



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO
INTEGRADO EM MEDICINA**

LILIANA MARLENE MARQUES CAMPOS

**POTENCIAL DO TRANSPLANTE DE CÉLULAS
ESTAMINAIS NA DOENÇA DE CROHN**

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE GASTROENTEROLOGIA

ORIENTAÇÃO CIENTÍFICA DE:

**PROFESSOR DOUTOR CARLOS MANUEL RICO SOFIA E DRA. MARIA SOFIA
RIBEIRO DE FARIA FERREIRA MENDES**

MARÇO / 2016

“Adoramos a perfeição, porque não a podemos ter; repugna-la-íamos, se a tivéssemos.
O perfeito é o desumano, porque o humano é imperfeito.”

Fernando Pessoa

Índice Geral

Agradecimentos	V
Índice de Figuras	VI
Índice de Tabelas	VII
Resumo	VIII
Abstract.....	X
Lista de Abreviaturas.....	XII
1. Introdução	1
1.1. Objetivos.....	1
1.2. Conceitos e Definições	1
2. Epidemiologia	2
3. Etiologia e Patogênese	4
3.1. Genética	4
3.1.1 Gene NOD2	6
3.2. Resposta Imune.....	8
3.2.1. Sistema Imunológico Intestinal Saudável	8
3.3. Fatores Ambientais	11
3.4. Disfunção da Barreira Epitelial	13
3.5. Microbiota Intestinal e Tolerância Oral.....	16
4. Células Estaminais	18
4.1. Definição e Tipos de Células Estaminais	20
4.2. Terapia com Células Estaminais Hematopoiéticas	22
4.2.1. Estudos Literários de TCHC Autólogo na DC	23

4.2.2. Estudos Literários de THSC Alogénico na DC	25
4.3. Terapia com Células Estaminais Mesenquimais	26
4.3.1. Terapia Sistémica com MSC	27
4.3.2. Terapia Local com MSC	28
4.4. Avaliação Pós-Transplante	31
4.5. Desvantagens da Terapia com Células Estaminais.....	31
4.6. Segurança da Terapia com Células Estaminais	31
4.7. Recidiva Pós-Transplante	32
4.8. Condições dos Locais para realizarem Transplante de Células Estaminais	32
5. Considerações Finais	33
6. Referências Bibliográficas	35

Agradecimentos

Gostaria de agradecer,

Ao Professor Doutor Carlos Manuel Rico Sofia, pela sua orientação e possibilidade de realizar o trabalho final do 6º Ano Médico, com vista à atribuição de grau de mestre, na Área Científica de Gastroenterologia, à qual guardo grande apreço e à Dra. Maria Sofia Ribeiro de Farias Ferreira Mendes, pela sua coorientação, disponibilidade, dedicação, colaboração na resolução de dúvidas e dificuldades, bem como pela partilha dos seus conhecimentos, fulcrais para a fundamentação e concretização desta dissertação.

Aos meus pais, por serem modelos de coragem, pelo amor, incentivo, apoio incondicional e por tudo aquilo que abdicaram para superação dos obstáculos que ao longo destes anos foram surgindo, nunca suspendendo os sonhos idealizados pelas filhas. Pela dedicação, amizade, entrega e compreensão a que nos acostumaram em todos os contextos sociais, que determinaram aquilo que sou hoje e aos quais irrevogavelmente ficarei eternamente grata.

À minha irmã, minha companheira e amiga, pela força, apoio e paciência proporcionados ao longo de todos estes anos, por todas as palavras de apoio nos momentos mais difíceis e por me manter firme e consistente quando as forças desbotavam com os obstáculos diariamente apresentados.

Um especial agradecimento, ao Bruno Teixeira, pela sua amizade incondicional, pelos bons momentos carinhosamente partilhados, pela ajuda e total disponibilidade, cruciais na concretização deste projeto.

Por último, mas não menos importantes, a todos os amigos que sempre me apoiaram e auxiliaram durante esta fase, pelo companheirismo, força e apoio partilhados.

Índice de Figuras

Figura 1. Cariótipo humano com doença inflamatória intestinal. Confirmadas e replicadas regiões de suscetibilidade representados por círculos vermelhos, outros por círculos azuis (Fonte: Baumgart & Sandborn, 2007)	5
Figura 2. Sinalização das vias proteicas de TLR e NOD (Fonte: Baumgart & Sandborn, 2007).....	6
Figura 3. Sistema imunitário intestinal, em individuo saudável. (Fonte: Baumgart & Sandborn, 2007)	8
Figura 4. Sistema imunitário intestinal com doença inflamatória intestinal (Fonte: Baumgart & Sandborn, 2007)	10
Figura 5. Arranjo macroscópico (A) e composição microscópica (B) de junções apertadas intercelulares. Os componentes estruturais das junções apertadas intercelulares podem ser classificadas como proteínas integrais de membrana (occludina, códons, e JAM), proteínas complexas juncionais (ZO-1, ZO-2, p130 ou ZO-3, 7H6, Symplekin, e cingulin), e citoesqueleto estrutural da célula (microtúbulos, filamentos intermediários e microfilamentos). (Fonte: Visser et al., 2009)	14
Figura 6. Classificação das células estaminais segundo a sua origem e função.....	21
Figura 7. Caraterísticas das células mesenquimais multipotentes. (Fonte: Martínez-Montiel et al., 2014)	27

Índice de Tabelas

Tabela 1. Genes de suscetibilidade da DC e suas respectivas localizações genómicas e funções	5
Tabela 2. Mutações genéticas associadas à integridade das CEI e mecanismo de disfunção subjacente.....	15
Tabela 3. Tipos e mecanismos de THSC.....	22
Tabela 4. Doentes em remissão sem necessidade de tratamento complementar após transplante.....	24
Tabela 5. Encerramento da fistula obtido na 12 ^a semana	29
Tabela 6. Encerramento da fistula obtido após a segunda dose de 40 milhões de ASC 30	
Tabela 7. Taxas de sobrevivência e livre de doença após transplante, de acordo com o estudo do BSBMT	32

Resumo

A Doença de Crohn (DC) é uma doença inflamatória crónica transmural, segmentar e assimétrica do trato gastrointestinal.

Apesar das inúmeras investigações, a etiologia permanece desconhecida, contudo são apontadas como potencial causas a combinação de disbiose intestinal, fatores genéticos, ambientais, perda da tolerância a antígenos comensais e alterações na permeabilidade intestinal e nos mecanismos imunitários. Efetivamente, esta conjuntura determina respostas imunes excessivas e alteradas, que culminam na inflamação crónica do trato gastrointestinal.

Esta patologia para além dos quadros recorrentes de sintomas gastrointestinais, fístulas e abscessos, cursa com múltiplas manifestações extraintestinais, das quais se destacam as hépato-biliares, dermatológicas, reumatológicas e oculares, sendo assim facilmente dedutível as implicações irrevogáveis que esta tem na qualidade de vida e sobrevida.

Atualmente, assiste-se um crescimento exponencial da sua incidência, sendo evidentes maiores prevalências no sexo feminino, alta classe socioeconómica e áreas urbanizadas.

Desta forma, nas últimas décadas, a DC foi alvo de múltiplos estudos, o que permitiu obter um vasto leque de conhecimentos, crucial para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas transcendentais.

O tratamento padrão da DC reside no controlo da sintomatologia, indução e manutenção da remissão por recurso a terapia anti-inflamatória, imunomoduladora, imunossupressora e biológica, contudo, ainda hoje não existe um método eficaz na evicção da recidiva clínica, uma vez que nenhum destes fármacos atua sobre a origem do

processo inflamatório. Assim, seja pela ausência de resposta, toxicidade do tratamento ou pela doença perianal subjacente não controlada, os doentes são submetidos a cirurgias agressivas, com múltiplos riscos e sequelas acoplados, podendo ainda estar contraindicada dependendo da localização e extensão das lesões.

Perante estas condicionantes, nos últimos anos, foram realizados vários estudos sobre a aplicação de células dendríticas tolerogénicas, hematopoiéticas e células tronco mesenquimais, sendo evidentes resultados auspiciosos, ainda que a amostra seja constituída por um número reduzido de doentes, o que inviabiliza a determinação de conclusões categóricas. De facto, os próximos anos serão cruciais para a fundamentação e consolidação de conhecimento relativos a esta nova abordagem, que poderão ser decisivos para a sua aplicação como método curativo da DC.

O principal objetivo desta dissertação reside na execução de uma revisão bibliográfica para sintetização e fundamentação das possíveis etiologias e patogénese da DC, salientando o facto de esta resultar da combinação de uma disbiose intestinal, imunidade inata modificada e perda de tolerância a antigénios comensais, em indivíduos geneticamente suscetíveis, sob a influência de fatores ambientais; clínica, complicações e suas implicações na qualidade de vida do doente; método terapêutico padrão e suas limitações, que poderão ser transpostas por uma nova abordagem, detalhadamente explicita neste trabalho, as células estaminais como potencial método terapêutico curativo.

Palavras-chave: Doença de Crohn, Epidemiologia, Etiologia, Patogénese, Células Estaminais

Abstract

Crohn's disease (CD) is a chronic inflammatory disease transmural, segmental and asymmetric gastrointestinal tract.

Despite numerous investigations, the etiology remains unknown, but are identified as potential causes the combination of intestinal dysbiosis, genetic and environmental factors, loss of tolerance to commensal antigens and changes in intestinal permeability in immune mechanisms. In fact, this situation determines excessive, altered immune response, culminating in chronic inflammation of the gastrointestinal tract.

This pathology in addition to the recurrent episodes of gastrointestinal symptoms, fistulae and abscesses, courses with multiple extra-intestinal manifestations, which we highlight the hepato-biliary, dermatologic, rheumatologic and ocular, so easily deductible irrevocable implications this has the quality of life and survival.

Currently, we are seeing an exponential growth in its incidence, with evident higher prevalence in women, high socio-economic class and urbanized areas.

In this way, in recent decades, the CD was multiple studies target, which allowed for a broad range of knowledge, crucial for the development of therapeutic approaches transcendent.

The standard CD treatment lies in the control of symptoms, induction and maintenance of remission for use of anti-inflammatory therapy, immunomodulatory, immunosuppressive and biological however, still there is no effective method for avoidance of clinical relapse, since none of these drugs acts on the origin of the inflammatory process. So is the lack of response, toxicity of the treatment or the underlying perianal disease not controlled, patients are subjected to aggressive surgeries with multiple risks and coupled sequelae, and may be contraindicated depending on the location and extent of the injuries.

Under these conditions, in recent years, several studies were conducted on the application of tolerogenic dendritic cells, hematopoietic and mesenchymal stem cells, with evident auspicious results, even if the sample is comprised of a small number of patients, which impedes the determination of categorical conclusions. In fact, the coming years will be crucial for the foundation and consolidation of knowledge regarding this new approach, which will be decisive for its application as a dressing of the CD method.

The main objective of this thesis lies in the execution of a literature review to summarize and justification of possible etiologies and pathogenesis of DC, highlighting the fact that this result from the combination of an intestinal dysbiosis, modified innate immunity and loss of tolerance to commensal antigens in individuals genetically susceptible, under the influence of environmental factors; clinical, complications and their implications for the quality of life of the patient; Standard therapeutic method and its limitations, which may be implemented by a new approach in this work explains in detail, stem cells as a potential curative therapeutic method.

Keywords: Crohn's disease, epidemiology, pathogenesis, stem cells.

