

ÍNDICE

ÍNDICE	1
1. RESUMO	2
2. ABSTRACT	4
3. LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS	6
4. INTRODUÇÃO	8
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
6. GENÉTICA E DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL.....	11
6.1. NOD2	12
6.2. Genes Reguladores da Autofagia.....	13
6.3. Interleucina - 23.....	15
6.4. Genes Associados à Região HLA	16
6.5. Outros Genes.....	16
7. FLORA INTESTINAL E DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL	20
7.1. Flora Intestinal e Homeostasia	22
7.2. Disbiose e Doença Inflamatória Intestinal	25
7.3. Probióticos e Prebióticos e a Doença Inflamatória Intestinal	29
8. AMBIENTE E DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL	32
9. DISCUSSÃO	34
10. CONCLUSÃO	39
11. AGRADECIMENTOS.....	40
12. BIBLIOGRAFIA	41

1. RESUMO

A Doença Inflamatória Intestinal (DII) é uma patologia crônica com uma incidência crescente, particularmente em países industrializados. A sua etiologia carece ainda de clarificação, apontando os estudos mais recentes para uma interação entre diversos fatores etiológicos, como sejam os fatores ambientais externos e os fatores do hospedeiro, onde se incluem o genótipo, a resposta imunitária e a flora intestinal. Dada a multiplicidade de fatores envolvidos, a Medicina não dispõe ainda de terapêuticas curativas.

À luz das mais recentes técnicas de sequenciação do genoma e dos *Genome Wide Association Studies*, é hoje em dia possível identificar inúmeros *loci* cuja presença se pensa aumentar a suscetibilidade para desenvolver esta patologia. No campo da microbiota, foi também possível, através da metagenómica e da sequenciação do RNA ribossomal 16S, obter grandes avanços na sua caracterização, e na identificação de alterações da sua composição.

Assim, o objetivo deste trabalho é uma revisão da literatura no que de recente se tem publicado na área do genótipo do hospedeiro e da sua flora intestinal, tentando clarificar o seu envolvimento na fisiopatologia da doença.

É possível identificar genes, cuja associação é já amplamente aceite como etiopatogenia da doença (como o caso do NOD2 ou o ATG16L1), associados a processos de reconhecimento bacteriano, autofagia e resposta imunitária por parte do epitélio intestinal. No campo da flora microbiana, também os estudos têm tentado esclarecer de que forma a alteração na proporção e diversidade de espécies presentes poderá influenciar o estado pro-inflamatório de base desta doença. Ao mesmo tempo, também a infeção por agentes patogénicos e os mecanismos de imunotolerância à flora comensal são tidos como peças importantes nesta desregulação.

Apesar da riqueza de achados e dos avanços feitos na última década, a clarificação da etiopatogenia da doença carece ainda de mais estudos que, para além de identificarem os

fatores etiológicos associados, consigam explicar a interação dinâmica entre eles, e de que forma esses fatores e essa interação condiciona a resposta imunitária do organismo.

PALAVRAS -CHAVE

Doença inflamatória intestinal; patogênese; genótipo; microbiota; doença de Chron; colite ulcerosa

2. ABSTRACT

The inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic disease with a growing incidence, particularly in developed countries. Its etiology lacks clarification, having recent studies indicated to be related with a dynamic interaction between different etiologic factors. These factors are either environmental or host-dependent, like the individual's genotype, immune response and gastrointestinal flora. Given this multiplicity of associated factors, medicine has not yet developed curative therapies.

Under the light of modern genome sequencing techniques and Genome Wide Association Studies, it is possible to identify several loci whose presence is thought to increase susceptibility for the development of this disease. In the microbiota area, it was also possible to advance in its characterization and identification of alterations in its composition, benefiting from areas like metagenomics and ribosomal RNA 16S sequencing.

The main goal of this article is to make a revision of the last advances in the field of host genotype and gastrointestinal flora, trying to clarify its involvement in the disease's physiopathology.

It is already possible to identify genes, whose association with IBD is broadly accepted (like the NOD2 or the ATG16L1 gene). These genes are involved in the bacteria recognition process, autophagy and the intestinal epithelium immune response. Also in the field of gastrointestinal flora, the studies have also been trying to clarify in what ways the proportion and diversity of the colonizing species can influence the proinflammatory state of the disease. At the same time, the infection by pathogenic species and the immunotolerance mechanisms to the commensal flora take also part in this dysregulation process.

Although the past decade has brought countless advances, the clarification of the etiopathogeny is still lacking further studies that besides identifying new susceptibility

factors, will also give an explanation on how these factors and this interaction modifies the immune response of the organism.

KEY WORDS

Inflammatory bowel disease; pathogenesis; genotype; microbiota; Chron's disease; ulcerative colitis

3. LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

ADN – ácido desoxirribonucleico

AIEC - *adherent-invasive Escherichia coli*

ARN – ácido ribonucleico

AGCC – ácidos gordos de cadeia curta

AINEs – anti-inflamatórios não esteróides

ATG16L1- *autophagy-related protein 16-1*

CLDN2-MORC4 – *claudine 2 – microrchidia 4*

CU – colite ulcerosa

DC – doença de Chron

DII – doença inflamatória intestinal

GWAS – *genome wide association studies*

HLA – *human leukocyte antigen complex*

IBD – *inflammatory bowel disease*

IgA – imunoglobulina A

IL 17 – interleucina 17

IL23 – interleucina 23

IRGM – *immunity-related guanosine triphosphatase M*

JAK2 – *janus kinase 2*

LPS - lipopolissacarídeos

LRKK2 – *leucine-rich repeat kinase 2*

MAP cinase – proteíno-cinases ativadas por mitogénos

MAMP – *microbe associated molecular pattern*

MHC – *major histocompatibility complex*

NAT2 – N-acetiltransferase 2

NF-kb – fator de transcrição nuclear kappa-b

NOD2 - *nucleotide-binding oligomerization domain containing 2*

SNP – *single nucleotide polymorphism*

STAT 2 – *signal transducer and activator of transcription 3*

Th17 – *T-helper 17*

TLRs – *toll-like receptors*

TNF α – *tumour necrosis factor – alfa*

Tollip - *toll-inhibitor-protein*

ULK1 – *serine/threonine-protein kinase 1*

VDR – *vitamin D receptor*

4. INTRODUÇÃO

A doença inflamatória intestinal é uma patologia que se caracteriza genericamente por uma inflamação crónica do trato digestivo, podendo ter diferentes formas de apresentação, sendo a Doença de Chron (DC) e a Colite Ulcerosa (CU) as mais comuns. A distinção entre ambas é feita através de critérios endoscópicos, histológicos e clínicos, mas sabe-se hoje em dia que estas duas formas possuem também fatores genéticos e de risco distintos.(1)

A CU manifesta-se como uma inflamação contínua da mucosa do cólon. Esta inflamação afeta mais frequentemente o reto (proctite) e cólon esquerdo (colite esquerda), podendo contudo estender-se até ao cego (pancolite). As manifestações clínicas mais frequentes incluem diarreia mucopiosanguinolenta, dor abdominal, tenesmo e febre. Para o diagnóstico, associam-se ainda critérios histológicos e endoscópicos que confirmam alterações de carácter inflamatório da mucosa do cólon. O seu curso assenta em períodos de remissão e exacerbação que, na ausência de tratamento, evoluem em extensão e gravidade das lesões.(1)

A DC pode afetar qualquer ponto do trato gastrointestinal, sendo o local mais frequentemente envolvido o íleo terminal. A extensão mural do processo inflamatório ultrapassa a mucosa, existindo intervalos sãos entre os segmentos afetados. O quadro doloroso da DC é mais pronunciado devido às estenoses (geralmente no jejuno-íleo) que podem surgir com o decurso desta patologia. Diarreia e febre podem também acompanhar o quadro. A DC pode ter ainda manifestações extraintestinais como por exemplo uveíte, aftas, pioderma gangrenoso, eritema nodoso e poliartrite, entre outras.(2) Tal como a CU, também a DC cursa com períodos de remissão e exacerbação que evoluem em gravidade e extensão, sendo o seu diagnóstico estabelecido com base em alterações endoscópicas e histológicas documentadas.

Epidemiologicamente, tem-se assistido ao longo das últimas décadas a um aumento da incidência da Doença Inflamatória Intestinal (DII), sendo que a incidência mais elevada é a

registada nos países ocidentais industrializados, em indivíduos de raça caucasiana e judeus. Entre as duas principais formas de doença, sabe-se também ser a DC a mais prevalente.(3, 4)

A DII é ainda hoje uma doença crónica, facto que pode ser associado à falta de um conhecimento total dos mecanismos etiopatogénicos que estão na sua origem. Ao longo dos últimos anos, a investigação tem demonstrado serem vários os fatores etiológicos envolvidos. Fatores genéticos, ambientais, microbianos e imunitários têm sido relacionados com a doença, quer individualmente, quer pela sua interação dinâmica. A compreensão dos seus mecanismos de ação é fundamental para a criação de terapêuticas eficazes.

Foram já identificadas alterações nos genótipos de indivíduos afetados que podem justificar uma resposta imunoinflamatória anómala do organismo. Os mecanismos fisiopatológicos associados passam, entre outros, pelo reconhecimento de certas bactérias como patogénicas, mas também por essa resposta imunoinflamatória desajustada e crónica que condiciona a lesão das paredes do tubo digestivo.(5)

Também na flora intestinal é possível indicar algumas alterações: uma diminuição na diversidade das espécies que a compõem, mas também a presença de espécies pouco comuns ou o aumento de certas populações (como sejam *Bacteroides* ou *Proteobacterias*). A somar a estas alterações, há ainda estudos que sugerem que a composição da flora intestinal de indivíduos doentes é instável, sofrendo alterações entre os períodos de remissão e os períodos de crise.(6)

Este trabalho tem como objetivo descrever e discutir alguns dos mecanismos fisiopatológicos subjacentes à DII, pelo que será feita a revisão, até à data, de quais as principais alterações no genótipo encontradas em doentes com DII e de que forma a sua presença condiciona uma suscetibilidade ao surgimento desta patologia; analisar-se-á ainda a relação que alterações da constituição da flora intestinal dos hospedeiros possam ter com a doença.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Na elaboração deste trabalho, foi feita uma revisão da literatura médica que abordava a relação entre a DII, o genótipo do hospedeiro e a flora intestinal. A pesquisa bibliográfica efetuou-se em julho de 2015, com recurso à base de dados PubMed, de artigos que relacionassem estes tópicos, em inglês e em português, publicados entre 2010 e 2015.

Os termos MeSH utilizados na pesquisa foram: “doença inflamatória intestinal”, “etiologia”, “patogenia”, “gene”, “microbiota” e “imunologia”.

Após uma seleção inicial dos artigos, através do seu título e resumo, foi selecionado um grupo de 42 artigos que serviram como estrutura para a elaboração deste trabalho.

O critério utilizado na seleção foi o de incluir apenas os artigos que falavam especificamente na DII e sua etiologia. Foram também selecionados os artigos que se focavam nas alterações genéticas já descritas, bem como nas alterações da flora intestinal e na sua relação fisiopatológica com a doença. Fora excluídos os artigos cujo tema principal eram outros agentes etiológicos ou cujo enfoque foi dado a outras patologias que não a DII. Artigos cujo tema principal eram terapêuticas experimentais ou já instituídas foram também excluídos por não serem do âmbito deste trabalho de revisão.

