir o excesso de peso e deficiências de micronutrientes.

Os suplementos nutricionais com proteínas do soro de leite e proteínas de soja, após 16 semanas de uso, mudaram a composição corporal e mantiveram o estado de remissão da doença. Concluímos que esta suplementação ao reduzir a gordura corporal pode ser uma estratégia para tratar a obesidade. Além disso, a inflamação decorrente do excesso de tecido adiposo poderia ser prevenida, contribuindo para uma melhor evolução clínica. Naturalmente, estudos multicêntricos com maior número de indivíduos são necessários para apoiar estes resultados.

7. Referências Bibliográficas

1. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2011 Jun 15;474(7351):307-17.
2. Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *Lancet*. 2012 Nov 3;380(9853):1590-605.
3. Bernstein CN, Blanchard JF, Kliever E, Wajda A. Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer*. 2001 Feb 15;91(4):854-62.
4. Jess T, Gomborg M, Matzen P, Munkholm P, Sørensen T. Increased risk of intestinal cancer in Crohn's disease: a meta-analysis of population-based cohort studies. *Am J Gastroenterol*. 2005 Dec;100(12):2724-9.
5. Jess T, Loftus EJ, Velayos F, Harmsen W, Zinsmeister A, Smyrk T, et al. Incidence and prognosis of colorectal dysplasia in inflammatory bowel disease: a population-based study from Olmsted County, Minnesota. *Inflamm Bowel Dis*. 2006 Aug;12(8):669-76.
6. Velayos FS, Loftus EV Jr, Jess T, Harmsen WS, Bida J, Zinsmeister AR, et al. Predictive and protective factors associated with colorectal cancer in ulcerative colitis: a case-control study. *Gastroenterology*. 2006 Jun;130(7):1941-9.
7. O'Connor PM, Lapointe TK, Beck PL, Buret AG. Mechanisms by which inflammation may increase intestinal cancer risk in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2010 Aug;16(8):1411-20.

8. Loftus EV Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*. 2004 May;126(6):1504-17.
9. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*. 2012 Jan;142(1):46-54.e42; quiz e30.
10. Molodecky NA, Kaplan GG. Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2010 May;6(5):339-46.
11. Torres MI, Ríos A. Current view of the immunopathogenesis in inflammatory bowel disease and its implications for therapy. *World Journal Gastroenterol*. 2008;14(13):1972-1980.
12. Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF, et al. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet*. 2002 May 4;359(9317):1541-9.
13. Vadan R, Gheorghe LS, Constantinescu A, Gheorghe C. The prevalence of malnutrition and the evolution of nutritional status in patients with moderate to severe forms of Crohn's disease treated with Infliximab. *Clin Nutr*. 2011 Feb;30(1):86-91.
14. Franchimont D, Roland S, Gustot T, Quertinmont E, Toubouti Y, Gervy MC, et al. Impact of infliximab on serum leptin levels in patients with Crohn's disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Jun;90(6):3510-6.
15. Elia M. Nutrition and health economics. *Nutrition*. 2006 May;22(5):576-8.
16. Hwang C, Ross V, Mahadevan U. Micronutrient deficiencies in inflammatory bowel disease: From A to zinc. *Inflammatory bowel diseases*. 2012 Oct;18(10):1961-81.

17. Jahnsen J, Falch JA, Mowinckel P, Aadland E. Body composition in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Am J Gastroenterol*. 2003 Jul;98(7):1556-62.
18. Filippi J, Al-Jaouni R, Wiroth JB, Hébuterne X, Schneider SM. Nutritional deficiencies in patients with Crohn's disease in remission. *Inflamm Bowel Dis*. 2006 Mar;12(3):185-91.
19. Valentini L, Schaper L, Buning C, Hengstermann S, Koernicke T, Tillinger W, et al. Malnutrition and impaired muscle strength in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis in remission. *Nutrition*. 2008 Jul-Aug;24(7-8):694-702.
20. Hass DJ, Brensinger CM, Lewis JD, Lichtenstein GR. The impact of increased body mass index on the clinical course of Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006 Apr;4(4):482-8.
21. Sousa Guerreiro C, Cravo M, Costa AR, Miranda A, Tavares L, Moura-Santos P, et al. A Comprehensive Approach to Evaluate Nutritional Status in Crohn's Patients in the Era of Biologic Therapy: A Case-Control Study. *Am J Gastroenterol*. 2007 Nov;102(11):2551-6.
22. Boutros M, Maron D. Inflammatory Bowel Disease in the Obese Patient. *Clin Colon Rectal Surg*. 2011 Dec;24(4):244-52.
23. Karagiannides I, Pothoulakis C. Substance P, obesity, and gut inflammation. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2009 Feb;16(1):47-52.
24. Bertin B, Desreumaux P, Dubuquoy L. Obesity, visceral fat and Crohn's disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2010 Sep;13(5):574-80.

25. Zallot C, Quilliot D, Chevaux JB, Peyrin-Biroulet C, Guéant-Rodriguez RM, Freling E, et al. Dietary beliefs and behavior among inflammatory bowel disease patients. *Inflamm Bowel Dis*. 2013 Jan;19(1):66-72.
26. Rodriguez-Bores L, Barahona-Garrido J, Yamamoto-Furusho JK. Basic and clinical aspects of osteoporosis in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2007 Dec 14;13(46):6156-65.
27. Pappa HM, Grand RJ, Gordon CM. Report on the vitamin D status of adult and pediatric patients with inflammatory bowel disease and its significance for bone health and disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2006 Dec;12(12):1162-74.
28. Vagianos K, Bector S, McConnell J, Bernstein CN. Nutrition assessment of patients with inflammatory bowel disease. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2007 Jul-Aug;31(4):311-9.
29. Vagianos K, Bernstein CN. Homocysteinemia and B vitamin status among adult patients with inflammatory bowel disease: a one-year prospective follow-up study. *Inflamm Bowel Dis*. 2012 Apr;18(4):718-24.
30. Hengstermann S, Valentini L, Schaper L, Buning C, Koernicke T, Maritschnegg M, et al. Altered status of anti-oxidant vitamins and fatty acids in patients with inactive inflammatory bowel disease. *Clin Nutr*. 2008 Aug;27(4):571-8.
31. Verma S, Kirkwood B, Brown S, Gjafer MH. Oral nutritional supplementation is effective in the maintenance of remission in Crohn's disease. *Dig Liver Dis*. 2000 Dec;32(9):769-74.