Lista de Abreviaturas

AINE's – Anti-Inflamatórios Não Esteroides

ASC – Célula Estaminal derivada de Adipócitos

ASCA – Anticorpo Anti-Saccharomyces Cerevisiae

ASTIC – Autologous Stem Cell Transplantation International Crohn's Disease

BSBMT – Sociedade Britânica de Transplante de Sangue e de Medula óssea

CAA – Células Apresentadoras de Antígeno

CAM – Moléculas de Adesão Celular

CARD 15 – Proteína 15 de Domínio de Recrutamento da Caspase

CD – Células Dendríticas

CDAI – Índice de Atividade da Doença de Crohn

CEI – Células Epiteliais Intestinais

Células NK – Células Natural Killer

Células Tr – Células T reguladoras

CO – Contracetivos Orais

COX – Ciclooxigenase

CU – Colite Ulcerosa

DC – Doença de Crohn

DII – Doença Inflamatória Intestinal

DLG5 – Drosophila Long disc homologue 5 Gene

ECCO – Organização Europeia da Colite e Crohn

EMBT – Grupo Europeu de Transplantação de Medula e Sangue

HLA-DR – Antígeno de Leucócito Humano-Relacionado com antígeno D

HMGB-1 – High-Mobility Group Box 1

HSC – Células-Tronco Hematopoiéticas

IBDQ – Questionário da Doença Inflamatória Intestinal

IBD 1 a 9 – Doença Inflamatória Intestinal 1 a 9

IFN- γ – Interferão-Gama

IL 1, 1 β , 2, 6, 8, 10, 12, 13, 17, 23 – Interleucina 1, 1 β , 2, 6, 8, 10, 12, 13, 17, 23

IRAK – Cinase do Recetor de Interleucina

IV – Intravenoso

LLR – Repetição Rica em Leucina

LPS – Lipopolissacarídeos

MDP – Dipeptido de Muramilo

MLCK – Cadeia Leve da Miosina Quinase

MO – Medula Óssea

MSC – Células-Tronco Mesenquimais

MyD88 – Proteína de resposta à Diferenciação Mieloide 88

nAChR – Recetor Nicotínico de Acetilcolina

NF- κ B – Fator Nuclear kappa B

NOD 2 – Recetor de Domínio de Oligomerização de ligação Nucleotídea 2

OCTN – Transportador Orgânico de Cátions

PCR – Proteína C Reativa

RM – Ressonância Magnética

TGF- β – Fator Transformador do Crescimento Beta

TGF β 1 – Fator Transformador do Crescimento Beta 1

Th 0, 1, 2, 3, 17 – Células T helper 0, 1, 2, 3, 17

THSC – Transplante de células-tronco hematopoiéticas

TLR 2 – Recetor tipo Toll 2

TRAF 6 – Fator 6 associado ao Recetor do fator de Necrose Tumoral

RICK – Receptor-Interacting Serine/ Treonine Kinase

VS – Velocidade de Sedimentação de Eritrócitos

α -TNF – Fator de Necrose Tumoral Alfa

α 7- nAChR – Subunidade alfa 7 do Recetor Nicotínico de Acetilcolina

1. Introdução

1.1. Objetivos

O presente trabalho pretende esclarecer as vicissitudes associadas à doença de Crohn (DC), salientando as problemáticas mais atuais. Desta forma, os principais objetivos são os seguintes:

- Argumentação e fundamentação das possíveis etiologias da DC
- Salientar a importância da combinação dos fatores genéticos, ambientais, sistema imunitário, epitélio intestinal e microbiota na patogênese da DC
- Sintetização da clínica, complicações e suas implicações na qualidade de vida do doente
- Método terapêutico padrão e suas limitações
- Correlação dos mecanismos adjacentes ao desenvolvimento da DC com futuras abordagens terapêuticas, nomeadamente, terapia com células estaminais como potencial método curativo.

1.2. Conceitos e Definições

A DC é um processo inflamatório crónico transmural, segmentar, e assimétrico, do trato gastrointestinal ¹, que, tal como a colite ulcerativa (CU), é classificada nas “doenças inflamatórias intestinais” (DII). Esta pode envolver qualquer segmento do trato gastrointestinal (desde a boca até ao ânus) ², contudo afeta preferencialmente o íleo terminal ³.

Ainda que de etiologia desconhecida, são apontadas como potencial causas a combinação de fatores genéticos, ambientais, perda de tolerância a antígenos comensais e alterações na permeabilidade da parede intestinal, nos mecanismos imunitários e exclusão bacteriana ⁴.

Em um terço dos doentes é típico ostentar ulcerações aftoides, fístulas, fissuras, abcessos e estenose anal, principalmente naqueles em que há afeção do cólon ³. Concomitantemente são descritas manifestações extraintestinais, do qual se salientam as hépato-biliares, dermatológicas, reumatológicas e oculares ².

Ao contrário do que ocorre na maioria das patologias gastrointestinais, na DC a ressecção do segmento inflamado não é curativa, verificando-se constantes recorrências do processo inflamatório pós-cirurgia ². O impacto negativo sobre a qualidade de vida é ainda acrescido pela sua evolução errática, que determina um difícil controlo clínico e endoscópico.

2. Epidemiologia

De acordo com Lakatos (2006), a DC apresenta uma taxa de incidência mundial de 0,1-16/10⁵ habitantes, todavia esta apresenta uma grande variabilidade geográfica, constatando-se maiores taxas de incidência no Norte e Europa Ocidental e América do Norte, ao invés da América do Sul, África e Ásia que evidenciam as menores taxas ⁵. Desta forma, é reconhecido que a DC prevalece essencialmente nos países desenvolvidos, sendo a industrialização considerada o fator de risco potencial. Efetivamente, muitos consideram os fatores ambientais, os agentes causais desta variabilidade, contudo, dados recentes concluem que esta diferença está a tornar-se cada vez menos evidente, descrevendo taxas de incidência do Sul da Europa, Europa Oriental e Ásia análogas às do Norte da Europa e América do Norte, o que poderá estar dependente da adoção de um estilo de vida semelhante ao ocidental, nomeadamente, a dieta, sistemas governamentais, hábitos tabágicos, entre outras ⁵.

Assim, na América do Norte a prevalência da DC é de 37-246/10⁵ habitantes e a incidência de 2,2-14,3/10⁵ habitantes. Na Europa, a prevalência é de 3,9-7/10⁵ habitantes

e a incidência varia entre 0,7-9,8 /10⁵ habitantes ⁶. Em Portugal, a incidência não é conhecida, mas estima-se um valor de 4,2/10⁵ habitantes ⁷.

Atualmente, assiste-se a um acréscimo brutal dos valores de incidência de DC, sem causa comprovada, apesar de subsistirem algumas hipóteses causais, nomeadamente, que o desenvolvimento de novas formas de diagnóstico, particularmente, a cápsula endoscópica ⁸ e enteroscopia com duplo balão ⁹ permitiram diagnosticar inúmeros casos que antes constituíam falsos negativos, e ainda que, na Europa Oriental os doentes instituíram novos comportamentos na saúde, passando a recorrer aos serviços de saúde com maior frequência e perante sintomatologia ligeira. Ainda assim, acredita-se que este acréscimo é real e não apenas devido ao melhor diagnóstico e acesso aos cuidados de saúde, sendo tal sustentado, pelo aumento da prevalência de casos graves ⁵.

Relativamente à idade, a DC evidencia uma distribuição bimodal, apresentando o primeiro pico entre os 15-30 anos, e o segundo pico entre os 60-80 anos ⁶.

No que diz respeito ao género, verifica-se predominância do sexo feminino, podendo a relação variar desde 1:1 até 1:8 ³. Para além disso, assume existir uma variação na incidência racial e étnica, afirmando que existe uma maior afeção pela raça branca e etnia judaica.

Segundo estudos de Sonnenberg et al. (1990), existe uma maior incidência nas classes socioeconómicas elevadas e nas populações urbanas, e ainda admitem, um maior risco para DC em atividades interiores, ao oposto dos dinamismos ao ar livre. Efetivamente, tal é coerente com a distribuição geográfica que constata maior prevalência nos países nórdicos, países onde passam mais tempo no interior ¹².

Dos fatores de risco, destacam-se os hábitos tabágicos e a exposição a CO, nos quais decorre uma maior severidade da DC, evidenciada pelo acréscimo de exacerbações, aumento da dose de corticoides e imunossupressores para controlo da doença, maior

recurso a intervenções cirúrgicas, incremento das recorrências pós-cirúrgicas e elevação da taxa de mortalidade ⁶.

Existe ainda um padrão genético, verificando-se um risco 5 vezes superior para o desenvolvimento da patologia nos familiares de primeiro grau do doente ¹¹.

3. Etiologia e Patogénese

A DC apresenta etiologia desconhecida, contudo, vários autores revelam que esta tem subjacentes anormalidades genéticas que resultam numa resposta imune excessiva e alterada, desencadeada por múltiplos fatores ambientais, sob influência da microbiota comensal intestinal. Efetivamente, é a associação destes principais fatores que culmina no desequilíbrio do trato gastrointestinal, determinando uma inflamação crónica, com repercussões na qualidade de vida e sobrevida ¹².

3.1. Genética

Nos últimos anos, as técnicas de clonagem posicional e mapeamento das regiões de suscetibilidade ¹³, permitiram grandes avanços na compreensão da genética e identificação de múltiplos genes de suscetibilidade. De facto, a presença da mutação genética funciona como um fator de suscetibilidade e não como um preditor para o futuro desenvolvimento da patologia ¹².

O carácter poligénico da DC é também apoiado pelos estudos de agregação familiar, dado que concluíram a existência de um risco 5 vezes superior, em familiares de primeiro grau, para o desenvolvimento da DC.

Ainda assim, o principal contributo na evidência de uma etiologia genética adveio dos estudos de concordância em gémeos, constatando-se numa primeira análise sistemática e posteriormente por outros dois estudos, que a concordância em gémeos monozigóticos e dizigóticos é de 37,3% e 7%, respetivamente ^{14, 15}. Mais recentemente

Brant (2011), atualizou estes valores para 30,3% em gêmeos monozigóticos e 3,6% em dizigóticos ¹⁶.

De acordo com Ogura *et al.* (2001) e Economou *et al.* (2004), uma das principais mutações corresponde ao **gene NOD 2** (também designado por CARD15 ^{17,18}), dado que apresenta um papel primórdio na ativação da proteína NF-κB, um fator de transcrição envolvido nas vias inflamatórias e regulador da apoptose programada e proliferação ¹². Este foi mencionado pela primeira vez por Hugot *et al.* (1996), determinando o locus de suscetibilidade para a DC denominado **IBD 1**, localizado na região pericentromérica do cromossoma 16 (16q12) ¹⁹.

Efetivamente, outros genes têm sido descritos na literatura, todavia sem transpor o relevo do anterior. Estes encontram-se dispersos

pelos regiões dos cromossomas 1, 3, 5, 6, 12, 14, 16, 19, renomeados **IBD 1 a 9**, tal como demonstra a **Figura 1**, e estão associados a funções determinantes na imunidade inata, integridade da barreira epitelial, entre outras, tal como ilustrado na **Tabela 1**.

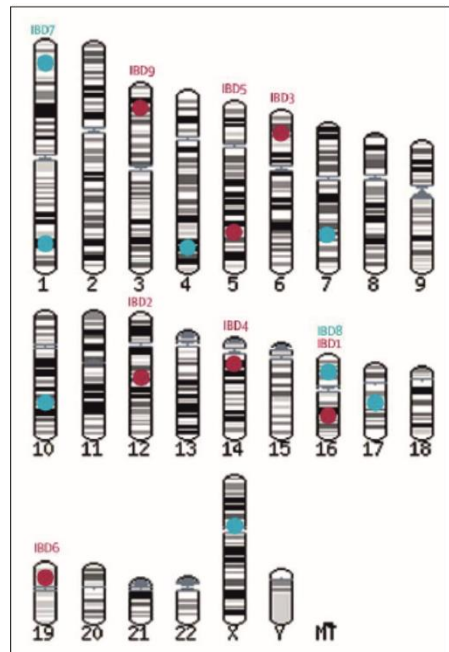


Figura 1. Cariótipo humano com doença inflamatória intestinal. Confirmadas e replicadas regiões de suscetibilidade representados por círculos vermelhos, outros por círculos azuis (Fonte: Baumgart & Sandborn, 2007).

Tabela 1. Genes de suscetibilidade da DC e suas respectivas localizações genómicas e funções.

Gene	Cromossoma	Função
OCTN 1 OCTN 2	5	Manutenção da integridade do epitélio intestinal ²²
DLG5	10	Manutenção da integridade e permeabilidade do epitélio intestinal ²⁰
ATG16L1	5	Papel no complexo de autofagia ²¹
TLR-4	9	Manutenção da função de barreira do epitélio e homeostasia intestinal (Identifica LPS de bactérias gram negativas) ²⁰
PPARG	3	Inibidor intracelular do NF-Kb ²²

que iniciam/perpetuam as respostas do hospedeiro, que podem variar entre anti-inflamatória ou, antagonicamente, pró-inflamatória ²⁴.

Adicionalmente, o NOD 2 pode inibir a sinalização normal, através de TLR-2, em células CD11+, nomeadamente, macrófagos e células dendríticas. Para além disso, na ausência da sinalização NOD 2, a ativação com peptidoglicanos determina um acréscimo da resposta NF- κ B, componente crítico para a transcrição de IL-12, o que permite concluir que o défice de NOD 2 culmina no aumento da produção de citocinas, que intensificam a inflamação intestinal ²⁵.

Por último, o NOD 2 é crucial na produção de defensinas pelas células de Paneth nas criptas de pequenas vilosidades intestinais, havendo inúmeros estudos que descrevem uma associação entre as células de Paneth e a DC ileal. De facto, estas são responsáveis pela produção de secreções antibacterianas, pois a sua propriedade antipática permite-lhes interagir e lisar membranas ²⁶, determinando um ambiente estéril e proteção das células estaminais das proximidades.

São de evidenciar, as defensinas humanas 5 e 6, pois apresentam elevada eficácia sobre o *S. aureus* ¹⁷ e potencial antivírico ²⁷, respetivamente.