Posteriormente, houve necessidade de recorrer a artigos anteriores a este período temporal, para complementar a informação recolhida nos artigos mais recentes, e que serviam como ponte de partida de alguns estudos, desde que fossem posteriores a 2005. Sempre que relevante, foram consultadas as referências dos artigos selecionados para o aprofundamento dos tópicos abordados.

Todos os artigos citados pertencem a revistas cujo fator de impacto foi avaliado através da plataforma Web of Knowledge (www.webofknowledge.com), tendo este fator pesado na inclusão ou exclusão dos mesmos.

6. GENÉTICA E DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

Sabe-se hoje que a suscetibilidade genética ao desenvolvimento da DII desempenha um papel importante nos mecanismos fisiopatológicos desta patologia.(4, 5) Este facto assenta na análise de famílias com um elevado número de indivíduos afetados em sucessivas gerações. Sabe-se também que a presença de alguns genes já identificados não determina o surgimento da patologia, mas antes confere uma suscetibilidade aumentada que, em interação com outros fatores, pode potenciar o estado inflamatório crónico dos doentes.(7)

Nas últimas décadas, vários foram os genes identificados em indivíduos doentes que definiram um perfil comum à DII, mas com alguns genes específicos em cada uma das duas formas mais prevalentes – CU e DC. Estas descobertas foram fruto não só da evolução tecnológica nas técnicas de sequenciação e mapeamento, mas também da criação de grandes bases de dados multinacionais.(5)

Hoje em dia conhecem-se pelo menos 163 *loci* associados à DII, 110 comuns à DC e CU, 30 específicos de Chron e 23 específicos de CU.(5, 8) Em 2001 deu-se o primeiro passo com a identificação do gene NOD2 (*nucleotide-binding oligomerization domaincontaining 2*), cuja presença se sabe conferir suscetibilidade para DC. Todavia, atualmente estão já identificados polimorfismos genéticos com relação fisiopatológica direta com a DII. Nestes incluem-se o gene NOD2, o gene do recetor da IL23 (interleucina 23), e genes reguladores de autofagia (ATG16L1 – *autophagy-related proteín 16-1*, IRGM – *immunity-related guanosine triphosphatase M* e LRRK2 – *leucine-rich repeat kinase 2*).(7)

Contudo sabe-se que a genética em si não encerra a única explicação para o surgimento da patologia. Dados epidemiológicos revelam uma concordância entre gémeos monozigóticos inferior a 50%.(9, 10) Sabemos também que as populações migrantes que se deslocam de áreas com baixa prevalência de DII para áreas de alta prevalência, têm risco aumentado para

desenvolver a doença. Tal sugere que diversos fatores, quer do hospedeiro quer do ambiente, interagem de forma dinâmica na fisiopatologia da doença.(4)

6.1. NOD2

A mutação do gene NOD2, que codifica um recetor da parede celular com o mesmo nome, foi a primeira identificada em indivíduos com DC. Este gene é expresso por várias células do organismo, nomeadamente neutrófilos, linfócitos B e T, células de Paneth (células do epitélio intestinal com função de defesa antibacteriana, fúngica e vírica), células dendríticas e células epiteliais intestinais. Sabe-se que, em condições normais, a ativação do NOD2, surge através do reconhecimento do peptidoglicano muramil dipetídeo presente na parede celular de inúmeras bactérias, estimulando a resposta imunitária inata e adquirida.(11) Este reconhecimento leva a ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-kB, *nuclear factor kappa B*) e da cascata das proteíno-quinases ativadas por mitógenos (MAP cinase, *mitogen activated protein kinases*) induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e a libertação de defensinas pela célula.(12) Mais recentemente descobriu-se também uma função do NOD2 na ativação da autofagia, interagindo com o ATG16L1 para a formação do autofagossoma.(11, 13) Desconhece-se contudo a forma como esta interação bactéria-recetor NOD2 é efetuada.(14)

Existem três principais mutações descritas pela literatura, que reduzem significativamente ou eliminam a expressão do NOD2, todas elas associadas especificamente à DC. São elas a (R702W, rs2066844), a (G908R, rs2066845) e a (L1007fs, rs41450053).(12) Alguns estudos afirmam que cerca de 15% dos indivíduos com DC possuem mutações em homozigotia ou heterozigotia composta (a presença de duas mutações do mesmo gene num só indivíduo) do NOD2.(15) A presença de uma mutação não chega por si só para causar doença mas sabe-se que estão associadas a fenótipos de doença de manifestação em idades mais jovens, localização predominantemente ileal e à formação frequente de estenoses intestinais (16), o

que sugere que a DII é uma doença multifatorial onde podem intervir vários agentes etiológicos.

Pensa-se que uma mutação no NOD2 origina uma resposta anómala ou diminuída da mucosa intestinal a organismos patogénicos, diminuindo a resposta imunitária inata (através da eliminação de bactérias pelas defensinas), e permitindo dessa forma a sua multiplicação e invasão da parede intestinal. Como consequência, seriam ativadas outras vias de defesa que iriam contribuir para a inflamação transmural crónica observada nesta doença.(16)

Por último, é ainda interessante o facto de que diferentes formas de muramil dipéptido provocam diferentes graus de ativação do recetor NOD2. A forma N-glicolisada presente, por exemplo, em micobactérias, causa uma ativação maior do que a forma N-acetilada presente em algumas bactérias gram-positivas e gram-negativas.(17) Será então possível deduzir que mesmo sem mutação do NOD2, diferentes padrões de colonização microbiana possam induzir uma resposta imunitária inata diminuída conduzindo a um efeito semelhante ao encontrado nos indivíduos portadores da mutação.