32. Takagi S, Utsunomiya K, Kuriyama S, Yokoyama H, Takahashi S, Iwabuchi M, et al. Effectiveness of an 'half elemental diet' as maintenance therapy for Crohn's disease: a randomized-controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006 Nov 1;24(9):1333-40.
33. Coëffier M, Marion-Letellier R, Déchelotte P. Potential for amino acids supplementation during inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 2010 Mar;16(3):518-24.
34. Loannidis O, Varnalidis I, Paraskevas G, Botsios D. Nutritional modulation of the inflammatory bowel response. *Digestion.* 2011;84(2):89-101.
35. Sido B, Hack V, Hochlehnert A, Lipps H, Herfarth C, Dröge W. Impairment of intestinal glutathione synthesis in patients with inflammatory bowel disease. *Gut.* 1998 Apr;42(4):485-92.
36. Miralles-Barrachina O, Savoye G, Belmonte-Zalar I, Hochain P, Ducrotte P, Heeketsweiler B, et al. Low levels of glutathione in endoscopic biopsies of patients with Crohn's colitis: the role of malnutrition. *Clin Nutr.* 1999 Oct;18(5):313-7.
37. Lecleire S, Hassan A, Marion-Letellier R, Antonietti M, Savoye G, Bôle-Feysot C, et al. Combined glutamine and arginine decrease proinflammatory cytokine production by biopsies from Crohn's patients in association with changes in nuclear factor-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J Nutr.* 2008 Dec;138(12):2481-6.
38. Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* 2008 Feb;134(2):577-94.
39. Chapman TM, Plosker GL, Figgitt DP. VSL#3 probiotic mixture: a review of its use in chronic inflammatory bowel diseases. *Drugs.* 2006;66(10):1371-87.

40. Lindsay JO, Whelan K, Stagg AJ, Gobin P, Al-Hassi HO, Rayment N, et al. Clinical, microbiological, and immunological effects of fructo-oligosaccharide in patients with Crohn's disease. *Gut*. 2006 Mar;55(3):348-55.
41. Llopis M, Antolin M, Carol M, Borruel N, Casellas F, Martinez C, et al. *Lactobacillus casei* downregulates commensals' inflammatory signals in Crohn's disease mucosa. *Inflamm Bowel Dis*. 2009 Feb;15(2):275-83.
42. Hartmann R, Meisel H, Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr Opin Biotechnol*. 2007 Apr;18(2):163-9.
43. Krissansen GW. Emerging health properties of whey proteins and their clinical implications. *J Am Coll Nutr*. 2007 Dec;26(6):713S-23S.
44. Abrahão V. Nourishing the dysfunctional gut and whey protein. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2012 Sep;15(5):480-4.
45. Sousa GT, Lira FS, Rosa JC, de Oliveira EP, Oyama LM, Santos RV, et al. Dietary whey protein lessens several risk factors for metabolic diseases: a review. *Lipids Health Dis*. 2012 Jul 10;11:67.
46. Graf S, Egert S, Heer M. Effects of whey protein supplements on metabolism: evidence from human intervention studies. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2011 Nov;14(6):569-80.
47. Gilbert JA, Bendtsen NT, Tremblay A, Astrup A. Effect of proteins from different sources on body composition. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2011 Sep;21 Suppl 2:B16-31.

48. Rusu D, Drouin R, Pouliot Y, Gauthier S, Poubelle PE. A bovine whey protein extract can enhance innate immunity by priming normal human blood neutrophils. *J Nutr.* 2009 Feb;139(2):386-93.
49. Kayser H, Meisel H. Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins. *FEBS Lett* 1996 Mar 25;383(1-2):18-20.
50. de Aguilar-Nascimento JE, Prado Silveira BR, Dock-Nascimento DB. Early enteral nutrition with whey protein or casein in elderly patients with acute ischemic stroke: A double-blind randomized trial. *Nutrition.* 2011 Sep;27(9):982.
51. Micke P, Beeh KM, Buhl R. Effects of long-term supplementation with whey proteins on plasma glutathione levels of HIV-infected patients. *Eur J Nutr.* 2002 Feb;41(1):12-8.
52. Benjamin J, Makharia G, Ahuja V, Anand Rajan KD, Kalaivani M, Gupta SD, et al. Glutamine and whey protein improve intestinal permeability and morphology in patients with Crohn's disease: a randomized controlled trial. *Dig Dis Sci.* 2012 Apr;57(4):1000-12.
53. Federal Register, Food labeling: Health claims; soy protein and coronary heart disease. Food and Drug Administration, HHS. Final rule. *Fed Regist.* 1999 Oct 26;64(206):57700-33.
54. Ali AA, Velazquez MT, Hansen CT, Mohamed AI, Batean SJ. Effects of soybean isoflavones, probiotics, and their interactions on lipid metabolism and endocrine system in an animal model of obesity and diabetes. *J Nutr Biochem.* 2004 Oct;15(10):583-90.
55. Louet JF, LeMay C, Mauvais-Jarvis F. Antidiabetic actions of estrogen: insight from human and genetic mouse models. *Curr Atheroscler Rep.* 2004 May;6(3):180-5.