Ainda que a componente genética seja uma etiologia sancionada da DC, é importante ter noção, que a concordância entre gémeos monozigóticos é de aproximadamente 30 %, o que permite concluir que, a única e exclusiva contribuição genética não é suficiente para manifestação da doença. Para além disso, o acréscimo da incidência constatado nas últimas décadas, não poderá ser exclusivamente justificado por alterações plausíveis da genética.

3.2. Resposta Imune

O conceito de autoimunidade foi descrito pela primeira vez na DC, num estudo de Broberger e Perlmann (1950), no qual encontraram anticorpos no soro dos doentes que reagiam de forma cruzada com células fetais humanas de cólon *in vitro* ²⁸.

A DC depende da alteração da resposta imune inata e adaptada, associada à perda de tolerância a bactérias comensais ¹². Efetivamente, a mucosa do intestino ostenta grande parte do tecido linfóide do corpo humano, que simultaneamente, é partilhado com uma diversa microbiota, na qual são descritas mais de 500 espécies de bactérias ²⁹.

3.2.1. Sistema Imunológico Intestinal Saudável

O Sistema imunitário do intestino é representado por uma rede complexa de células linfóides, não linfóides e fatores humorais.

Como a **Figura 3** apresenta, os antígenos luminiais são expostos a células apresentadoras de antígenos, tais como células epiteliais ou Th0, através dos complexos de histocompatibilidade II, o que culmina em co-estimuladores na ausência de inflamação, que podem suprimir ou induzir anergia das células T da mucosa ³⁰. Simultaneamente, as células B da mucosa secretam IgA, que reveste a mucosa do epitélio.

As células dendríticas, controlam a resposta imune adaptativa, determinando a diferenciação de células Th0 em células T efectoras e reguladoras, nomeadamente, Th1, Th2, Th17 e Tr, Th3, respetivamente, e ainda, a resposta imune inata, através da ativação das células NK.

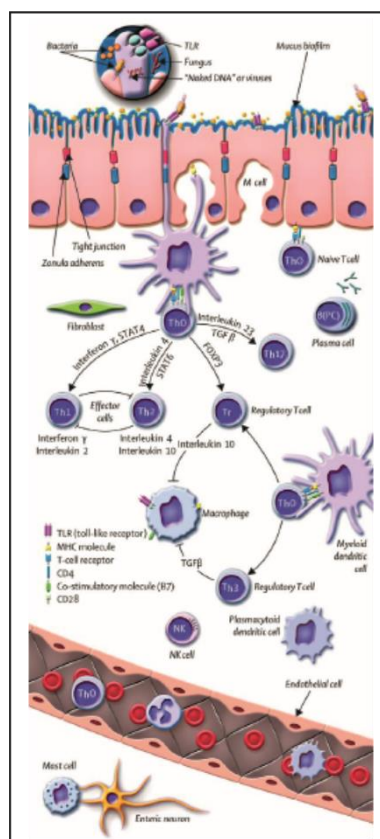


Figura 3. Sistema imunitário intestinal, em indivíduo saudável. (Fonte: Baumgart & Sandborn, 2007)

Efetivamente, a presença de agentes comensais associada à ausência de inflamação é definida pelo equilíbrio entre as populações efectoras e reguladoras, pois permite o controlo da rede de citocinas.

Existe ainda o contributo de macrófagos, granulócitos e mastócitos através de mecanismos inibitórios intracelulares que impedem a libertação de citocinas inflamatórias, quimiotaxia e mediadores que danificam os tecidos ²⁴.

Em relação à imunidade inata, vários estudos evidenciaram uma relação entre o aumento de macrófagos e de células dendríticas, com a elevada produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão e co estimuladores ³¹.

As moléculas de adesão celular (CAM) são fundamentais para a comunicação inter e intracelular e mediação após migração de células imunes ³². Desta forma, na fase ativa da DC, desempenham um papel crucial no recrutamento de leucócitos para a mucosa ³³, estando descrito em vários estudos uma expressão excessiva de CAM's nas áreas de inflamação.

Para além disso, perante a ativação das células dendríticas da mucosa, ocorre expressão superior de CD 40 e TLR, principalmente, TLR 2 e TLR 4, determinantes no reconhecimento de elementos bacterianos, com conseqüente acréscimo na produção de IL-6 e IL-12 ³⁴. Seguidamente, é iniciada a sinalização com NF- κ B, que culmina na produção de citocinas e fatores pró-inflamatórios, nomeadamente, IL- 1 β , TNF, IL-8, CD80 e moléculas de adesão, cujas expressões demonstraram estar aumentadas na DC ³¹.

Relativamente à imunidade adaptativa, a DC é um processo mediado predominantemente por Th1 e Th17, que determinam a ativação de IFN- γ através da produção da IL-12 ³⁵ e produção de IL-6, IL-23 e TGF- β através da produção de IL-17 ³⁶, respetivamente.

3.3. Fatores Ambientais

A DC apresenta maior prevalência na América e Europa do Norte ³⁸, o que sugere uma associação com o acesso e qualidade dos cuidados de saúde, industrialização, saneamento e higiene.

Efetivamente, foi constatado aumento da taxa de incidência nos imigrantes provenientes de regiões de baixa incidência para países desenvolvidos, acréscimo potencial da incidência durante a industrialização da China e Hong Kong ³⁹, e ainda, diversos estudos de grande impacto sobre a epidemiologia da DC nos países desenvolvidos, evidenciaram maiores números para as zonas urbanas, comparativamente às rurais ²⁴. De facto, é dedutível que o saneamento e higienização excessiva limitam a exposição a antigénios ambientais, o que complexifica a maturação e desenvolvimento da tolerância do sistema imunológico, determinando respostas imunitárias futuras inadequadas ²⁴.

Neste contexto, surgiu o conceito de “**ocidentalização**” do estilo de vida, no qual inúmeras práticas, tais como, o tabaco, uso generalizado de antibióticos e AINE’s, stress, infeção, dieta ¹², apendicectomia ⁴⁰ e aleitamento materno ²⁴ são indicados como fatores causais da transição do protagonismo das doenças infecciosas para doenças inflamatórias, no último século.

O **tabaco** determina cursos evolutivos de DC mais grave, pois está associado à formação de granulomas ⁴¹, fístulas e estenoses, maior taxa de recidiva e necessidade de tratamento cirúrgico, uma vez que parece aumentar o número de neutrófilos na mucosa inflamada ⁴². É ainda descrito como fator de risco para o desenvolvimento de DC o tabagismo passivo.

Relativamente aos **antibióticos**, vários estudos assumem uma interligação com a exposição de antibióticos no início da vida, todavia os mecanismos subjacentes ainda não se encontram esclarecidos ⁴³.

Em relação aos **AINES's**, de acordo com Berg et al. (2002), a associação de AINE's com inflamação, podem temporariamente inaugurar uma inflamação inespecífica, alterar a barreira da mucosa e ativar a resposta imune inata. Desta forma, ocorre uma maior absorção de antígenos bacterianos comensais que associado à suscetibilidade genética, incitam a inflamação mediada por células T ⁴⁴.

A **apendicectomia** aumenta o risco para DC, o que possivelmente está associado à manipulação de microrganismos ⁴⁰.

O **stress**, seja sob a forma, de depressão, acontecimentos de vida adversos ou stress crónico, parece estar associado ao aumento da taxa de recidivas ⁴⁵, uma vez que conduz à ativação ou intensificação da cascata inflamatória, através da interação direta com os sistemas neuro-imunológicos ²⁴.

De facto, na ausência de stress, o sistema nervoso através do nervo vago, exerce um papel inibitório, mediado pela via anticolinérgica, que reduz de forma eficaz a resposta inflamatória. Só recentemente, foi identificada a subunidade $\alpha 7$ - nAChR, elemento crucial para a inibição da ACh, através da libertação de α - TNF pelos macrófagos ⁴⁶.

A **infecção** foi associada à DC num estudo sueco, que constatou um aumento da taxa de incidência de aproximadamente 50 % nas pessoas que nasceram nos 3 meses das grandes epidemias de Sarampo na Suécia ⁴⁷. Efetivamente, é mencionada uma maior frequência de DII após infeções gastrointestinais, sendo evidente uma maior concentração bacteriana na mucosa dos doentes comparativamente aos indivíduos saudáveis, e ainda, uma correlação direta entre a gravidade e o número de bactérias da mucosa ²⁴. É de

salientar que o estudo de Davis et al. (2001), comprovou inexistência de ligação entre DC e as infecções por Sarampo, Caxumba e Rubéola⁴⁸.

A provável associação com **dieta**, foi descrita, pela primeira vez, há mais de 25 anos⁴⁹, e é apontada como fator responsável pelas distintas distribuições geográficas e aumento da incidência nas populações migrantes.

De facto, os antigénios alimentares correspondem ao principal antigénio luminal³⁸, e são relatados agentes causais de DC, o consumo excessivo de açúcar⁴⁹ e gorduras poli/monoinsaturadas⁵⁰. É importante denotar, que os estudos que pretendem corroborar esta associação são de difícil execução, uma vez que existe a possibilidade da dieta ser modificada de forma subconsciente, na tentativa de melhorar a sintomatologia gastrointestinal, antes de ser estabelecido o diagnóstico³⁸.

Relativamente a fatores protetores, são citados o consumo de fruta, legumes e fibras contudo, os estudos apresentam resultados divergente³⁸. O aleitamento materno é também referido como elemento protetor, dado conferir imunidade ao lactente enquanto o seu sistema imunitário se desenvolve⁵¹.

Por último, ainda que existam inúmeros estudos e evidencias epidemiológicas que apoiam a associação com fatores ambientais, é errôneo assumir um único fator ambiental como agente causal da DC.

3.4. Disfunção da Barreira Epitelial

Vários autores assumem a disfunção da barreira epitelial como agente causal da DC. A barreira epitelial é constituída por células epiteliais, interligadas por *tight junctions*, muco, IgA e defensinas, constituindo uma superfície vasta de absorção e exclusão de microrganismos patogénicos⁵². A presença local de ácidos (gástrico e biliar), enzimas pancreáticas e peristaltismo, garantem a integridade da barreira, que em caso de lesão, é rapidamente restaurada por mecanismos de restituição⁵³.

As *tight junctions* são constituídas por diversas proteínas, nomeadamente, ocludina, claudina e moléculas de adesão juncionais, sendo responsáveis pelo transporte seletivo de moléculas através da barreira epitelial ⁵² (**Figura 5**). Consequentemente, alterações nestas proteínas maximizam o transporte de microrganismos, o que permite a sua interação com células imunitárias.

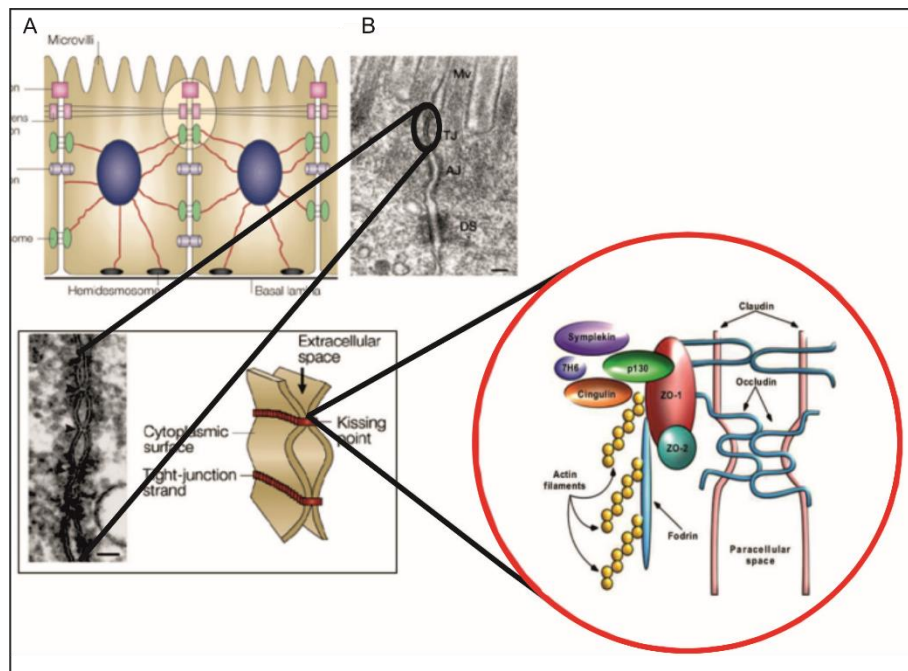


Figura 5. Arranjo macroscópico (A) e composição microscópica (B) de junções apertadas intercelulares. Os componentes estruturais das junções apertadas intercelulares podem ser classificadas como proteínas integrais de membrana (occludina, códons, e JAM), proteínas complexas juncionais (ZO-1, ZO-2, p130 ou ZO-3, 7H6, Symplekin, e cingulin), e citoesqueleto estrutural da célula (microtúbulos, filamentos intermediários e microfilamentos). (Fonte: Visser et al., 2009).