6.2. GENES REGULADORES DA AUTOFAGIA

A autofagia é o processo através do qual a célula degrada os seus organelos e proteínas. Esta pode ser ativada para manter a homeostasia do meio, mas também em casos de desnutrição quando a célula recebe um aporte deficitário de nutrientes. Decorre habitualmente em quatro passos: iniciação, alongamento, seleção do conteúdo e maturação do autofagossoma.(12) Mais recentemente, foi descoberto que a autofagia pode também ser ativada em resposta a agente patogénicos intracelulares, com ativação da imunidade inata e adquirida através da apresentação de antigénios bacterianos pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC II, *major histocompatibility complex II*).(13, 18)

O gene *ATG16L1* codifica uma proteína com o mesmo nome e é expresso em inúmeras células do organismo, incluindo as células de Paneth intestinais. A proteína ATG16L1 está envolvida no complexo que promove o alongamento da membrana celular, com consequente encerramento do autofagossoma contendo os produtos ou agentes a degradar.(12)

Estudos recentes demonstraram ainda que a ativação do complexo de autofagia, com expressão do *ATG16L1* pode também ser desencadeada pelo mecanismo de reconhecimento bacteriano envolvendo o NOD2. Assim, em indivíduos com mutação deste gene foi possível observar defeitos na autofagia antibacteriana, sem contudo estarem presentes mutações do *ATG16L1*.(18)

A mutação T300A do gene *ATG16L1* demonstrou conferir um risco aumentado nos indivíduos portadores, para desenvolverem DC. Esta mutação diminui a capacidade celular para fagocitar e eliminar os agentes patogênicos através do autofagossoma.(19) Um estudo realizado com ratinhos, em que se verificava baixa expressão de *ATG16L1*, e se encontravam infetados com norovirus (vírus de transmissão fecal-oral presente em alimentos mal lavados e que provoca gastroenterite), revelou que estes possuíam uma maior suscetibilidade para a inflamação ileal, e para anomalias das células de Paneth.(20)

Os genes que codificam o IRGM e o LRRK2 estão também envolvidos no processo de autofagia. Através de GWAS (*genome-wide association studies*) foi possível identificar e estabelecer a relação entre estas mutações e a DC.(10, 11, 16)

Relativamente ao *IRGM*, este foi associado pela primeira vez à autofagia num estudo de 2006, que relata o seu papel na eliminação do *Micobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Quanto às suas funções, sabe-se que tem um papel na indução da autofagia e maturação do autofagossoma.(16) As variantes genéticas identificadas resultam numa redução da expressão deste gene, com consequente aumento da sobrevivência intracelular de várias espécies bacterianas (*M. tuberculosis*, *Salmonella typhimurium* e também a estirpe LF82 de *Escherichia coli* (*E.*

coli) associada à DC).(19) Este aumento da sobrevida condiciona assim um maior potencial patogénico das espécies citadas.

O *LRRK2* foi também alvo de estudos, tendo-se demonstrado que ratinhos com deleção deste gene possuíam defeitos no acoplamento dos autofagossomas a lisossomas (essenciais para a degradação dos agentes ou detritos a eliminar), com aumento da apoptose celular, resposta inflamatória e *stress* oxidativo.(21)

Um estudo (12) conseguiu ainda detetar um SNP (*single nucleotide polymorphism*) ligado ao gene *ULK1* (*serine/threonine-protein kinase 1*), responsável pela iniciação do processo de autofagia que aumentava a suscetibilidade para DC, contudo o efeito deste SNP sobre a função da proteína codificada é ainda desconhecido.(12) Também baseado em trabalhos de investigação que associavam o défice de vitamina D à DII, realizaram-se estudos que demonstraram um aumento de suscetibilidade para a DC em portadores de polimorfismos para o gene *VDR* (*vitamin D receptor*) em populações sem ascendência europeia.(12, 22) Recentemente foram também realizados estudos no sentido de compreender se a suplementação com Vitamina D poderia ser benéfica como terapêutica adjuvante na DII, tendo os resultados sido encorajadores. Pensa-se que a vitamina D pode diminuir o estado pró-inflamatório, diminuindo a apoptose de células epiteliais induzida pelas citocinas pró-inflamatórias, auxiliando na manutenção da integridade da barreira epitelial intestinal.(23)

6.3. INTERLEUCINA - 23

A citocina IL-23 é importante na ponte entre a resposta imune inata e a adquirida. Classicamente, a sinalização de linfócitos T dá-se através da interleucina 17 (IL-17, *interleukin 17*) sendo responsável pelo seu recrutamento e manutenção. Recentemente demonstrou-se que, concomitantemente, a IL23 é também uma peça-chave na sinalização e recrutamento de um subgrupo de linfócitos T - as células Th17 (*T-helper 17*).(24)

Foram descritos inúmeros polimorfismos do gene IL23 que codifica o recetor de mesmo nome. Curiosamente, estão já identificados polimorfismos que parecem diminuir a suscetibilidade à doença, contrariamente a outros que a aumentam.(24) Alguns SNPs identificados estão presentes em indivíduos não só com DII, como também associados a doenças autoimunes muitas vezes relacionadas com a DII, como por exemplo a espondilite anquilosante.(24)

Outras proteínas de transdução e amplificação de sinal, que participam na via de sinalização deste recetor, incluem a JAK2 (*janus kinase 2*) e a STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*), cujas mutações foram também já relacionadas com a DII. Estas proteínas participam também em vias de sinalização de outras interleucinas (IL-6 e IL-22), reforçando a importância das vias de sinalização da resposta inflamatória na fisiopatologia da DII.(11)