56. Kim HK, Nelson-Dooley C, Della-Fera MA, Yang JY, Zhang W, Duan JH, et al. Genistein decreases food intake, body weight, and fat pad weight and causes adipose tissue apoptosis in ovariectomized female mice. *J Nutr.* 2006 Feb;136(2):409-14.
57. de Mejia EG, Dia VP. The role of nutraceutical proteins and peptides in apoptosis, angiogenesis, and metastasis of cancer cells. *Cancer Metastasis Rev.* 2010 Sep;29(3):511-28.
58. Guo JY, Li X, Browning JD, Rottinghaus GE, Lubahn DB, Constantinou A, et al. Dietary soy isoflavones and estrone protect ovariectomized ERalphaKO and wild-type mice from carcinogen-induced colon cancer. *J Nutr.* 2004 Jan;134(1):179-82.
59. Hernández-Ledesma B, Hsieh C, de Lumen B. Antioxidant and anti-inflammatory properties of cancer preventive peptide lunasin in RAW 264.7 macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Dec 18;390(3):803-8.
60. Deibert P, König D, Schmidt-Trucksäss A, Zaenker KS, Frey I, Landmann U, Berg A. Weight loss without losing muscle mass in pre-obese and obese subjects induced by a high-soy- protein diet. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2004 Oct;28(10):1349-52.
61. Liao FH, Shieh MJ, Yang SC, Lin SH, Chien YW. Effectiveness of a soy-based compared with a traditional low calorie diet on weight loss and lipid levels in overweight adults. *Nutrition.* 2007 Jul-Aug;23(7-8):551-6.
62. Capristo E, Mingrone G, Addolorato G, Greco AV, Gasbarrini G. Effect of a vegetable-protein-rich polymeric diet treatment on body composition and energy metabolism in inactive Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2000 Jan;12(1):5-11.

63. Steed H, Walsh S, Reynolds N. A brief report of the epidemiology of obesity in the inflammatory bowel disease population of Tayside, Scotland. *Obes Facts*. 2009;2(6):370-2.
64. Long MD, Crandall WV, Leibowitz IH, Duffy L, del Rosario F, Kim SC, et al. Prevalence and epidemiology of overweight and obesity in children with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2011 Oct;17(10):2162-8.
65. Silva AF, Schieferdecker MEM, Roccom CS, Amarante HMBS. Relação entre estado nutricional e atividade inflamatória em pacientes com doença inflamatória intestinal. *Arq Bras Cir Dig*. 2010 Sep;23(3):154–158.
66. Koelewijn CL, Schwartz MP, Samson M, Oldenburg B. C-reactive protein levels during a relapse of Crohn's disease are associated with the clinical course of the disease. *World J Gastroenterol*. 2008 Jan 7;14(1):85-9.
67. Efrat B, Iris G, Wang H, Eitan S, Yona K. A Subgroup of First-Degree Relatives of Crohn's Disease Patients Shows a Profile of Inflammatory Markers in the Blood Which Is More Typical of Crohn's Disease Patients Than of Normal Individuals. *Mediators Inflamm*. 2006;2006(2):74785.
68. Parmentier-Decrucq E, Duhamel A, Ernst O, Fermont C, Louvet A, Vernier-Massouille G, Cortot A, Colombel J, Desreumaux P, Peyrin-Biroulet L. Effects of infliximab therapy on abdominal fat and metabolic profile in patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2009 Oct;15(10):1476-84.
69. Boyd MA, Carr A, Ruxrungtham K, Srasuebkul P, Bien D, Law M, et al. Changes in body composition and mitochondrial nucleic acid content in patients switched from

- failed nucleoside analogue therapy to ritonavir-boosted indinavir and efavirenz. *J Infect Dis.* 2006 Sep;194(5):642-50.
70. Briot K, Gossec L, Kolta S, Dougados M, Roux C. Prospective assessment of body weight, body composition, and bone density changes in patients with spondyloarthropathy receiving anti-tumor necrosis factor-alpha treatment. *J Rheumatol.* 2008 May;35(5):855-61.
 71. Joachim G. The relationship between habits of food consumption and reported reactions to food in people with inflammatory bowel disease—testing the limits. *Nutr Health.* 1999;13(2):69-83.
 72. Riordan AM, Hunter JO, Cowan RE, Crampton JR, Davidson AR, Dickinson RJ, et al. Treatment of active Crohn's disease by exclusion diet: East Anglian multicentre controlled trial. *Lancet.* 1993 Nov 6;342(8880):1131-4.
 73. Gerasimidis K, Talwar D, Duncan A, Moyes P, Buchanan E, Hassan K, O'Reilly D, McGrogan P, Edwards CA. Impact of exclusive enteral nutrition on body composition and circulating micronutrients in plasma and erythrocytes of children with active Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2012 Sep;18(9):1672-81.
 74. Engelen MP, Rutten EP, De Castro CL, Wouters EF, Schols AM, Deutz NE. Casein protein results in higher prandial and exercise induced whole body protein anabolism than whey protein in chronic obstructive pulmonary disease. *Metabolism.* 2012 Sep;61(9):1289-300.
 75. Björkman MP, Pilvi TK, Kekkonen RA, Korpela R, Tilvis RS. Similar effects of leucine rich and regular dairy products on muscle mass and functions of older