Os defeitos identificados nas *tight junctions* são mediados por processos neuro endócrinos e imunológicos verificando-se, que fatores inflamatórios, tais como a IL-13, α -TNF, aumentam a expressão da *tight junctions* específica, claudina-2 ⁵⁵, responsável pelo acréscimo direto da permeabilidade intestinal ⁵², e ainda, desencadeiam apoptose das CEI. Para além disso, de acordo com Kelsall B. L. (2008), as protéases libertadas pelos mastócitos, posterior à infeção por parasitas intestinais, podem degradar a Ocludina ou reorganizar a peri-junção F-actina, o que culmina no aumento da permeabilidade intestinal. Concomitantemente, o γ -INF associado ao α -TNF e etanol, ativam MLCK nas CEI, resultando na fosforilação da miosina e perturbação do citoesqueleto das *tight*

junctions. A proteína nuclear, HMGB-1, é secretada por células necróticas e activa células do sistema imune inato, na resposta a estudos microbianos ou pro-inflamatórios, determinando disfunção da barreira pelo seu efeito direto sobre as CEI⁵².

Efetivamente, seja de forma isolada ou associada a outros fatores, a disfunção da barreira epitelial do intestino é um provável mecanismo promotor de inflamação intestinal.

Desta forma, a disfunção é descrita por um aumento da permeabilidade intestinal, tanto nos doentes, como nos familiares de 1º grau⁵⁶, representando nestes, um fator de suscetibilidade para o desenvolvimento da inflamação e manifestação clínica, numa idade mais tardia⁵⁷. Esta consequência, deriva da permeabilidade anormal induzir o aumento de células B, CD45RO⁺, que potencia a absorção de antígenos, determinando uma incitação imunitária excessiva⁵⁸.

Evidências em animais corroboram esta hipótese, nomeadamente, a administração oral de Sulfato de Dextrano de Sódio ou inibidor da COX, Piroxicam, em ratinhos com déficit de IL-10, verificam ferimentos com perda de CEI, com evidente aumento da permeabilidade intestinal, prévia ao início da inflamação^{59,60}.

Por último, alterações nos recetores TLR, na flora comensal e mutações genéticas estão também associadas à integridade das CEI, encontrando-se as últimas discriminadas na **tabela 2** com o mecanismo de atuação subjacente.

Tabela 2. Mutações genéticas associadas à integridade das CEI e mecanismo de disfunção subjacente.

Gene	Mecanismos de disfunção da barreira epitelial
NOD2	Diminuição da produção de defensinas. IgA, IgG e muco
DLG5	Alteração da produção de proteínas relacionadas com a integridade da barreira ⁶¹
OCTN	Redução da oxidação dos ácidos gordos, com consequente aumento da entrada de catiões orgânicos para o interior da célula, promovendo lesão celular ⁶¹

3.5. Microbiota Intestinal e Tolerância Oral

A microbiota intestinal corresponde à comunidade de micróbios comensais presentes no intestino, benéficos para a homeostasia e saúde humana. Esta é constituída por aproximadamente 10^{14} bactérias e pode variar até 1000 espécies distintas, com predominância dos filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* e *Verrucomicrobia* ⁶².

Antes do nascimento, o trato gastrointestinal é desprovido de qualquer ocupação microbiana, verificando-se início da colonização e estabelecimento desta relação simbiótica, nos primeiros 2/3 anos de vida, sob influência materna, genética e ambiental ²⁴.

Ainda que de forma menos concreta, também são apontados como fatores influentes a amamentação materna vs. artificial ²⁴.

Durante a colonização o sistema imunitário da mucosa intestinal amadurece, o que determina o estabelecimento de tolerância oral, fenómeno particularmente importante, dado que a microbiota comensal assegura o efeito e integridade da barreira, impedindo a invasão por agentes patogénicos ²⁴. Assim, o sistema imunitário da mucosa terá capacidade de manter tolerância às bactérias comensais, todavia, concomitantemente detém aptidão para instituir resposta de defesa perante agentes patogénicos.

Vários autores defendem a perda da tolerância à microbiota comensal como factor causal da DC. Efetivamente, a tolerância é determinada pelas CEI, linfócitos B, Células Tr e CD responsáveis pela produção de IL-10, IFN- α/β e TGF- β ²².

De facto, estudos recentes mostram que as CD induzem uma resposta imunitária ou tolerância ao promoverem o desenvolvimento de células T efectoras ou células Tr, respetivamente, e dessa forma assegurar a homeostasia intestinal ⁶³. Concomitantemente, é auxiliada pela expressão de TLR, que possuem capacidade para reconhecer padrões

associados a microorganismos patogênicos ²⁴. Assim, é crucial o equilíbrio entre as células TCD4⁺ efectoras e as células Tr, nomeadamente, Th3, Tr1 ⁶³. Estas últimas, ao interagirem com determinadas agentes comensais, asseguram tolerância através de vários mecanismos:

- Estimulação da produção de IL-10 e TGF- β .
- Inibição da produção de IL inflamatórias pelos macrófagos.
- Redução da ativação das células Th1 e CAA.

Atualmente, é aceite que na DC existe um desequilíbrio entre estes dois tipos de células, o que resulta numa resposta inadequada do sistema imunitário da mucosa intestinal e conseqüentemente perda da tolerância. A perturbação no reconhecimento do antígeno comensal e seu processamento pelas CAA, determina a ativação de células Th1, e, ainda que não provado, Th17, o que culmina numa resposta inflamatória excessiva⁶⁴. A desregulação nas CD pode ainda contribuir para a ativação repetida das células T memória ou por falha central (Timo) induzir inabilidade para excluir populações de células T reativas, e desta forma, incitar ausência de tolerância periférica e conseqüente perpetuação da inflamação ⁶⁵. Estudos recentes, ainda sugerem que o TGF- β assume um papel crucial no equilíbrio entre as Células Th17 e Tr ⁶⁶.

Polimorfismos no gene NOD2/CARD15 reconhecem erroneamente a flora, estimulando a ativação de NF- κ B, que associados às citocinas inflamatórias determinam redução da tolerância oral.

Em conclusão, o papel da microbiota intestinal na patogênese da DC ainda permanece por esclarecer, todavia, seja a sua composição alterada devido à doença ou uma conseqüência do estado inflamatório, é irrevogável, a sua participação na patologia ¹². Possivelmente, a DC resulta da combinação de uma disbiose intestinal, imunidade

inata defeituosa e perda de tolerância aos agentes comensais, em indivíduos geneticamente suscetíveis, sob a influência de fatores ambientais.

4. Células Estaminais

Nas últimas décadas, a DC foi alvo de múltiplos estudos, o que permitiu obter um leque de conhecimentos, crucial para o avanço no tratamento e aquisição de objetivos terapêuticos transcendentais.

Atualmente, os objetivos do tratamento da DC assentam em obter remissão completa, nomeadamente, controlo da sintomatologia e ausência de lesões endoscópicas⁶⁷, restauração da função intestinal, evicção de dano intestinal, redução da incapacidade a longo prazo e melhorar a qualidade de vida do doente⁶⁸.

A atividade clínica da DC é avaliada segundo o Índice de Atividade da Doença de Crohn (CDAI) e define DC clinicamente inativa, um CDAI <150⁶⁹. No entanto, de acordo com Oyama et al. (2005), este índice apresenta algumas falhas, nomeadamente, favorecer predominantemente a doença colónica, elevada dependência de fatores clínicos subjetivos, atribuição da mesma significância a fissuras e fístulas anais, descurando, fatores relevantes, tais como, presença de lesões endoscópicas, níveis de PCR, VS e Albumina, todavia, ainda assim, é o único utilizado nos estudos atuais⁷⁰.

Relativamente ao tratamento da DC, inicialmente o objetivo residia no controlo da sintomatologia, evoluindo posteriormente, para a indução e manutenção da remissão da doença, contudo, ainda hoje não existe um tratamento eficaz na evicção da recidiva clínica. Assim, o tratamento padrão baseia-se em 5-ASA (Mesalazina, Sulfassalazina, Balsalazide), Corticosteroides (Budesonido, Prednisolona, Hidrocortisona), Tiopurinas (Azatioprina, 6-Mercaptopurina), Imunossuppressores (Metotrexato, Ciclosporinas) e anti-TNF (Infliximab, Adalimumab).

Apesar da diversidade, nenhum destes fármacos atua sobre a origem do processo inflamatório ⁷¹, ou seja, nenhum dos tratamentos é curativo, condição que dificulta a obtenção dos objetivos terapêuticos propostos.

A DC é uma patologia heterogénica, que pode variar entre uma apresentação leve, com indicação para tratamento sintomático, até uma apresentação fulminante, na qual a terapêutica com imunossuppressores potentes e cirurgia podem não ser suficientes ⁷⁰. De facto, apesar dos esforços na otimização dos fármacos, a realidade atual está longe do ideal, verificando-se que 1/3 dos doentes não responde à terapia anti-TNF ⁷², determinando otimização ou mudança da terapêutica instituída ⁷³ e 10 % não tolera ou é não responsivo primário a qualquer fármaco ⁶⁸.

De acordo com Peyrin-Biroulet et al. (2010), metade dos doentes seja pela ausência de resposta ⁷⁴, toxicidade do tratamento ou pela doença perianal subsequente dificilmente controlada com a terapêutica actual ^{75, 76}, são submetidos a cirurgia, com eventual risco de Síndrome de Intestino Curto, nutrição parentérica e colostomia que detêm alto impacto psicológico ^{77, 78}. No entanto, nos casos refratários em que a cirurgia é a única opção, esta pode ser contraindicada pela localização ou extensão das lesões, ficando estes doentes sem opções terapêuticas ⁶⁸.

Adicionalmente, nos últimos anos, é evidente um número crescente de casos de DC na população pediátrica, nos quais é relatado uma evolução clínica com múltiplas ressecções intestinais e falha dos tratamentos atuais, o que determina um futuro incerto para estes doentes ⁶⁸.

Na DC grave, os doentes experienciam quadros recorrentes de vômitos, anorexia, diarreia, dor abdominal, fístulas ⁷⁰, abscessos, problemas cutâneos e hepáticos, múltiplas cirurgias ¹¹², sendo assim evidente o impacto negativo que esta confere na qualidade de vida, ambiente profissional e pessoal do doente ^{79, 80}.

Perante estas conjunturas, nos últimos anos, foram elaborados vários estudos sobre o uso de terapias com células dendríticas tolerogénicas⁸¹, hematopoiética e células tronco mesenquimais (MSC)⁶⁸. Estas últimas apresentam capacidades que lhes permitem controlar o processo inflamatório, cicatrizar lesões intestinais, restaurar a integridade da barreira epitelial intestinal⁶⁸ e prevenir a fibrose⁸². Inicialmente, este potencial foi atribuído à sua capacidade de diferenciação em múltiplas linhagens, no entanto, estudos recentes, relatam que os seus efeitos biológicos são mediados por mecanismos parácrinos, no qual estão envolvidas citoquinas, quimiocinas e fatores de crescimento^{83,84}, podendo ainda induzir e estimular células progenitoras do hospedeiro para melhorar o processo regenerativo. Assim, o transplante de células-tronco hematopoiéticas (THSC) permite uma modelação/supressão imune, na qual o transplante condicionado determina a eliminação de células imunológicas que conduzem a alterações fisiopatológicas, e, concomitantemente as células-tronco hematopoiéticas (HSC) restauram um novo sistema imunitário analogamente ao que ocorre no desenvolvimento fetal⁷⁰, de modo a estabelecer tolerância a antigénios inofensivos⁸⁵.

Efetivamente, o TCTH por recurso a quimioterapia elimina linfócitos T Auto reativos e células de memória, efectores de desregulação imune da DC⁸⁶, induzindo tolerância ao antigénio a longo prazo⁶⁸. Vários estudos, ainda demonstram que regeneração do sistema imunitário pode advir da reativação da atividade e indução de novas células Treg do Timo^{87,88}.

Os potenciais candidatos para TCTH correspondem aos indivíduos refratários aos tratamentos atuais com CDAI > 250⁷¹.

4.1. Definição e Tipos de Células Estaminais

As células estaminais são por definição células primordiais indiferenciadas, ou seja, sem especialização funcional, com propriedades de autorrenovação e divisão em

múltiplas linhagens celulares, em função das condições ambientais ⁶⁸. De acordo com a Sociedade Internacional de Terapia Celular, para classificar uma MSC é necessário que esta cumpra os requisitos mínimos, isto é, ser aderente ao plástico sob condições padrão, expressar CD105, CD73, CD90, não exprimir CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a ou CD19 e HLA-DR, diferenciar-se em osteoblastos, adipócitos e condroblastos *in vitro*.