6.4. GENES ASSOCIADOS À REGIÃO HLA

O grupo de genes associados ao HLA (*human leukocyte antigen complex*) compreende um grupo muito heterogéneo e amplo de funções. As alterações até agora identificadas através de GWAS estão predominantemente associadas à CU.(16)

As vias de sinalização codificadas por esta ampla classe de genes envolvem os tetrâmeros apresentadores de antígenos, e várias moléculas co-estimuladoras e sinalizadoras. As variações genéticas encontradas incluem genes que regulam a ativação, proliferação e manutenção de linfócitos T, bem como a secreção de citocinas.(16) Outro dado interessante é o facto de algumas variantes conferirem risco aumentado para o desenvolvimento de doenças autoimunes, como por exemplo a artrite reumatoide, tireoidite autoimune ou *diabetes mellitus* tipo 1.(16)

6.5. OUTROS GENES

Os recetores do tipo Toll (TLRs, *toll-like receptors*), são uma grande família de recetores transmembranares presentes em inúmeras células do organismo, incluindo macrófagos, linfócitos T, células dendríticas e células epiteliais intestinais. São responsáveis pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a microorganismos (MAMP, *microbe associated molecular pattern*), levando à ativação de vias de sinalização da imunidade, na presença de microorganismos patogénicos. As suas variantes genéticas são raras, contudo alguns polimorfismos foram já associados a diferentes fenótipos de DII, nomeadamente o TLR1, TLR2 e TLR6. Os polimorfismos TLR1-R80T e o TLR2-R753Q, em doentes com CU, parecem aumentar o risco para o desenvolvimento de pancolite. Outras variantes parecem induzir um estado pró-inflamatório na presença de concentrações normais de lipopolissacarídeos (LPS), um elemento da parede bacteriana ligando destes recetores, e há ainda variantes associadas a um aumento do risco de infeção por organismos *Gram* negativos (*Gram -*).⁽²⁵⁾

Além dos genes associados à resposta imunitária inata e adquirida, também genes associados à estrutura da barreira epitelial foram já alvo de investigação. As claudinas são proteínas constituintes das *tight-junctions* das células do epitélio gastrointestinal. Sabe-se que em indivíduos com DII estas junções estão por vezes alteradas, particularmente em doentes com DC, conferindo uma maior permeabilidade a organismos patogénicos.⁽²⁶⁾ Um estudo de 2013 ⁽²⁶⁾, com formas familiares de DC, tentou compreender se este aumento de permeabilidade era devido à inflamação crónica ou se existia algum substrato genético etiológico. Os resultados demonstraram uma relação entre polimorfismos da região CLDN2-MORC4 (*claudine 2 – microrchidia 4*), que codificam proteínas presentes nas junções celulares, e a DC, levando a crer que estas alterações possam ter também elas predisposição genética.⁽²⁶⁾

Um estudo de 2011 (27) tentou verificar a correlação entre polimorfismos do gene *NAT2* (N-acetiltransferase 2) e o risco de desenvolver DII. Este gene codifica a proteína N-acetiltransferase 2, responsável pela destoxificação de xenobióticos no organismo. Anteriormente havia já sido provada uma relação entre polimorfismos deste gene e o surgimento de algumas neoplasias, incluindo o carcinoma colorretal. Certos polimorfismos associados a acetiladores lentos, que demoram mais tempo a excretar xenobióticos, demonstraram um risco aumentado para o desenvolvimento de DII. Contudo, esta associação ainda carece de um maior número de estudos em grupos de maiores dimensões.(27)

Os GWAS permitiram nos últimos anos identificar inúmeros genes que conferem risco aumentado de desenvolver DII nos seus portadores. A esmagadora maioria relaciona-se com funções de defesa epitelial e resposta imunitária inata e adquirida. É possível identificar genes para CU e para a DC, mas também alguns comuns entre ambos. A Tabela 1 faz um breve resumo de alguns deles, ordenando-os pelo tipo de doença à qual estão associados.(11)

Tabela 1 – Alguns genes associados a *SNPs* descritos em *Genome Wide Association Studies*

Genes	Função	Forma de Doença
PARK7, DAP	Autofagia	Colite Ulcerosa
HSPA6, DLD, PARK7	Stress Oxidativo	Colite Ulcerosa
CARD9	Stress Oxidativo e Defesa da Mucosa Intestinal	Ambas as formas
MUC19, ITLN1	Barreira Epitelial	Doença de Chron
NFDIP1, TAGAP, IL2RA	Regulação de Linfócitos T	Doença de Chron
IL-2, TNFRSF9, PIM3, IL-7R	Regulação de Linfócitos T	Colite Ulcerosa
IL10, CREM	Imunotolerância	Ambas as formas

PARK 7 – parkinsonism associated glycase 7; DAP – death-associated protein; HSPA6 – heat shock protein family A; DLD – dihydrolipoamide dehydrogenase; CARD9 - caspase recruitment domain family, member 9; MUC19 – mucine 19; ITLN1 – interlektin 1; NFDIP1 – hepcidin independent binding protein 1; TAGAP - T cell activation Rho GTPase activating protein; IL2RA – interleukin 2 receptor subunit – alfa; IL-2 – interleukin 2; TNFRSF9 – tumour necrosis factor receptor superfamily, member 9; PIM3 – proto-oncogene serine kinase 3; IL-7R – interleukin 7 receptor; IL 10 – interleukin 10; CREM – CAMP responsive element modulator.