- polymyalgia rheumatica patients: a randomized crossover trial. *J Nutr Health Aging*. 2011 Jun;15(6):462-7.
76. Baer DJ, Stote KS, Paul DR, Harris GK, Rumpler WV, Clevidence BA. Whey Protein but Not Soy Protein Supplementation Alters Body Weight and Composition in Free-Living Overweight and Obese Adults. *J Nutr*. 2011 Aug;141(8):1489-94.
77. Frestedt JL, Zenk JL, Kuskowski MA, Ward LS, Bastian ED. A whey-protein supplement increases fat loss and spares lean muscle in obese subjects: a randomized human clinical study. *Nutr Metab (Lond)*. 2008 Mar 27;5:8.
78. Luhovyy BL, Akhavan T, Anderson GH. Whey proteins in the regulation of food intake and satiety. *Int J Obes (Lond)*. 2011 Apr;35(4):562-9.
79. Burton-Freeman BM. Glycomacropeptide (GMP) is not critical to whey induced satiety, but may have a unique role in energy intake regulation through cholecystokinin (CCK). *Physiol Behav*. 2008 Jan 28;93(1-2):379-87.
80. Pal S, Ellis V. The chronic effects of whey proteins on blood pressure, vascular function, and inflammatory markers in overweight individuals. *Obesity (Silver Spring)*. 2010 Jul;18(7):1354-9.
81. Veldhorst MA, Nieuwenhuizen AG, Hochstenbach-Waelen A, van Vught AJ, Westerterp KR, Engelen MP, et al. Dose-dependent satiating effect of whey relative to casein or soy. *Physiol Behav*. 2009 Mar 23;96(4-5):675-82.

8. ANEXOS

Anexo 1

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

CEP, 08/02/12
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 1198/2011 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
CAAE: 1099.0.146.000-11

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "REGULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE E ESTADO NUTRICIONAL DE PACIENTES COM DOENÇA DE CROHN SOB TERAPIA COM ANTI-TNF- α E AZATIOPRINA".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Júlia Figueiredo Machado

INSTITUIÇÃO: Hospital de Clínicas/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 11/11/2011

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 08/02/13 (O formulário encontra-se no site acima).

II – OBJETIVOS.

Avaliar as mudanças nos parâmetros nutricionais, na atividade da doença e na imunidade celular associadas ao uso de suplemento nutricional constituído por concentrado de proteína de leite bovino e TGF-beta em pacientes com doença de Crohn sob terapia com azatioprina diária e anti-TNF- α .

III – SUMÁRIO.

Estudo destinado para dissertação de mestrado da pesquisadora responsável, sob orientação da Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela e tendo também a colaboração da pesquisadora Vanessa Oya. Os pesquisadores esclarecem que a doença de Crohn é caracterizada por uma inflamação crônica que pode envolver todo o trato digestório. Na fase aguda, pode ocorrer desnutrição, o que contribui para a piora da doença. Já durante a remissão da doença, alguns indivíduos podem apresentar sobrepeso ou obesidade, podendo agravar a inflamação pois o tecido adiposo produz citocinas pró-inflamatórias. A hipótese a ser testada é de que as proteínas do soro do leite bovino são capazes de reduzir o índice de atividade da doença de Crohn e que tais proteínas têm efeitos positivos no estado nutricional de pacientes com essa condição. A presente pesquisa compreende um estudo do tipo ensaio clínico prospectivo, duplo-cego, placebo controlado. Serão avaliados 100 sujeitos de pesquisa exclusivamente neste centro, sendo que a amostra poderá incluir menores de idade portadores de doença de Crohn, acompanhados no ambulatório de doenças inflamatórias intestinais do Departamento de Cirurgia do HC/Unicamp, sob terapia intravenosa com anti-TNF- α a cada dois meses e sob terapia com azatioprina via oral diariamente. Serão excluídos fumantes, drogaditos, em uso de outros medicamentos ou que não puderem completar as 16 semanas de duração da intervenção do estudo. Os sujeitos de pesquisa serão divididos aleatoriamente e dois grupos, um deles suplementado com 30 g de concentrado de soro de leite bovino e o outro com placebo (isolado de proteína de soja). Essa suplementação será feita na forma de sachês a serem consumidos no domicílio dos sujeitos de pesquisa, na quantidade de 14 por semana (não ultrapassando três por

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187



dia).

Os procedimentos incluem o preenchimento de questionários sobre dados sócio-econômicos, uso de medicamentos, sintomas da doença, alimentação e aceitação do suplemento. A parte intervencional será caracterizada pelo fornecimento de suplementos nutricionais constituído de concentrado de soro de leite bovino enriquecido com TGF-beta e avaliação nutricional em três momentos diferentes durante o estudo ao longo de 16 semanas, além da coleta de 20 ml de sangue para hemograma, albumina sérica, pré-albumina sérica e proteína C reativa, além de fenotipagem de linfócitos T reguladores e de linfócitos Th17. O estudo nutricional será avaliado através de antropometria, bioimpedância, recordatório e registro alimentar, bem como dosagem de albumina e pré-albumina sérica. A cada dois meses os participantes deverão comparecer ao Gastrocentro para consulta com a pesquisadora que, além disso, fará monitoramento telefônico do consumo a cada 15 dias.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES.

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

V - PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES.

O sujeito 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 (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro



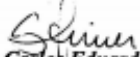
centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto 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 (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII- DATA DA REUNIÃO.