As células estaminais podem ser classificadas de acordo com a sua origem e função, tal como elucidada a **Figura 6**.

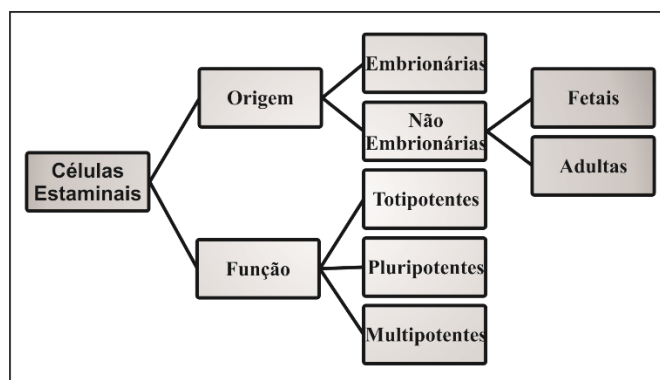


Figura 6. Classificação das células estaminais segundo a sua origem e função.

As **Células Tronco Embrionárias** são células pluripotentes com origem em embriões, com capacidade para produzir todos os tipos de células derivados das três camadas embrionárias *in vitro* e *in vivo* ⁶⁸.

As **Células Tronco Adultas Multipotentes** podem ser obtidas em diferentes tecidos, nomeadamente, medula óssea, tecido adiposo, cordão umbilical e placenta. Apresentam capacidade de diferenciação limitada, dando origem apenas a células da sua linhagem embrionária. Neste grupo encontram-se as HSC e as MSC ⁶⁸.

As **Células Tronco Pluripotentes** têm capacidade de diferenciação nas células dos três folhetos embrionários, de modo que não conseguem produzir tecidos extraembrionários. Takahashi & Yamanaka (2006), desenvolveram uma técnica revolucionária de reprogramação genética, na qual introduziram fatores de reprogramação (OCT-4, KLF-4, SOX-2, c-MYC, NANOG, LIN28) em células somáticas

de camandugos, criando as **Células Tronco Pluripotentes Induzidas** ⁶⁹. Estas apresentam características e diferenciação fenotípica igual à das Células Estaminais Pluripotentes, contudo, não refletem problemas éticos, dado não terem origem embrionária ⁶⁸.

Atualmente, existem 2 tipos de terapias com células estaminais para o tratamento da DC, a terapia com HSC e com MSC ⁶⁸.

4.2. Terapia com Células Estaminais Hematopoiéticas

As HSC são células imaturas que se encontram na medula óssea, no sangue e no cordão umbilical, e podem-se diferenciar nas células que pertencem às linhagens de células hematológicas. O benefício na DC foi evidente pela primeira vez, em 1993, aquando a utilização do THSC no tratamento de um linfoma não-Hodgkin, em doente com DC concomitante ⁸⁹. Desta forma, seguiram-se múltiplos estudos em animais ⁹⁰, e ainda foi evidente melhoria clínica nos doentes com DC submetidos a THSC por doenças malignas ^{91,92}. A **tabela 3** esclarece os tipos e mecanismos de THSC.

Tabela 3. Tipos e mecanismos de THSC.

Transplante Autólogo	Eliminação de linfócitos T reactivos e reconstituição de um novo sistema imunológico com linfócitos naive mais tolerogênicos, todavia é mantida a predisposição genética.
Transplante Alogénico	Substituição do sistema imunitário do doente pelo do dador, corrigindo a predisposição genética do doente, contudo apresenta elevada morbilidade.

De acordo com Martínez-Montiel et al. (2014) ⁶⁸, na DC o THSC autólogo é realizado segundo o protocolo aplicado no tratamento de malignidades hematológicas. O primeiro passo reside na mobilização para estimulação e libertação de células-tronco da MO para o sangue periférico, recorrendo na maioria dos casos, à ciclofosfamida 1,5-2 g/m² e FEC-G 10 µg/kg por dia ^{70,93,94}. De facto, em 95% dos casos as células estaminais

são obtidas através do sangue periférico. Posteriormente, as células tronco são recolhidas por aférese e crio preservadas até o transplante ser realizado ⁶⁸.

Em alguns centros, estas células são previamente submetidas a processos de purificação, onde ocorre a seleção de células CD34+ ou eliminação de células CD52+, CD3+, CD19+ e CD20+ ⁷⁰.

Entretanto, procede-se a fase de condicionamento que determina a exclusão de células T Auto reativas por recurso a ciclofosfamida e ao antitimócito de imunoglobulina ⁹⁴ e por fim a infusão de células hematopoiéticas.

No caso dos esquemas mieloablativos, a linfoablação pode ocorrer sem destruição irreversível das células hematopoiéticas da MO e a função da MO ser recuperada sem a infusão de HSC, no entanto, estes esquemas estão associadas a altas taxas de morbidade e mortalidade, de modo que a reinfusão é procedida com o intuito de reduzir o tempo de aplasia medular ⁶⁸.

O transplante alogénico foi usado pela primeira vez em 2009, num doente com mutações nos genes IL10RA e IL10B, responsáveis pela codificação das proteínas ILR10R1 e ILR102, presentes no recetor da IL-10, com manifestação precoce da patologia, nomeadamente, proctite aos 3 meses de idade e posterior doença perianal grave refratária ao tratamento, no qual foi evidente remissão da DC, após o transplante ⁹⁵.

Com exceção do caso anterior, os resultados da literatura remetem a casos de DC associada a doença neoplásica, cuja evolução modificou após o transplante de células estaminais.

4.2.1. Estudos Literários de TCHC Autólogo na DC

Dez anos após ser relatado o primeiro caso de THSC Autólogo na DC, o grupo de Chicago publicou uma série de doentes com DC submetidos a transplante como tratamento primário para a doença inflamatória ⁷¹, cujos resultados foram descritos numa

publicação posterior. A amostra era constituída por 12 doentes com DC com CDAI entre 250-450, refratários ao tratamento farmacológico, incluindo o Infiximab, verificando-se que após o THSC Autólogo, 11 doentes apresentaram remissão, ou seja, CDAI <150, com média de follow-up de 18,5 meses ⁷⁰.

Oyama et al. (2005) descreve um estudo no qual 12 doentes com DC ativa, com menos de 60 anos e CDAI entre 250-400 (mediana 291) foram sujeitos a THSC Autólogo. Destes, 11 obtiveram remissão sustentada com CDAI <150, com recidiva de apenas um doente, 15 meses após o transplante ⁷⁰. No entanto, neste estudo foi sugerido, que a melhoria clínica se deve não ao THSC Autólogo, mas sim, à quimioterapia a que o doente é sujeito. Nesse sentido, a ASTIC, patrocinada pela ECCO e EMBT, realizou um estudo randomizado, no qual um grupo foi submetido a quimioterapia com G-CSF e TCHC Autólogo em 30 dias, e o outro sujeito a quimioterapia com G-CSF e THSC Autólogo após 13 meses, nos quais, os resultados preliminares apresentados em 2013, descrevem uma melhoria endoscópicas das lesões após o transplante ⁹⁶.

Em 2008, Cassinotti et al. publica os resultados de 4 doentes submetidos a THSC Autólogo, nos quais 3 apresentaram remissão clínica e endoscópica em seguimento de 16,5 meses, todavia refere agravamento do quadro em 75 % da amostra no período entre a colheita e a infusão das células estaminais ⁹³.

De seguida Burt et al. (2010), realizaram um estudo com 24 doentes, no qual foi obtida remissão em todos os elementos ⁹⁷. No follow-up, a percentagem de doentes em remissão sem necessidade de tratamento para a DC está representada na **tabela 4**.

Tabela 4. Doentes em remissão sem necessidade de tratamento complementar após transplante.

	1 ° Ano	2 ° Ano	3 ° Ano	4 ° Ano	5 ° Ano
Taxa de Remissão	91 %	63 %	57 %	39 %	19 %

Sem ter em conta a medicação realizada, a remissão em 5 anos foi obtida em 70-80 % dos doentes, estando 80 % livre de corticoide cada ano, nos 5 anos após o transplante⁹⁷.

Em 2011, Hommes et al., publica um estudo no qual 3 doentes com DC refratária grave de longa duração, com pouco interesse nas alternativas cirúrgicas por elevado risco de Síndrome do Intestino Curto e possível Ileostomia definitiva foram submetidos a THSC. Após 62 meses, os 2 que realizaram Transplante completo estão em remissão sob terapêutica imunossupressora à 5 e 6 anos, e o doente que realizou mobilização de células tronco obteve remissão clínica sem terapêutica associada durante mais de 2 anos⁹⁸.

Nesse mesmo ano, Burt et al., executaram THSC Autólogo em 12 doentes com DC e CDAI > 150. Os resultados do seguimento a longo prazo foram recentemente publicados verificando-se taxas de sobrevida livre de recidiva clínica de 63 % e 36%, em 3 e 5 anos, respetivamente. Ainda concluíram taxas de sobrevida livre de recidiva clínica (CDAI < 150), corticoterapia ou outra medicação, 5 anos após transplante, de 70%, 80% e 60%, respetivamente⁹⁷.

Em 2012, Hasselblatt et al, descreve que 56 % da sua amostra obteve cura das lesões endoscópicas após o THSC Autólogo⁹⁹.

4.2.2. Estudos Literários de THSC Alogénico na DC

Lopez-Cubero et al. (1998), observou que após o THSC Alogénico em 6 doentes que manifestavam simultaneamente leucemia, 1 faleceu por sépsis 3 meses após a intervenção e dos restantes 5, 4 obtiveram remissão clínica durante um período de 54 - 183 meses. É ainda de referir, que 50 % dos doentes com Colangite Esclerosante Primária revelaram melhores níveis de fosfatase alcalina¹⁰⁰.

De seguida, Ditschkowski et al. (2003), publicou um estudo com 11 doentes com DII, 7 com DC e 4 com CU, submetidos ao THSC Alogénico por apresentarem

concomitantemente doenças hematológicas malignas. Destes, um doente faleceu por septicemia e os restantes encontram-se em remissão da doença neoplásica e sem recaída da DII, 34 meses após o transplante ¹⁰¹.

Atualmente, ainda que apoiado por alguns estudos, o THSC Alogénico não é recomendado no tratamento da DC, exceto em casos seletivos, tal como a presença de mutações no gene da IL-10 ⁶⁸.

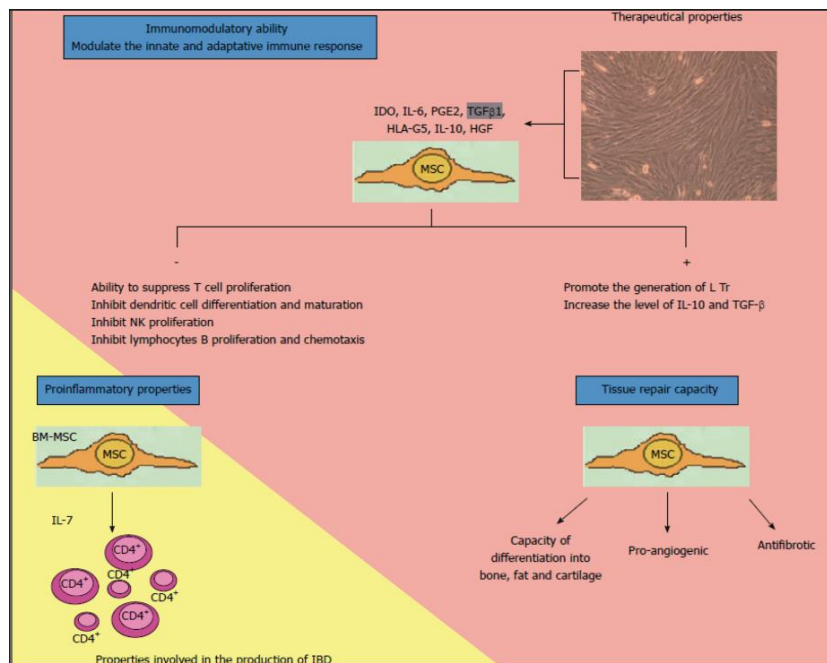
4.3. Terapia com Células Estaminais Mesenquimais

As MSC podem ser obtidas a partir da MO, tecido adiposo e cordão umbilical, sendo a MO o local mais usado, ainda que a sua prevalência seja reduzida (0,001%-0,01%), de difícil extração, com riscos para o doador e ainda com perda progressiva da capacidade de diferenciação em idades mais avançadas ⁶⁸.

Desta forma, perante a necessidade crescente de uma fonte alternativa, a obtenção de MSC por lipoaspiração tem aumentado e Melief et al. (2013), descreve que, ainda que a sua função imunomoduladora seja similar, o facto de estas serem produzidas no tecido adiposo determina uma distinta secreção de citocina, que potencia a sua ação quando comparadas com as MSC obtidas na MO ¹⁰². As MSC foram usadas pela primeira vez num doente com DC e leucemia linfóide aguda refratária ao tratamento, mantendo-se livre de lesões endoscópicas durante um ano ¹⁰³.