Por fim, também a epigenética tem contribuído para uma melhor compreensão dos mecanismos genéticos subjacentes à DII. A epigenética provou que, além de alterações de

sequenciação na cadeia do ácido desoxirribonucleico (ADN), o seu perfil de enrolamento com as histonas altera a estrutura da cromatina e, conseqüentemente, as sequências de ADN que são transcritas. Este processo de modificação da estrutura da cromatina através da desacetilação ou acetilação das histonas ou através de demetilases ou metiltransferases, altera as zonas de ADN expostas aos mecanismos de transcrição, alterando assim a expressão do código genético, independentemente da presença ou ausência de determinadas sequências.(28) Sabe-se também que estas variações epigenéticas são hereditárias.(29, 30) Também na DII se desenvolveram estudos no sentido de perceber a influência destes mecanismos. Esta necessidade surgiu após a identificação, através dos GWAS, de *loci* de suscetibilidade, sendo a grande maioria dos SNPs localizados em regiões do genoma não codificadoras. Tem-se tentado assim perceber de que forma é que estes SNPs podem alterar a metilação do ADN e, conseqüentemente, alterar a sua transcrição, existindo já estudos com o recetor da IL-23.(28, 30)

Por fim, foi também reportado em estudos laboratoriais com ratinhos, que a metilação das histonas pode ser influenciada por fatores ambientais, como a dieta, sendo as alterações epigenéticas induzidas passadas à descendência.(29)

7. FLORA INTESTINAL E DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

O trato gastrointestinal do ser-humano tem cerca de 10^{14} bactérias e mais de 1 000 espécies diferentes, possuindo também algumas espécies de vírus e fungos. Esta colonização dá-se após o nascimento e durante a infância, estabilizando após este período. A sua função é essencial para metabolizar algumas das substâncias presentes na dieta, que de outra forma não seriam passíveis de absorção pelas paredes do tubo digestivo. Além disso, são peça-chave na síntese de algumas vitaminas, no ciclo entero-hepático, na composição da barreira imunitária e na motilidade intestinal.(31)

A caracterização da flora intestinal é difícil com recurso aos métodos clássicos de cultura, que permitem apenas identificar uma pequena porção. Todavia, nas últimas décadas surgiram duas técnicas que colmataram essa deficiência, nomeadamente a sequenciação do ácido ribonucleico (ARN) ribossomal 16S (que se encontra conservado entre os vários grupos filogenéticos de bactérias), e a abordagem metagenómica com sequenciação completa do genoma bacteriano.(32)

Estes estudos permitiram-nos dividir a flora intestinal em quatro filos bacterianos principais: *Acinetobacter*, *Proteobacterias*, *Bacteroidetes* e *Firmicutes*.(15) Na primeira fase da vida o perfil microbiano é dominado pelos dois primeiros, evoluindo ao longo da vida para uma composição dominada por *Bacteroidetes* e *Firmicutes*.(33)

Existem contudo, também, variações ao longo do tubo digestivo. No jejuno proximal predominam bactérias aeróbias e *Gram* positivos (*Gram* +) e, à medida que avançamos distalmente, o número de *Gram* – ultrapassa os de *Gram* +. Já após a válvula ileocecal, no cólon, o número de bactérias aumenta exponencialmente, sendo a população constituída maioritariamente por *Bacteroides*, *Bifidobactérias*, *Fusobactérias*, *Clostridium* e grupos de *Peptostreptococos*. Cerca de 64% da flora intestinal pertence ao filo de *Bacteroides* e 23% ao

de *Firmicutes*. As Enterobactérias como a *Escherichia coli* representam apenas 8% do total.(34)

A relação entre o hospede (bactérias) e o hospedeiro (trato gastrointestinal) é estabelecida nas primeiras semanas de vida, e tem um papel fundamental no desenvolvimento do sistema imunitário. Sabe-se que os primeiros constituintes estruturais da resposta imunitária adquirida, como as células de memória, surgem com a diversificação alimentar e da flora intestinal, desenvolvendo-se imunotolerância para inúmeros antígenos alimentares e bacterianos.(33)

A composição da flora intestinal varia consoante a dieta, a antibioterapia à qual o indivíduo foi exposto, e também com as infeções que possa ter tido. Existe também uma variabilidade associada dependente da idade, sexo e proveniência geográfica.(35) Estudos realizados demonstraram uma semelhança maior na composição da flora intestinal de gémeos ou irmãos, do que em casais sem consanguinidade que partilham o mesmo ambiente e dieta. Outro dado relevante é que a flora da parede do trato gastrointestinal difere da flora fecal, e que esta última é muito influenciada por elementos ambientais variáveis, como sejam a alimentação, medicação, ambiente físico ou motilidade intestinal.(32) Assim, a variabilidade ambiental poderá influenciar principalmente a flora fecal, enquanto a flora da parede do trato gastrointestinal poderá se influenciada essencialmente por fatores dependentes do hospedeiro (32).

Na DII existem inúmeras alterações na flora intestinal que se pensa conduzirem a uma resposta inflamatória crónica. Tais alterações incluem uma diminuição do número de espécies bacterianas, a colonização excessiva por determinados agentes, ou uma resposta anómala a antígenos bacterianos que geralmente seriam tolerados em indivíduos saudáveis.(8)

Muitos estudos têm-se focado na caracterização da flora intestinal em indivíduos com DII, comparando segmentos com inflamação com segmentos do trato intestinal sem inflamação. Sabe-se que na DC é comum existir uma diminuição de bactérias das espécies dos filos

Firmicutes e *Bacteroidetes* com aumento das bactérias do género *Enterobacter*, enquanto na CU foi evidenciado uma diminuição em *Clostridium spp.* e um aumento das *Escherichia Coli*. Contudo é ainda difícil afirmar se estas alterações estão na base da inflamação predominante nesta doença, ou se o estado inflamatório crónico é o indutor destas alterações.(5)