Homologado na I Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 17 de janeiro de 2011.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Anexo 2

Análise microbiológica dos suplementos nutricionais



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CENTRO DE CIÊNCIA E QUALIDADE DE ALIMENTOS

RELATÓRIO DE ENSAIO Nº CQ 5106/2011MB

MATERIAL: Concentrado de Proteína de Soro de Leite Bovino

INTERESSADO: Maria Mariuce dos Santos Vilela

ENDEREÇO: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Cidade Universitária, Campinas (SP)

DATA DE RECEBIMENTO DA(S) AMOSTRA(S): 03/08/2011

DATA DE ANÁLISE: 04/08/2011

DATA DE EMISSÃO DO RELATÓRIO: 11/08/2011

NATUREZA DA(S) ANÁLISE(S): Microbiológica

RESPONSÁVEL(EIS): Valéria C. A. Junqueira

1. MÉTODO(S)

- 1.1) ISO 6579. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp., 4th ed. The International Organization for Standardization, 2002, Corrigendum 1:2004, Amendment 1:2007.
- 1.2) ISO 4831. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of coliforms - Most probable number technique, 3rd ed. The International Organization for Standardization, 2006.
- 1.3) ISO 7251. Microbiology of food and animal stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of presumptive *Escherichia coli* - most probable number technique, 3rd ed. The International Organization for Standardization, 2005.
- 1.4) ISO 6888-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) – Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium, 1st ed. The International Organization for Standardization, 1999, Amendment 1:2003.
- 1.5) DOWNES, F. P. & ITO, K. (eds.). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed. Washington: American Public Health Association, 2001. 676 p.

2. RESULTADO(S)

Determinação	Método	Resultado
<i>Salmonella</i> (em 25g)	1.1	Ausente
Coliformes totais (NMP/g)	1.2	<3
Coliformes termotolerantes (NMP/g)	1.3	<3
<i>Estafilococos</i> coagulase positiva (UFC/g)	1.4	<10
<i>Bacillus cereus</i> (UFC/g)	1.5	<10
Contagem total de aeróbios mesófilos (UFC/g)	1.5	70(est) ^a
Contagem de bolores e leveduras (UFC/g)	1.5	<10

NMP = Número mais provável. UFC = Unidades formadoras de colônias. ^aContagem estimada, abaixo do limite de quantificação do método.

3. OBSERVAÇÕES

a) O Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos não foi responsável pela amostragem e coleta do material, cuja identificação foi fornecida pelo interessado. Os resultados aplicam-se exclusivamente à(s) amostra(s) analisada(s), sendo vedado o uso do nome do ITAL, sob pena de indenização, para qualificar produção sobre a qual o mesmo não exerceu controle. b) Este relatório só tem valor oficial quando impresso em papel com marca d'água, com assinaturas ou rubricas originais em todas as páginas. Sua reprodução só pode ser feita na íntegra, sendo requerida autorização formal deste laboratório para reprodução parcial.

Visto:

Valéria C. A. Junqueira
Diretor Técnico de Serviço
Unidade Laboratorial de Referência de Microbiologia

--

Maristela S. Nascimento
Pesquisador Científico
Unidade Laboratorial de Referência de Microbiologia



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CENTRO DE CIÊNCIA E QUALIDADE DE ALIMENTOS

RELATÓRIO DE ENSAIO Nº CQ 7263/2011MB

MATERIAL: Isolado de proteína de soja

INTERESSADO: Maria Mariuce dos Santos Vilela

ENDEREÇO: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Cidade Universitária, Campinas (SP)

DATA DE RECEBIMENTO DA(S) AMOSTRA(S): 26/10/2011

DATA DE ANÁLISE: 26/10/2011

DATA DE EMISSÃO DO RELATÓRIO: 03/11/2011

NATUREZA DA(S) ANÁLISE(S): Microbiológica

RESPONSÁVEL(EIS): Maristela S. Nascimento

1. MÉTODO(S)

- 1.1) AOAC RI Performance TestedSM Method 031001, 2010. Applied Biosystems MicroSEQ® *Salmonella* spp PCR Detection Kit.
- 1.2) ISO 6579. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp., 4th ed. The International Organization for Standardization, 2002, Corrigendum 1:2004, Amendment 1:2007.
- 1.3) ISO 7251. Microbiology of food and animal stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of presumptive *Escherichia coli* - most probable number technique, 3rd ed. The International Organization for Standardization, 2005.
- 1.4) ISO 6888-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) – Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium, 1st ed. The International Organization for Standardization, 1999, Amendment 1:2003.
- 1.5) DOWNES, F. P. & ITO, K. (eds.). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed. Washington: American Public Health Association, 2001. 676 p.

2. RESULTADO(S)

Determinação	Método	Resultado
<i>Salmonella</i> (em 25g)	1.1 e 1.2	Ausente
Coliformes termotolerantes (NMP/ml)	1.3	<0,3
Estafilococos coagulase positiva (UFC/ml)	1.4	<1
<i>Bacillus cereus</i> (UFC/ml)	1.5	<1

NMP = Número mais provável, por ml do produto preparado. UFC = Unidades formadoras de colônias, por ml do produto preparado.

3. COMENTÁRIO(S)

A(s) amostra(s) encontra(m)-se de acordo com os padrões microbiológicos estabelecidos pela Resolução RDC Número 12 de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Grupo de Alimentos 24, Item a.

4. OBSERVAÇÕES

a) O Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos não foi responsável pela amostragem e coleta do material, cuja identificação foi fornecida pelo interessado. Os resultados aplicam-se exclusivamente à(s) amostra(s) analisada(s), sendo vedado o uso do nome do ITAL, sob pena de indenização, para qualificar produção sobre a qual o mesmo não exerceu controle. b) Este relatório só tem valor oficial quando impresso em papel com marca d'água, com assinaturas ou rubricas originais em todas as páginas. Sua reprodução só pode ser feita na íntegra, sendo requerida autorização formal deste laboratório para reprodução parcial.