Tal como ilustra a **figura 7**, estas produzem um conjunto de fatores imunomoduladores, nomeadamente, indoleamina, 2-3-dioxigenase, IL-6, IL-10, prostaglandina E2, TGF- β 1, heme oxigenase-1 e HLA-G5 ¹⁰². Através da produção de IL-10 e IL-6 é inibida a diferenciação dos macrófagos e monócitos em direção às células dendríticas ^{104, 105} e ainda as células NK, conduzindo à apoptose de células polimorfo nucleares e células T citotóxicas e produção de células T reguladoras ¹⁰⁶. Simultaneamente, as PGE2 inibem a produção de IL-2 e a proliferação de células T, com

a estimulação da produção de células T auxiliares ¹⁰⁷. Desta forma, toda a conjuntura inibe a imunidade inata.



4.3.1. Terapia Sistêmica com MSC

A administração sistêmica de MSC é usada para controlo da DII, dadas as suas propriedades reparadoras e modeladoras do sistema imunológico ⁶⁸, e nesse sentido, nos últimos anos foram publicados alguns estudos.

Onken et al. (2006) publica um estudo no qual as MSC foram obtidas da MO de indivíduos saudáveis e usadas em 10 doentes com DC ativa, com CDAI ≥ 220 , não responsiva a corticoides, imunomoduladores e terapêutica biológica. Os doentes foram aleatoriamente distribuídos por 2 grupos, recebendo 8 milhões de MSC's/Kg e o outro 2 milhões de MSC's/Kg em 2 doses IV, com uma semana de intervalo. Após 4 semanas, verificou-se redução do score CDAI em ≥ 100 pontos e melhoria das pontuações no IBDQ em ambos, sendo as mesmas superiores no grupo que recebeu alta dose, contudo esta diferença não foi estatisticamente obtida ¹⁰⁸.

Posteriormente, Liang et al. (2012), descreve um estudo no qual as MSC obtidas em 3 e 4 casos, da MO de indivíduos saudáveis e do cordão umbilical, respetivamente. Foram aplicadas em 7 doentes com DII (4 com DC e 3 com CU), dose única de 1 milhão de MSC's/Kg por via IV. Nestes, 5 doentes obtiveram remissão e 2 destes há mais de 24 meses. Observou-se melhoria dos índices endoscópicos (diminuição da extensão da DII e da intensidade da infiltração linfoide) em 50 % dos doentes com DC e 1/3 dos doentes com CU ¹⁰⁹.

Ainda que os resultados sejam auspiciosos, o número de doentes tratados é ainda bastante diminuto, as doses e esquemas terapêuticos variáveis, o que impossibilita a determinação de conclusões fundamentadas.

4.3.2. Terapia Local com MSC

A aplicação local com MSC's é usada nas fístulas perianais presentes na DC e estas são obtidas a partir de MO ou de tecido adiposo. O mecanismo de base é ainda pouco conhecido, porém a hipótese mais aceite baseia-se no controlo local e sistémico das vias inflamatórias através da supressão da proliferação de linfócitos ativados, o que lhes confere propriedades reparadoras, determinando a cicatrização da fístula ⁶⁸.

A primeira experiência remota ao trabalho de García-Olmo et al. (2003), na qual a injeção de ASC's numa fístula retovaginal de um doente com DC, determinou o seu encerramento ¹¹⁰.

Ainda que com poucos conhecimentos sobre o tema, vários estudos têm sido realizados nos últimos anos.

García-Olmo et al. (2005), realizou um estudo por 3 fases. Na fase I, foram aplicadas ASC's em 8 fístula e foi evidente re-epitelização do orifício externo da fístula. Efetivamente, em 75% dos doentes ocorreu encerramento completo da fístula e em 25%

redução da supuração, após 8 semanas. As biopsias após 7 e 12 meses realizadas em 2 doentes, não evidenciaram qualquer transformação displásica ¹¹¹.

Em 2009, procede-se a fase II, na qual 35 doentes com fistulas criptogénicas, das quais 14 associadas a DC, foram randomizados em 2 grupos, nos quais um recebe 20 milhões de ASC's e o outro cola de fibrina. As avaliações são feitas após 8 semanas e 1 ano, de modo a permitir instituir uma segunda dose de 40 milhões de ASC nos casos em que não há resposta à terapia, após 8 semanas. Na primeira avaliação foram obtidos encerramento do orifício externo e ausência de supuração em 46% dos doentes tratados com ASC's e em apenas 8% nos não tratados. Após nova dose, confirmou-se encerramento da fístula em 71% dos doentes tratados com ASC's e apenas 16% do grupo oposto. Eficácia similar para fistulas criptoglandulares e associadas a DC, porem não foram apresentados dados estatísticos ¹¹².

Na fase III, publicada em 2012, por Herreros et al., 200 indivíduos com fístulas criptoglandulares foram divididos no *Grupo A*- 20 milhões de ACS, *Grupo B*- 20 milhões de ASC com fibrina cola e *Grupo C*- Placebo, com possibilidade de segunda dose de 40 milhões de ASC na 12ª semana.

O encerramento da fistula obtido na 12ª semana encontra-se na **tabela 5**.

Tabela 5. Encerramento da fistula obtido na 12ª semana.

Grupo A	Grupo B	Grupo C
26,5 %	38,3 %	15,3 %

P = 0,01

A segunda dose foi administrada em 61,5% dos doentes, estando os resultados apresentados na **tabela 6** ¹¹³.

Tabela 6. Encerramento da fistula obtido após a segunda dose de 40 milhões de ASC.

Grupo A	Grupo B	Grupo C
39,1 %	43,3 %	37,3 %

P = 0,79

Ciccocioppo et al. (2011), descreve um estudo realizado em 10 doentes com DC, 9 com fístulas no complexo perianal e 1 com múltiplas fístulas entero-cutaneas. Foram injetadas MSC's obtidas de MO, no canal fistular, semanalmente, num total de 4 doses. Constatou-se remissão em 7/10 doentes, evidenciando os restantes 3, uma melhoria notável na doença perianal e na classificação CDAI, resultados corroborados pelas imagens endoscópicas e RM ¹¹⁴.

Por último, De la Portilla et al. (2013), realizou um estudo em 24 doentes com fístulas perianais no qual foram submetidos a uma dose de 20 milhões de ASC, seguida de uma segunda dose de 40 milhões de ASC naqueles em que não ocorreu encerramento até à 12ª semana. Dos 24, 16 completaram o estudo, verificando-se que 69,2% obteve redução da supuração de ≥ 1 fístula, 56,3% encerramento dos trajetos fistulosos tratados e 30% encerramento de todas as fístulas, sendo estes confirmados com recurso à RM ¹¹⁵.

Atualmente está em desenvolvimento um estudo da aplicabilidade de ASC no tratamento de fístulas complexas em pacientes com DC, que irá facultar informações cruciais e sincronicamente poderá ser o elemento chave para a introdução comercial de um futuro tratamento ⁶⁸.

4.4. Avaliação Pós-Transplante

Os elementos de avaliação incluem CDAI, IBDQ, Colonoscopia, Radiografias do intestino, peso corporal e parâmetros analíticos, nomeadamente, VS, PCR, albumina e ASCA⁷¹, sendo estes variáveis em função do que é pertinente para cada estudo.

4.5. Desvantagens da Terapia com Células Estaminais

Recentemente, o uso de células estaminais embrionárias e pluripotentes foi associado ao desenvolvimento de teratomas pós transplante e ainda foi postulado o problema da produção de células indiferenciadas durante a divisão celular impossíveis de eliminar¹¹⁶. Para além disso, foi também descrito um possível risco de infeção bacteriana com o transplante de THSC obtidas a partir do cordão umbilical¹¹⁷.

4.6. Segurança da Terapia com Células Estaminais

A segurança geral do transplante no tratamento de doenças autoimunes foi avaliada e publicada recentemente pelo EMBT e BSBMT⁶⁸.

Efetivamente, o EMBT, avaliou 900 doentes submetidos a transplante autólogo entre 1996-2007 e concluiu uma taxa de sobrevida de 85% em 5 anos e sem recidiva clínica em 43%. Relativamente à mortalidade, esta varia com a experiência do centro ($P < 0,03$), idade inferior a 35 anos ($P < 0,004$), transplante após 2000 ($P < 0,0015$) e tipo de doença autoimune ($P < 0,0007$)¹¹⁸.

Os resultados partilhados pelo BSBMT, têm por base um estudo de 69 doentes submetidos a 70 transplantes (55 autólogos e 15 alogénicos) realizados entre 1997 e 2009 e concluíram taxas de sobrevivências e livres de doença pós transplante significativas, tal como ilustrado na **tabela 7**.

Tabela 7. Taxas de sobrevivência e livre de doença após transplante, de acordo com o estudo do BSBMT.

	1º Ano		5º Ano	
	Taxa de Sobrevivência	Taxa Livre Doença	Taxa de Sobrevivência	Taxa Livre Doença
Transplante Autólogo	85 %	51 %	78 %	33 %
Transplante Alogénico	87 %	80 %	65 %	65 %

A infecção foi apontada como principal causa de morte, não diferindo nos diferentes grupos. É de salientar a estreita relação entre a idade e a sobrevivência, demonstrando valores de sobrevivência próximos de 95% após 5 anos, em doentes entre os 18 e os 39 anos ⁶⁸.

4.7. Recidiva Pós-Tranplante

No transplante autólogo ainda que ocorra reconstituição de um novo sistema imunológico, os fatores genéticos mantêm-se inalterados, o que possibilita a recorrência da DC, ao contrário do que ocorre no transplante alogénico. Ainda assim, a aplicação deste último, é ainda bastante controversa dada a elevada taxa de mortalidade e complicações associadas.

4.8. Condições dos Locais para realizarem Transplante de Células Estaminais

Este tipo de terapia é apenas facultado por centros especializados, no qual é realizada uma correta triagem e estão disponíveis tratamentos para as complicações da doença e do transplante ⁶⁸.

5. Considerações Finais

A DC é uma doença inflamatória crónica do trato gastrointestinal, cuja incidência se encontra em potencial crescimento e associada a números crescentes de casos graves.

Apesar dos inúmeros estudos relativos à etiopatogenia da DC, esta permanece desconhecida, todavia é aceite que a combinação de fatores genéticos, ambientais, perda da tolerância a antigénios comensais, alterações da permeabilidade do epitélio intestinal, entre outras, culmina numa resposta inflamatória crónica e ativação contínua e excessiva das respostas imunitárias efectoras, determinando quadros recorrentes de sintomatologia gastrointestinal que múltiplas vezes se encontram associados a manifestações extraintestinais.

Ainda assim, estas investigações permitiram grandes avanços na consolidação de conhecimentos sobre a patogenia, crucial para a fundamentação e desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, de modo a transpor a doença refratária ou definir-se como tratamento alternativo em caso de toxicidade determinada pelo tratamento padrão, doença perianal subjacente não controlada e elevado risco ou contra-indicação cirúrgica.

Desta forma, recentemente, foram desenvolvidos estudos sobre a aplicação de células dendríticas tolerogénicas, hematopoiéticas e células tronco mesenquimais no tratamento da DC, nos quais são evidentes resultados altamente encorajadores e promissores, contudo o número de doentes submetidos a transplante de células estaminais por DC é ainda bastante reduzido, o que inviabiliza a determinação de conclusões definitivas. Efetivamente, os mecanismos e duração subjacente à remissão clínica e endoscópica pós-transplante ainda permanecem incertos, no entanto é razoável aceitar a sua prática em doente com DC grave refratários à terapia padrão e previsível aumento da morbi-mortalidade, pois o risco-benefício do transplante parece ser justificado.

Nos próximos anos, os tratamentos com células mesenquimais e hematopoiéticas serão alvo de investigação, sendo essa decisiva para a sua aplicação como tratamento potencialmente curativo da DC.

De facto, o bem-estar do doente depende cada vez mais de uma abordagem multidisciplinar, sendo crucial a interligação de múltiplas ciências, saberes e práticas, que embora ainda desconhecidas, poderão ser a chave de muitos enigmas actuais.