7.1. FLORA INTESTINAL E HOMEOSTASIA

A flora intestinal tem um papel central na manutenção da homeostasia do organismo, tendo a seu cargo diversas funções. Na verdade, em condições normais, a flora intestinal e o seu hospedeiro estabelecem uma relação de simbiose, que se traduz em ganhos para ambos. Tal relação simbiótica permite que funções do hospedeiro como o crescimento, metabolismo e imunidade possam funcionar em pleno. A importância para o crescimento do organismo foi evidenciada em estudos dos anos 80, que mostravam que camundongos manipulados para terem uma diminuição acentuada da flora intestinal, necessitavam de um aporte calórico 30% superior ao de camundongos-padrão, para manterem o peso corporal em valores estáveis (15). Por outro lado, cerca de 1 a 20 % dos aminoácidos lisina e treonina em circulação no plasma humano provêm da flora intestinal, o que reflete uma dependência metabólica por parte de muitas funções do organismo. Adicionalmente, a barreira intestinal é também fonte de vitaminas essenciais como a vitamina K ou de minerais essenciais como o ferro e o cobre. Relativamente à função imunomoduladora da microbiota, é de salientar a importância fulcral dos ácidos gordos de cadeia curta, aspeto desenvolvido mais adiante. (15)

Estruturalmente, pode-se definir a barreira intestinal como constituída por duas camadas mucosas que recobrem o epitélio intestinal: a camada mucosa interna, aderente e impermeável, e uma camada mucosa externa, menos aderente e mais permeável, formada por mucinas secretadas pelas células caliciformes, e que se expande para o lúmen devido à sua capacidade de reter água. Assim, a camada interna é geralmente estéril, enquanto que a

camada externa é colonizada pela flora intestinal, que utiliza os nutrientes presentes na mucina.(36)

A camada mucosa intestinal recobre o epitélio intestinal que, por sua vez, é constituído por enterócitos, e por células epiteliais especializadas, como as células de Paneth, e as células caliciformes (produtoras da mucina da camada mucosa externa). A coesão celular do epitélio é mantida pelas *tight-junctions* e pelos desmossomas. Também esta segunda linha de defesa desempenha um papel preponderante, e estudos demonstraram já que uma diminuição da coesão das células epiteliais intestinais pode ser observada em doentes com DII.(37) Tal diminuição de coesão permite uma colonização facilitada das camadas mais internas do epitélio, com consequente ativação da resposta imunitária aos patógenos.

Apesar da existência de uma barreira física, é necessário um mecanismo regulador que permita à mucosa intestinal tolerar a flora comensal ou reagir aos agentes patogénicos. As células epiteliais intestinais ou enterócitos expressam assim recetores como os TLRs (*toll-like receptors*), que respondem de forma diferente aos ligandos que os ativam, inibindo ou ativando os factores de transcrição responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias. Esta discriminação é essencial para a manutenção da homeostasia e da renovação celular (37), e é conseguida graças à grande variedade de TLRs existentes nas células epiteliais. Os TLRs 1, 2, 4, 5 e 6 formam homo- ou heterodímeros que se ligam a componentes da parede celular bacteriana como o ácido lipoteicóico, lipopolissacarídeos ou flagelinas. Por sua vez os TLRs 3, 7, 8, e 9 respondem à ligação a ácidos nucleicos. Um exemplo pode ser dado com o facto de as células epiteliais intestinais expressarem elevados níveis de Tollip (*toll-inhibitor-protein*) e altos níveis de TLR 2, resultando numa ausência de resposta a ligandos como o peptidoglicano ou o ácido lipoteicóico. Em condições normais, padrões de expressão como este resultam numa tolerância para agentes comensais e ativação de resposta apenas para agentes patogénicos.(15)

A microbiota tem também um papel preponderante na resistência do organismo a certos agentes patogénicos que invadem o lúmen intestinal. Estudos demonstraram que a *Escherichia coli* produz proteínas antibacterianas como as colicinas e as microcinas, inibindo a colonização por certas bactérias *Gram -*. Outro exemplo é a da protease produzida pela *S. boulardii* que digere a toxina do *Clostridium difficile*, responsável pela colite pseudomembranosa. Por último, a própria presença da flora comensal parece melhorar a resposta do organismo a infeções, pela sua estimulação constante de base, com apresentação de antígenos.(15, 35)

A imunoglobulina A desempenha também um papel importante na manutenção da homeostasia intestinal. Esta imunoglobulina é secretada pelos linfócitos B da lâmina própria, e acumula-se na camada mucosa, ligando-se a antígenos e bactérias, impedindo a invasão das camadas mais profundas. A sua produção é ativada aquando do reconhecimento de agentes patogénicos pelas células dendríticas, que induz uma produção de IgA específica.(32) Um estudo de 2004 demonstrou já que ratinhos com produção alterada ou deficiente de IgA, têm um aumento do número de bactérias colonizadoras da camada mucosa que recobre o epitélio.(32)

Relativamente à função imunomoduladora da microbiota, foi já demonstrada uma importância fulcral do butirato, um ácido gordo de cadeia curta (AGCC), metabolito de certas bactérias, e do succinato, um produto do ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs). O butirato, através da sua ligação a uma proteína G acoplada ao recetor GPR109A de células epiteliais intestinais, atenua a resposta inflamatória inibindo a ativação do NF-kB. O succinato, por sua vez, liga-se ao GPR91 das células dendríticas, e induz a produção de citocinas pró-inflamatórias responsáveis pela ativação da resposta imune adquirida, via linfócitos T.(33, 38)

Estas funções imunomoduladoras dos ácidos gordos de cadeia curta estão evidenciadas na Figura 1, onde se faz uma comparação entre o estado de simbiose e de disbiose, que é uma

alteração da normal composição da flora intestinal, quer por alteração da proporção entre as várias espécies de bactérias ou redução da diversidade, quer pela colonização por espécies que habitualmente não fariam parte da flora comensal (34, 39). Na figura é possível observar que a ligação dos ácidos gordos a proteínas acopladas a recetores de membrana permite manter a regeneração e proliferação epitelial, aumentar a absorção de água e eletrólitos, e favorecer a imunotolerância do organismo à flora comensal. Por oposição, no estado de disbiose, há uma alteração da composição da flora, com diminuição destes ácidos gordos e, em consequência, o desenvolvimento de um estado inflamatório crónico.