Visto:

Valéria C. A. Junqueira

Diretor Técnico de Serviço
Unidade Laboratorial de Referência de Microbiologia

Maristela S. Nascimento

Pesquisador Científico
Unidade Laboratorial de Referência de Microbiologia

Anexo 3

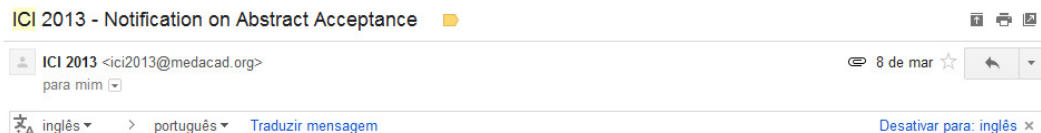
Trabalho apresentado no V Congresso Brasileiro de Nutrição

Integrada e GANEPÃO 2013



Anexo 4

Trabalho aceito pelo 15th International Congress of Immunology Milan, Italy/2013



Notification of Abstract Acceptance

Ms.
Júlia Machado
Campinas
Brazil

Email to:
juliafm83@gmail.com

Dear Ms. Machado.

On behalf of the Scientific Programme Committee of the

15th International Congress of Immunology – ICI, August 22 – 27, Milan, Italy

We are pleased to inform you that the abstract entitled

'Whey and Soy protein supplements improves body composition in patients with Crohn's disease under azathioprine and anti-TNF- α therapy.'
(Abstract Control Number: 2013-A-655-ICI)

Has been **accepted for Presentation** at the meeting.

The Scientific Committee is currently in the process of assigning the submissions to their final position within the scientific programme.

All further information on the type of presentation (Oral or Poster) as well as the session assignment, time and date of presentation will follow by the end of March 2013.

Please note that the deadline for payment of the reduced registration fee has been postponed to April 15, 2013 for abstract presenters.

Your abstract has also been accepted for publication in **Frontiers in Immunology**, the official IUIS journal, at **no additional cost**. Please follow the link below and click on "submit abstract" to get your abstract to ICI 2013 published and permanently archived in Frontiers in Immunology.

http://www.frontiersin.org/events/15th_International_Congress_of_Immunology/1635/

In case you need to withdraw your submission, please notify us as soon as possible.

Visit our Conference Website for more information: <http://www.ici2013.org>

We are looking forward to welcoming you to ICI 2013 in Milan.

With best regards,

On behalf of the ICI 2013 Organizing Committee

9. APÊNDICES

Apêndice 1

SUPLEMENTO:

FICHA DE COLETA DE DADOS

Nome: _____

HC: _____ Sexo: _____ Data de nascimento: ____/____/____ Idade: _____

Endereço: _____ Telefone: (____) _____

1. Dados clínicos:

- a) Data do diagnóstico da doença: _____
- b) Local afetado: _____
- c) Cirurgias prévias: _____
- d) Medicamentos em uso: _____
- e) Tabagismo: _____
- f) Etilismo: _____

2. Índice de Atividade da Doença de Crohn (Best WR, Beckett JM, Singleton JW, Kern F.

Development of a Crohn's disease activity index. Gastroenterology 1979;70:439-444.)

Variáveis clínicas ou laboratoriais	Valores por consulta			Fator	Subtotal por consulta		
	1 ^a	2 ^a	3 ^a		1 ^a	2 ^a	3 ^a
Número de evacuações líquidas ou muito moles nos últimos 7 dias				x 2			
Total de dor/cólicas abdominais na última semana: 0 - sem dor; 1- dor leve; 2- dor moderada; 3- dor forte.				x 5			
Bem-estar geral na última semana: 0 - bom; 1 - ligeiramente abaixo do aceitável; 2 - insatisfatório; 3 - muito ruim; 4 - terrível				x 7			
Presença de complicações: - artrite ou artralgia - irite ou uveíte - eritema nodoso ou pioderma gangrenoso ou estomatite aftóide - fissura anal ou fístula ou abscesso perirretal - febre acima de 37,8° C				x 20			
Terapia com droga antidiarréica (por exemplo, loperamida, difenoxilado, opiáceos): 0 - nenhuma; 1 - sim				x 30			

Massa abdominal: 0 - não; 2 – questionável; 5 - definida				x 10			
Hematócrito: homens: 47 menos Ht; mulheres: 42 menos Ht				x 6			
Percentual acima ou abaixo do peso corporal habitual 100x [(peso habitual-peso atual)/peso habitual]				x 1			
Total do IADC							

3. Antropometria

Antropometria	1ª consulta	2ª consulta	3ª consulta
Data			
Altura (m)			
Peso habitual (Kg)			
Peso atual (Kg)			
% de alteração do peso			
IMC (Kg/m ²)			
CB (cm)			
PCT (mm)			
% PCT			
CMB (cm)			
% CMB			
AMBc (cm ²)			

4. Bioimpedância

Bioimpedância	1ª consulta	2ª consulta	3ª consulta
Data			
Resistência			
Reactância			
Peso da gordura corporal			
Peso da massa magra			
% gordura			
% massa magra			
Taxa Metabólica Basal			

5. Exames laboratoriais

Exames	1ª consulta	2ª consulta	3ª consulta
Data			

Albumina			
Pré-albumina			
PCR			
Hemoglobina (g/dl)			
Hematócrito (%)			
Plaquetas (fl)			
Leucócitos (cél/mms)			
Linfócitos (cél/mms)			

6. Recordatório Alimentar de 24h

	1ª consulta	2ª consulta	3ª consulta
Data			
Desjejum			
Hora ____:____			
Colação			
Hora ____:____			
Almoço			
Hora ____:____			
Lanche			
Hora ____:____			
Jantar			
Hora ____:____			
Ceia			
Hora ____:____			

Apêndice 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA OS PAIS OU RESPONSÁVEIS DO PACIENTES MENORES DE IDADE COM DOENÇA DE CROHN

Declaro, por livre e espontânea vontade, que permito a participação de, _____, de ____ anos e HC nº _____, sob registro de nascimento _____, que se encontra sob responsabilidade de _____, de _____ anos, RG nº _____, residente na Rua _____, cujo grau de parentesco é _____, na pesquisa intitulada “**Regulação da resposta imune e estado nutricional de pacientes com Doença de Crohn sob terapia com anti-TNF- α e azatioprina**”, projeto de tese de mestrado da aluna Júlia Figueiredo Machado, promovido pelo Departamento de Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Unicamp, com orientação da Profa. Dra. Maria Marluce Dos Santos Vilela.