Referências Bibliográficas

1. Baumgart DC, Sandborn WJ. “Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies”. *Lancet*. 2007; **369**: 1641-1657.
2. Freitas D. “Doenças do Aparelho Digestivo”. 2nd ed. Coimbra: McGraw Hill (Ed.). *Health*; Professions Division; 2002.
3. Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL. “Harrison’s principles of internal medicine”. 17th ed. New York: McGraw Hill (Ed.). *Health*; Professions Division; 2008.
4. Baumgart DC, Sandborn WJ. “Crohn’s disease”. *Lancet*. 2012; **308**: 1590-1605.
5. Lakatos PL. “Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: Up or down?”. *World J. Gastroenterol*. 2006; **12**(38): 6102-6108.
6. Lofthus EV. “Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences”. *Gastroenterol*. 2004; **126**: 1504-1517.
7. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop DJ, Horwitz E. “Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement”. *Cytotherapy*. 2006; **8**: 315-317.
8. Triester SL, Leighton JA, Leontiadis GI, Gurudu SR, Fleischer DE, Hara AK, Heigh RI, Shiff AD, Sharma VK. “A metaanalysis of the yield of capsule endoscopy compared to other diagnostic modalities in patients with non-stricturing small bowel Crohn's disease”. *Am J Gastroenterol*. 2006; **101**: 954-964.
9. Heine GD, Hadithi M, Groenen MJ, Kuipers EJ, Jacobs MA, Mulder CJ. “Double-balloon enteroscopy: indications, diagnostic yield, and complications in a series of 275 patients with suspected small-bowel disease”. *Endoscopy*. 2006; **38**: 42-48.
10. Sonnenberg A. “Occupational distribution of inflammatory bowel disease among German employees”. *Gut*. 1990; **31**: 1037-1040.
11. Podolsky DK, Xavier RJ. “Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease”. *Nat*. 2007; **448**: 427-434.
12. Brajdić A., Mijandrušić-Sinčić B. “Insights to the Ethiopathogenesis of the Inflammatory Bowel Disease”. Dr. Imre Szabo (Ed.). 2012.

13. Gaya DR, Russell RK, Nimmo ER, Satsangi J. “New genes in inflammatory bowel disease: lessons for complex diseases?”. *Lancet*. 2006; **367**: 1271-84.
14. Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE, Wakefi eld AJ. “Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study”. *BMJ*. 1996; **312**: 95-96.
15. Orholm M, Binder V, Sorensen TI, Rasmussen LP, Kyvik KO. “Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins: results of a nationwide study”. *Scand J Gastroenterol*. 2000; **35**: 1075-1081.
16. Brant SR. “Update on the Heritability of Inflammatory Bowel Disease: The Importance of Twin Studies”. *Inflamm Bowel Dis*. 2011; **17**(1): 1-5.
17. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nuñez G, Cho JH. “A Frameshift Mutation in NOD2 Associated with Susceptibility to Crohn's Disease”. *Nat*. 2001; **411**(6837): 603-606.
18. Economou M, Trikalinos TA, Loizou KT, Tsianos EV, Ioannidis JP. “Differential Effects of NOD2 Variants on Crohn's Disease Risk and Phenotype in Diverse Populations: A Metaanalysis”. *Am J Gastroenterol*. 2004; **99**(12): 2393-404.
19. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugerie L, et al. “Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16”. *Nat*. 1996; **379**: 821-23.
20. Yamamoto-Furusho, J. K. “Molecular Genetics of Crohn Disease”. *eLS*. 2009.
21. Levine B, Deretic V. “Unveiling the Roles of Auotphagy in Innate and Adaptive Immunity”. *Nat Rev Immunol*. 2007; **7**(10): 767-777.
22. Sartor RB. “Mechanisms of Disease: pathogenesis of Crohn´s disease and ulcerative colitis”. *Nat*. 2006; **3**(7): 390-407.
23. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. “Recognition of Commensal Microflora by Toll-Like Receptors is Required for Intestinal Homeostasis”. *Cell*. 2004; **118**(2): 229-241.
24. Baumgart DC, Sandborn WJ. “Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology”. *Lancet*. 2007; **369**: 1627-1640.

25. Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Strober W. "NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses". *Nat Immunol.* 2004; **5**: 800-808.
26. Brogden KA. "Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?" *Nat Rev Microbiol.* 2005; **3**: 238-250.
27. Klotman ME, Chang TL. "Defensins in Innate Antiviral Immunity". *Nat Rev Immunol.* 2006; **6**(6): 447-456.
28. Broberger O, Perlmann P. "Autoantibodies in human ulcerative colitis". *J Exp Med.* 1959; **110**: 657-674.
29. Hughes JB, Hellmann JJ, Ricketts TH, Bohannon BJ. "Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity". *Appl Environ Microbiol.* 2001; **67**: 4399-406.
30. Cruickshank SM, McVay LD, Baumgart DC, Felsburg PJ, Carding SR. "Colonic epithelial cell mediated suppression of CD4 T cell activation". *Gut.* 2004; **53**: 678-84.
31. Sartor RB, Hoentjen F. "Proinflammatory Cytokines and Signaling Pathways in Intestinal Innate Immune Cells". *Mucosal Immunol London.* 2005; 681-701.
32. Reaves TA, Chin AC, Parkos CA. "Neutrophil Transepithelial Migration: Role of Tolllike Receptors in Mucosal Inflammation". *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;**100**(1): 191-198.
33. Burgio VL, Fais S, Boirivant M, Perrone A, Pallone F. "Peripheral monocyte and naive T-cell recruitment and activation in Crohn's disease". *Gastroenterol.* 1995; **109**:1029-1038.
34. Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ, Bell SJ, Emmanuel AV, Knight SC, Kamm MA, Stagg AJ. "Characteristics of Intestinal Dendritic Cells in Inflammatory Bowel Diseases". *Gastroenterol.* 2005;**129**(1):50-65.
35. Barnias G, Martin CIII, Mishina M, Ross WG, Rivera Nieves J, Marini M, Cominelli F. "Proinflammatory Effects of TH2 Cytokines in a Murine Model of Chronic Small Intestinal Inflammation". *Gastroenterol.* 2005; **128**(3): 654-666.
36. Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y. "Increased Expression of IL-17 in Inflammatory Bowel Disease". *Gut.* 2003; **52**(1): 65-70.
37. Strober W, Fuss IJ. "Proinflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases". *Gastroenterol.* 2011; **140**(6): 1756-1767.

38. Loftus EV Jr. “Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences”. *Gastroenterol.* 2004; **126**: 1504-17.
39. Zheng JJ, Zhu XS, Huangfu Z, Gao ZX, Guo ZR, Wang Z. “Crohn’s disease in mainland China: a systematic analysis of 50 years of research”. *Chin J Dig Dis.* 2005; **6**: 175-81.
40. Cosnes J, Seksik P, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, Gendre JP. “Prior appendectomy and the phenotype and course of Crohn’s disease”. *World J Gastroenterol.* 2006; **12**: 1235-1242.
41. Brinar M, Vermeire S, Cleynen I, Lemmens B, Sagaert X, Henckaerts L, Van Assche G, Geboes K, Rutgeerts P, De Hertogh G. “Genetic Variants in Autophagy-related 12 Inflammatory Bowel Disease Genes and Granuloma Formation in a Cohort of Surgically Treated Crohn’s Disease Patients”. *J Crohn’s Colitis.* 2012; **6**(1): 43-50.
42. Cosnes J. “Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice”. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2004; **18**: 481-96.
43. Shaw SY, Blanchard JF, Bernstein CN. “Association Between the Use of Antibiotics in the First Year of Life and Pediatric Inflammatory Bowel Disease”. *Am J Gastroenterol.* 2010; **105**(12): 2687-2692.
44. Berg DJ, Zhang J, Weinstock JV, Ismail HF, Earle KA, Alila H, Pamukcu R, Moore S, Lynch RG. “Rapid Development of Colitis in NSAID Treated IL-10 Deficient Mice”. *Gastroenterol.* 2002; **123**(5): 1527-1542.
45. Mawdsley JE, Rampton DS. “Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications”. *Gut.* 2005; **54**: 1481-1491.
46. Wang H, Yu M, Ochani M, et al. “Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation”. *Nat.* 2003; **421**: 384-388.
47. Ekbom A, Wakefield AJ, Zack M, Adami HO. “Perinatal measles infection and subsequent Crohn’s disease”. *Lancet.* 1994; **344**: 508-10.
48. Davis RL, Kramarz P, Bohlke K, et al. “Measles-mumps-rubella and other measles-containing vaccines do not increase the risk for inflammatory bowel disease: a case-control study from the Vaccine Safety Datalink project”. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2001; **155**: 354-359.

49. Martini GA, Brandes JW. "Increased consumption of refined carbohydrates in patients with Crohn's disease". *Klin Wochenschr*. 1976; **54**: 367-371.
50. Geerling BJ, Dagnelie PC, Badart-Smook A, Russel MG, Stockbrugger RW, Brummer RJ. "Diet as a risk factor for the development of ulcerative colitis". *Am J Gastroenterol*. 2000; **95**: 1008-1013.
51. Schack-Nielsen L, Michaelsen KF. "Breast feeding and future health". *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2006; **9**: 289-96.
52. Kelsall B.L. "Innate and adaptive mechanisms to control of pathological intestinal inflammation". *J Pathol*. 2008; **214**: 242-259.
53. Sartor RB. "Bacteria in Crohn Disease: mechanisms of inflammation and therapeutics implications". *J Clin Gastroenterol*. 2007; **41**: 37-43.
54. Visser J, Rozing J, Sapone A, Lammers K, Fasano A. "Tight junctions, intestinal permeability, and autoimmunity: celiac disease and type 1 diabetes paradigms". *Ann NY Acad Sci*. 2009; **1165**: 95-205.
55. Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, et al. "Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis and cell restitution". *Gastroenterol*. 2005; **129**: 550-564.
56. Hollander D, Vadheim C, Brettholz E, Pettersen GM, Delahunty T, Rotter JI. "Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives". *Ann Intern Med*. 1986; **105**: 883-885.
57. Wyatt J, Vogelsang H, Hubl W, Waldhoer T, Lochs H. "Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease". *Lancet*. 1993; **341**: 1437-1439.
58. Yacyshyn BR, Meddings JB. "CD45RO expression on circulating CD191 B cells in Crohn's disease correlates with intestinal permeability". *Gastroenterol*. 1995; **108**: 132-137.
59. Kitajima S, Takuma S, Morimoto M. "Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium". *Exp Anim*. 1999; **48**: 137-143.
60. Hale LP, Gottfried MR, Swidsinski A. "Piroxicam treatment of IL-10-deficient mice enhances colonic epithelial apoptosis and mucosal exposure to intestinal bacteria". *Inflamm Bowel Dis*. 2005; **11**: 1060-1069.

61. Lakatos PL, Fisher S, Lakatos L, Gat I, Papp J. "Current concept on the pathogenesis of inflammatory bowel disease-crosstalk between genetic and microbial factors: Pathogenic bacteria and altered bacterial sensing or changes in mucosal integrity take "toll"?". *World J Gastroenterol.* 2006; **12**(12): 1829-1841.
62. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mendel DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, Bertalan M, Borruel N, Casellas F, Fernandez L, Gautier L, Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, Kurokawa K, Leclerc M, Levenez F, Manichanh C, Nielsen BH, Nielsen T, Pons N, Poulain J, Qin J, Sicheritz-Ponten T, Tims S, Torrents D, Ugarte E, Zoetendal EG, Wang J, Guarner F, Pedersen O, de Vos WM, Brunak S, Dore J, MetaHIT Consortium, Weissenbach J, Ehrlich SD, Bork P. "Enterotypes of the human gut microbiome". *Nat.* 2011; **473**: 174-180.
63. Banchereau J, Steinman RM. "Dendritic cells and the control of immunity". *Nat.* 1998; **392**: 245-252.
64. Franchimont D, Vermeire S, El HH, et al. "Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis". *Gut.* 2004; **53**: 987-992.
65. Steinman RM, Nussenzweig MC. "Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance". *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; **99**: 351-358.
66. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, et al. "Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage". *Nat.* 2006; **441**: 231-234.
67. Zallot C, Peyrin-Biroulet L. "Deep remission in inflammatory bowel disease: looking beyond symptoms". *Curr Gastroenterol Rep.* 2013; **15** (3): 315.
68. María del Pilar Martínez-Montiel, Gonzalo Jesús Gómez-Gómez, Ana Isabel Flores. "Therapy with stem cells in inflammatory bowel disease". *World J Gastroenterol.* 2014; **20**(5): 1211-1227.
69. Takahashi K, Yamanaka S. "Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors". *Cell.* 2006; **126**: 663-676.
70. Oyama Y, Craig RM, Traynor AE, et al. "Autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory Crohn's disease". *Gastroenterol.* 2005; **128**: 552-563.