Esta pesquisa tem o objetivo de, através da suplementação alimentar com proteínas do soro de leite bovino enriquecida com TGF-beta, recuperar ou manter o estado nutricional e melhorar a resposta inflamatória dos pacientes com a doença de Crohn.

Atesto que recebi esclarecimentos quanto aos propósitos e procedimentos a serem utilizados durante o estudo, tais como:

- entrevista com profissional das áreas de nutrição e medicina;
- sorteio do grupo do qual irei fazer parte;
- os dois produtos que poderei tomar, sendo que não saberei qual deles eu irei receber;
- coleta de 30 ml de sangue para a realização de exames;
- exames antropométricos (peso, altura, pregas cutâneas) e bioimpedância;
- ingestão do produto alimentar;
- fornecimento de informações referentes à ingestão alimentar.

Comprometo-me a garantir a ingestão do suplemento alimentar fornecido, bem como, seguir às orientações recebidas quanto ao seu uso, tendo a garantia de receber resposta a qualquer pergunta e, esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos assuntos relacionados à pesquisa e a suplementação alimentar.

Estou ciente que não receberei remuneração em troca da participação, que os dados obtidos serão mantidos em sigilo, que posso deixar de participar da pesquisa no momento em que desejar e, que a desistência não influenciará no atendimento que venho recebendo.

De acordo,

Responsável pelo Participante: _____

Júlia Figueiredo Machado (telefone 19 32546124): _____

Profa Dra. Maria Marluce dos S. Vilela (telefone 19 3521-8963): _____

Campinas, ____ de _____ de 2012.

Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas- UNICAMP: 19-3521-8936

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES ADULTOS
COM DOENÇA DE CROHN

Eu, _____, de _____ anos, HC nº _____, RG nº _____, permito por livre e espontânea vontade a minha participação na pesquisa intitulada **“Regulação da resposta imune e estado nutricional de pacientes com Doença de Crohn sob terapia com anti-TNF- α e azatioprina”**, projeto de tese de mestrado da aluna Júlia Figueiredo Machado, promovido pelo Departamento de Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Unicamp, com orientação da Profa. Dra. Maria Marluce Dos Santos Vilela

Esta pesquisa tem o objetivo de, através da suplementação alimentar com proteínas do soro de leite bovino enriquecida com TGF-beta, recuperar ou manter o estado nutricional e melhorar a resposta inflamatória dos pacientes com a doença de Crohn.

Atesto que recebi esclarecimentos quanto aos propósitos e procedimentos a serem utilizados durante o estudo, tais como:

- entrevista com profissional das áreas de nutrição e medicina;
- sorteio do grupo do qual irei fazer parte;
- os dois produtos que poderei tomar, sendo que não saberei qual deles eu irei receber;
- coleta de 30 ml de sangue para a realização de exames;
- exames antropométricos (peso, altura, pregas cutâneas) e bioimpedância;
- ingestão do produto alimentar;
- fornecimento de informações referentes à ingestão alimentar.
-

Comprometo-me a ingerir o suplemento alimentar fornecido, bem como, seguir às orientações recebidas quanto ao seu uso, tendo a garantia de receber resposta a qualquer pergunta e, esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos assuntos relacionados à pesquisa e a suplementação alimentar.

Estou ciente que não receberei remuneração em troca da participação, que os dados obtidos serão mantidos em sigilo, que posso deixar de participar da pesquisa no momento em que desejar e, que a desistência não influenciará no atendimento que venho recebendo.

De acordo,

Responsável: _____

Júlia Figueiredo Machado (telefone 19 32546124): _____

Profa Dra. Maria Marluce dos S. Vilela (telefone 19 3521-8963): _____

Campinas, ____ de _____ de 2012.

Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas- UNICAMP: 19-3521-8936

Apêndice 3

Instruções para os participantes da pesquisa



Mingau de aveia ou maisena

- 250 ml de leite de vaca ou de soja
- 1 colher de aveia ou maisena
- Adoçar com mel ou açúcar



1. Ferva o leite em uma panela com os ingredientes e espere engrossar um **POUCO**. Não deixe engrossar muito, pois a adição do suplemento já irá engrossar o mingau.
2. Sirva em um prato, espere **ESFRIAR** e acrescente 1 pacote de suplemento. Misture bem e **CONSUMA IMEDIATAMENTE**.

USE SUA CRIATIVIDADE E INVENTE OUTRAS RECEITAS, MAS LEMBRE-SE DE SEGUIR AS REGRAS DE **NÃO AQUECER O SUPLEMENTO. NÃO ADICIONÁ-LO EM PREPARAÇÕES QUENTES** E **NÃO BATER PREPARAÇÕES COM O SUPLEMENTO EM LIQUIDIFICADOR OU BATEDEIRA!**

Em caso de dúvidas ligue:

Laboratório de Imunologia, Júlia ou Vanessa: (19) 19-35218989

Júlia: (19) 93025424

Vanessa: (19) 81886021

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Ciências Médicas

MANUAL ORIENTATIVO PARA PARTICIPANTES DA PESQUISA COM SUPLEMENTOS ALIMENTARES

TÍTULO DO PROJETO: Regulação da resposta imune e estado nutricional de pacientes com Doença de Crohn sob terapia com anti-TNF- α e azatioprina.

Pesquisadores:

Júlia Figueiredo Machado: nutricionista, aluna de Mestrado do Curso Saúde da Criança e do Adolescente, FCM-UNICAMP.

Vanessa Oya: bióloga, aluna de Doutorado do Curso Saúde da Criança e do Adolescente, FCM-UNICAMP.

Orientador: Profa. Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela, professora titular do departamento de Pediatria - Área de Imunologia - FCM-UNICAMP

7

Esta pesquisa tem como objetivo avaliar os efeitos de dois **suplementos alimentares** em pessoas com Doença de Crohn.

Iremos avaliar o estado nutricional dos participantes por meio das seguintes medidas:

1. Peso e altura;
2. Prega cutânea;
3. Bioimpedância.



Além disso, iremos avaliar a atividade inflamatória por meio de análises do sangue de cada participante. Para isso será necessário a **coleta de 30 ml de sangue**.



O sangue coletado será avaliado no Laboratório de Imunologia do Centro de Investigação em Pediatria. Será usado também, para as seguintes dosagens: Hemograma, albumina sérica, pré-albumina sérica e proteína C reativa.

Além disso, os participantes irão responder questionários sobre os seguintes temas:

1. Dados sócio-econômicos
2. Uso de medicamentos
3. Sintomas da doença
4. Alimentação
5. Aceitação do suplemento



1. Descasque e cozinhe a batata;
2. Enquanto a batata cozinha, doure a cebola na manteiga;
3. Bata a batata cozida no liquidificador junto com a cebola dourada;
4. Coloque numa panela com água quente, leve ao fogo baixo, e tempere a gosto; **NÃO DEIXE O CREME MUITO GROSSO, POIS O SUPLEMENTO JÁ IRÁ ENGROSSÁ-LO.**
5. Polvilhe o queijo ralado;
6. Sirva uma porção num prato fundo, espere **ESFRIAR** e acrescente 1 pacote de suplemento. Misture bem e **CONSUMA IMEDIATAMENTE**.

Sopa de ervilha ou lentilha ou feijão

- 4 dentes de alho amassados
- 1 cebola pequena cortada
- 300g ervilha ou lentilha ou feijão
- Extrato de tomate ou colorau
- 1 cubo de caldo de carne
- Sal a gosto
- Cebolinha picada
- Aproximadamente 1 litro de água.



1. Refogue o alho na panela de pressão com um pouco de óleo;
2. Acrescente água quente, extrato de tomate, cebolinha, cebola, caldo de carne e ervilha/lentilha/feijão. Tampe e espere pegar pressão, abaixe o fogo e cozinhe por cerca de 10 a 15 minutos.
3. Tempere com sal a gosto. Sirva uma porção num prato fundo, espere **ESFRIAR** e acrescente 1 pacote de suplemento. Misture bem e **CONSUMA IMEDIATAMENTE**.

1

6

Vitaminas

- 200 ml de água ou leite ou leite de soja;
- 1 pedaço grande de fruta;
- 1 colher de sopa de açúcar ou mel;
- ½ colher de sopa de aveia.



1. Bata todos os ingredientes no liquidificador;
2. Acrescente 1 pacote de suplemento e misture com o auxílio de uma **COLHER e CONSUMA IMEDIATAMENTE**.

Obs: não deixe a vitamina muito grossa, pois a adição do suplemento já irá engrossar a bebida.

Banana (frutas) amassada com aveia e mel

- 1 Fruta
- 1 colher de sopa de mel ou açúcar
- 1/2 colher de sopa de aveia



1. Amasse bem a fruta;
2. Acrescente os ingredientes e um pacote de suplemento;
3. Misture bem e **CONSUMA IMEDIATAMENTE**.

Creme de batata ou mandioquinha

- 1 batata inglesa (ou mandioquinha) grande
- 1/2 cebola
- 1/2 colher de manteiga ou margarina
- 1/2 colher de queijo ralado
- Água quente



5

Serão utilizados na pesquisa dois suplementos: **CONCENTRADO DE PROTEÍNA DO SORO DE LEITE BOVINO** e **ISOLADO DE PROTEÍNA DE SOJA**.

Estes suplementos estarão acondicionados em sachês identificados através de códigos. **PARTICIPANTE E PESQUISADORES NÃO SABERÃO DESTE CÓDIGO**.

Desta forma, ao aceitar participar desta pesquisa, **você não saberá qual dos dois suplementos irá tomar**.

A duração da suplementação será de **4 MESES**.

As avaliações e coletas de sangue serão feitas na primeira consulta (antes de iniciar o uso do suplemento), após 2 meses de suplementação e após 4 meses de suplementação.

NINGUÉM será obrigado a participar desta pesquisa.

NINGUÉM terá qualquer tipo de prejuízo no acompanhamento clínico, caso não aceite participar desta pesquisa.

Caso aceite participar você terá todas as informações e esclarecimentos necessários.

Nenhum participante terá gastos financeiros com a pesquisa.

Nenhum participante receberá dinheiro para participar da pesquisa.

2

ORIENTAÇÕES SOBRE O USO DO SUPLEMENTO

NUNCA AQUEÇA ou adicione o suplemento em alimentos quentes!



NUNCA BATA o suplemento em liquidificadores ou batedeiras!



Dilua sempre com o auxílio de uma colher!

Acrescentar o suplemento em preparações **MORNAS OU FRIAS!**

Consumir a preparação **IMEDIATAMENTE** após o acréscimo do suplemento!

3

NUNCA GUARDAR preparações

com o suplemento!



Após abrir o sachê com o suplemento, **UTILIZE IMEDIATAMENTE** todo o conteúdo do sachê!

NUNCA GUARDE embalagens abertas!

RECEITAS

Sucos

- Escolha o suco de sua preferência:
 - Suco natural
 - Sucos de caixinha
 - Sucos de soja
 - Sucos de garrafa



1. Diluir 1 pacote de suplemento em 200 ml de suco.
2. Com o auxílio de uma colher, **MISTURE BEM**, desfazendo todos os "grumos" formados.

4