71. Craig RM, Traynor A, Oyama Y, Burt RK. "Hematopoietic stem cell transplantation for severe Crohn's disease". *Bone Marrow Transplant.* 2003; **32**: Suppl 1: S57-S59.
72. Schreiber S, Khaliq-Kareemi M, Lawrance IC, Thomsen OØ, Hanauer SB, McColm J, Bloomfield R, Sandborn WJ. "Maintenance therapy with certolizumab pegol for Crohn's disease". *N Engl J Med.* 2007; **357**: 239-250.
73. Yanai H, Hanauer SB. "Assessing response and loss of response to biological therapies in IBD". *Am J Gastroenterol.* 2011; **106**: 685-698.
74. Peyrin-Biroulet L, Loftus Jr EV, Colombel JF, Sandborn WJ. "The natural history of adult Crohn's disease in population-based cohorts". *Am J Gastroenterol.* 2010; **105**: 289-297.
75. Hurst RD, Molinari M, Chung TP, Rubin M, Michelassi F. "Prospective study of the features, indications, and surgical treatment in 513 consecutive patients affected by Crohn's disease". *Surgery.* 1997; **122**: 661-667.
76. Galandiuk S, Kimberling J, Al-Mishlab TG, Stromberg AJ. "Perianal Crohn disease: predictors of need for permanente diversion". *Ann Surg.* 2005; **241**: 796-801.
77. Farmer RG, Whelan G, Fazio VW. "Long-term follow-up of patients with Crohn's disease. Relationship of the clinical pattern and prognosis". *Gastroenterol.* 1985; **88**: 1818-1827.
78. Lapidus A, Bernell O, Hellers G, Lofberg R. "Clinical course of colorectal Crohn's disease: a 35-year follow-up study of 507 patients". *Gastroenterol.* 1998; **114**: 1151-1160.
79. Wilson B, Greco M, Hommes DW, Vermiere S, Bell C. "A European Crohn's and ulcerative colitis patient life IMPACT survey". Abstract PO875, *19th United European Gastroenterology Week*; 2011; Stockholm, Sweden.
80. Hommes D, Colombel JF, Emery P, Greco M, Sandborn WJ. "Changing Crohn's disease management: need for new goals and indices to prevent disability and improve quality of life". *J Crohns Colitis* 2012; **6**: Suppl 2: S224-S234.
81. Thomson AW, Robbins PD. "Tolerogenic dendritic cells for autoimmune disease and transplantation". *Ann Rheum Dis.* 2008; **67**: Suppl 3: S90-S96.

82. Satija NK, Singh VK, Verma YK, Gupta P, Sharma S, Afrin F, Sharma M, Sharma P, Tripathi RP, Gurudutta GU. “Mesenchymal stem cell-based therapy: a new paradigm in regenerative medicine”. *J Cell Mol Med.* 2009; **13**: 4385-4402.
83. Ankrum J, Karp JM. “Mesenchymal stem cell therapy: Two steps forward, one step back”. *Trends Mol Med.* 2010; **16**: 203-209.
84. Burdon TJ, Paul A, Noiseux N, Prakash S, Shum-Tim D. “Bone marrow stem cell derived paracrine factors for regenerative medicine: current perspectives and therapeutic potential”. *Bone Marrow Res* 2011. 2011; 207326.
85. Clerici M, Cassinotti A, Onida F, Trabattoni D, Annaloro C, Della Volpe A, Rainone V, Lissoni F, Duca P, Sampietro G, Fociani P, Vago G, Foschi D, Ardizzone S, Deliliers GL, Porro GB. “Immunomodulatory effects of unselected haematopoietic stem cells autotransplantation in refractory Crohn’s disease”. *Dig Liver Dis.* 2011; **43**: 946-952.
86. Leung Y, Geddes M, Storek J, Panaccione R, Beck PL. “Hematopoietic cell transplantation for Crohn’s disease; is it time?” *World J Gastroenterol.* 2006; **12**: 6665-6673.
87. Muraro PA, Douek DC, Packer A, Chung K, Guenaga FJ, Cassiani-Ingoni R, Campbell C, Memon S, Nagle JW, Hakim FT, Gress RE, McFarland HF, Burt RK, Martin R. “Thymic output generates a new and diverse TCR repertoire after autologous stem cell transplantation in multiple sclerosis patients”. *J Exp Med.* 2005; **201**: 805-816.
88. Alexander T, Thiel A, Rosen O, Massenkeil G, Sattler A, Kohler S, Mei H, Radtke H, Gromnica-Ihle E, Burmester GR, Arnold R, Radbruch A, Hiepe F. “Depletion of autoreactive immunologic memory followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory SLE induces long-term remission through de novo generation of a juvenile and tolerant immune system”. *Blood.* 2009; **113**: 214-223.
89. Drakos PE, Nagler A, Or R. “Case of Crohn’s disease in bone marrow transplantation”. *Am J Hematol.* 1993; **43**: 157-158.
90. van Bekkum DW. “Stem cell transplantation for autoimmune disorders. Preclinical experiments”. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2004; **17**: 201-222.
91. Gratwohl A, Passweg J, Gerber I, Tyndall A. “Stem cell transplantation for autoimmune diseases”. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2001; **14**: 755-776.

92. Marmont AM. “Stem cell transplantation for autoimmune disorders. Coincidental autoimmune disease in patients transplanted for conventional indications”. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2004; **17**: 223-232.
93. Cassinotti A, Annaloro C, Ardizzone S, Onida F, Della Volpe A, Clerici M, Usardi P, Greco S, Maconi G, Porro GB, Deliliers GL. “Autologous haematopoietic stem cell transplantation without CD34+ cell selection in refractory Crohn’s disease”. *Gut.* 2008; **57**: 211-217.
94. Snowden JA, Saccardi R, Allez M, Ardizzone S, Arnold R, Cervera R, Denton C, Hawkey C, Labopin M, Mancardi G, Martin R, Moore JJ, Passweg J, Peters C, Rabusin M, Rovira M, van Laar JM, Farge D. “Haematopoietic SCT in severe autoimmune diseases: updated guidelines of the European Group for Blood and Marrow Transplantation”. *Bone Marrow Transplant.* 2012; **47**: 770-790.
95. Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, Gertz EM, Schäffer AA, Noyan F, Perro M, Diestelhorst J, Allroth A, Murugan D, Hätscher N, Pfeifer D, Sykora KW, Sauer M, Kreipe H, Lacher M, Nustede R, Woellner C, Baumann U, Salzer U, Koletzko S, Shah N, Segal AW, Sauerbrey A, Buderus S, Snapper SB, Grimbacher B, Klein C. “Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor”. *N Engl J Med.* 2009; **361**: 2033-2045.
96. Hawkey C, Allez M, Ardizzone S, Clark M, Clark L, Colombel JF, Danese S, Farge-Bancel D, Labopin M, Lindsay J, Norman A, Onida F, Ricart E, Rogler G, Rovira M, Russel N, Satsangi J, Travis S, Tyndall A, Vermeire S. “Clinical and endoscopic improvement following hemopoietic stem cell transplantation in the ASTIC trial”. *J Crohns Colitis.* 2013; **7**: S4.
97. Burt RK, Craig RM, Milanetti F, Quigley K, Gozdziaik P, Bucha J, Testori A, Halverson A, Verda L, de Villiers WJ, Jovanovic B, Oyama Y. “Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in patients with severe anti-TNF refractory Crohn's disease: long-term follow-up”. *Blood.* 2010; **116**: 6123-6132
98. Hommes DW, Duijvestein M, Zelinkova Z, et al. “Long-term follow-up of autologous hematopoietic stem cell transplantation for severe refractory Crohn’s disease”. *J Crohns Colitis.* 2011; **5**: 543-9.
99. Hasselblatt P, Drognitz K, Potthoff K, Bertz H, Kruis W, Schmidt C, Stallmach A, Schmitt-Graeff A, Finke J, Kreisel W. “Remission of refractory Crohn’s disease by high-dose

cyclophosphamide and autologous peripheral blood stem cell transplantation”. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012; **36**: 725-735.

100. Lopez-Cubero SO, Sullivan KM, McDonald GB. “Course of Crohn’s disease after allogeneic marrow transplantation”. *Gastroenterol.* 1998; **114**: 433-440.

101. Ditschkowski M, Einsele H, Schwerdtfeger R, Bunjes D, Trenschele R, Beelen DW, Elmaagacli AH. “Improvement of inflammatory bowel disease after allogeneic stem-cell transplantation”. *Transplant.* 2003; **75**: 1745-1747.

102. Melief SM, Zwaginga JJ, Fibbe WE, Roelofs H. “Adipose tissue-derived multipotent stromal cells have a higher immunomodulatory capacity than their bone marrow-derived counterparts”. *Stem Cells Transl Med.* 2013; **2**: 455-463.

103. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, Ringdén O. “Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells”. *Lancet* 2004; **363**: 1439-1441.

104. English K, Ryan JM, Tobin L, Murphy MJ, Barry FP, Mahon BP. “Cell contact, prostaglandin E(2) and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25(High) forkhead box P3+ regulatory T cells”. *Clin Exp Immunol.* 2009; **156**: 149-160.

105. Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L. “MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2”. *Blood* 2009; **113**: 6576-6583.

106. Zhang Q, Shi S, Liu Y, Uyanne J, Shi Y, Shi S, Le AD. “Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis”. *J Immunol.* 2009; **183**: 7787-7798.

107. Voswinkel J, Francois S, Simon JM, Benderitter M, Gorin NC, Mohty M, Fouillard L, Chapel A. “Use of mesenchymal stem cells (MSC) in chronic inflammatory fistulizing and fibrotic diseases: a comprehensive review”. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2013; **45**: 180-192.

108. Onken J, Gallup D, Hanson J, Pandak M, Custer L. “Successful outpatient treatment of refractory Crohn's disease using adult mesenchymal stem cells”. American College of Gastroenterology Conference, Las Vegas, NV, Abstract 121.

109. Liang J, Zhang H, Wang D, Feng X, Wang H, Hua B, Liu B, Sun L. “Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in seven patients with refractory inflammatory bowel disease”. *Gut*. 2012; **61**: 468-469.
110. García-Olmo D, García-Arranz M, García LG, Cuellar ES, Blanco IF, Prianes LA, Montes JA, Pinto FL, Marcos DH, García-Sancho L. “Autologous stem cell transplantation for treatment of rectovaginal fistula in perianal Crohn’s disease: a new cell-based therapy”. *Int J Colorectal Dis*. 2003; **18**: 451-454.
111. García-Olmo D, García-Arranz M, Herreros D, Pascual I, Peiro C, Rodríguez-Montes JA. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn’s fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum* 2005; 48: 1416-1423.
112. García-Olmo D, Herreros D, Pascual I, Pascual JA, Del- Valle E, Zorrilla J, De-La-Quintana P, Garcia-Arranz M, Pascual M. “Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial”. *Dis Colon Rectum*. 2009; **52**: 79-86.
113. Herreros MD, Garcia-Arranz M, Guadalajara H, De-La- Quintana P, Garcia-Olmo D. “Autologous expanded adiposederived stem cells for the treatment of complex cryptoglandular perianal fistulas: a phase III randomized clinical trial (FATT 1: fistula Advanced Therapy Trial 1) and longterm evaluation”. *Dis Colon Rectum*. 2012; **55**: 762-772.
114. Ciccocioppo R, Bernardo ME, Sgarella A, Maccario R, Avanzini MA, Ubezio C, Minelli A, Alvisi C, Vanoli A, Calliada F, Dionigi P, Perotti C, Locatelli F, Corazza GR. “Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn’s disease”. *Gut*. 2011; **60**: 788-798.
115. de la Portilla F, Alba F, García-Olmo D, Herrerías JM, Martínez-Montiel MP et al. “Therapy with stem cells in IBD WJG|www.wjgnet.com 1227 February 7, 2014|Volume 20|Issue 5| González FX, Galindo A. Expanded allogeneic adipose-derived stem cells (eASCs) for the treatment of complex perianal fistula in Crohn’s disease: results from a multicenter phase I/IIa clinical trial”. *Int J Colorectal Dis*. 2013; **28**: 313-323.
116. Swenson E, Theise N. “Stem cell therapeutics: potential in the treatment of inflammatory bowel disease”. *Clin Exp Gastroenterol*. 2010; **3**: 1-10.
117. Bhatt AS, Freeman SS, Herrera AF, Peadamallu CS, Gevers D, Duke F, Jung J, Michaud M, Walker BJ, Young S, Earl AM, Kostic AD, Ojesina AI, Hasserjian R, Ballen KK,

Chen YB, Hobbs G, Antin JH, Soiffer RJ, Baden LR, Garrett WS, Hornick JL, Marty FM, Meyerson M. “Sequence-based discovery of *Bradyrhizobium enterica* in cord colitis syndrome”. *N Engl J Med.* 2013; **369**: 517-528.

118. Farge D, Labopin M, Tyndall A, Fassas A, Mancardi GL, Van Laar J, Ouyang J, Kozak T, Moore J, Kötter I, Chesnel V, Marmont A, Gratwohl A, Saccardi R. “Autologous hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases: an observational study on 12 years’ experience from the European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party on Autoimmune Diseases”. *Haematol.* 2010; **95**: 284-292.