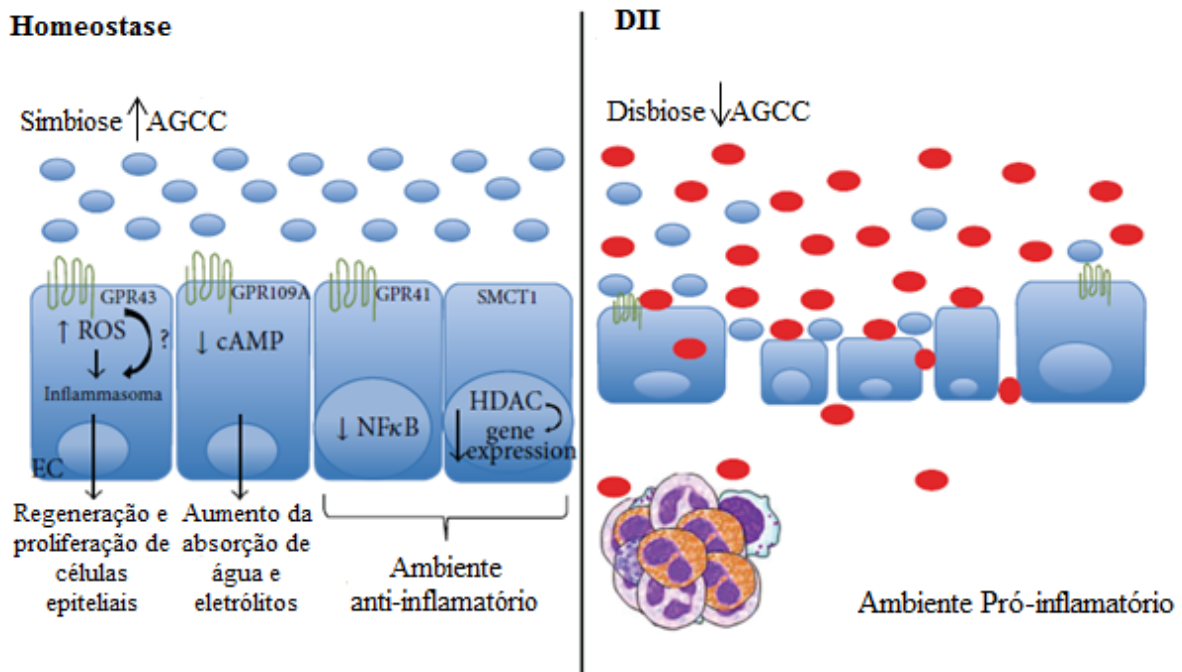


Figura 1 - Representação esquemática da imunomodulação da mucosa intestinal em estado de simbiose e disbiose. Adaptado de Ferreira C.M. et al, 2014.

AGCC – ácidos gordos de cadeia curta; GPR – *glycoprotein receptor*; ROS – espécies reativas de oxigénio; EC – Célula Epitelial; cAMP – adenosina monofosfato cíclica NFκB – fator nuclear de transcrição kappa-b; HDAC - histona desacetilase.

7.2. DISBIOSE E DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

Para a manutenção das funções acima descritas, é então essencial que o organismo tenha uma barreira epitelial intestinal íntegra, e possua um bom funcionamento dos mecanismos de imunotolerância aos antígenos, quer bacterianos comensais, quer alimentares. A presença de

uma flora comensal estável é também essencial. Sempre que este equilíbrio é interrompido, pode gerar-se um aumento da resposta inflamatória.

Ao longo dos últimos anos os estudos têm-se focado na caracterização da flora microbiana, tentando relacionar as alterações nela encontradas com a presença de DII.(6)

Um facto interessante resultante desses estudos é a observação da redução do número total de espécies microbianas (conhecido como diversidade α) colonizadoras, quer em doentes com CU quer com DC.(6, 40) Foi também visível esta redução quando feita a comparação entre segmentos intestinais saudáveis e segmentos inflamados. Outro dado observado foi que a composição da microbiota se revelou instável durante a fase de remissão em doentes com colite ulcerosa. A mesma instabilidade na fase de remissão pôde ser observada em estudos envolvendo doentes com DC. (6)

Em doentes com DC, particularmente quando a doença envolvia o íleo e o cólon, foi observada uma redução acentuada de algumas espécies bacterianas, como *Faecalibacterium prausnitzii* e do género *Roseburia*, que têm uma elevada produção de ácidos gordos de cadeia curta.(40)

Além das bactérias, também os vírus e fungos foram alvo de estudos na tentativa de perceber a sua relação com a DII.

As alterações encontradas no viroma (vírus colonizadores da flora intestinal) são ainda muito pouco estudadas e compreendidas. Um estudo de 2015 tentou caracterizar e associar alterações do viroma com a DII. Estabeleceu-se uma relação entre a diversidade e quantidade de bacteriófagos (vírus com tropismo específico para bactérias) com a severidade e atividade da doença. Os bacteriófagos são das entidades biológicas mais comuns e prevalentes no nosso planeta, sendo responsáveis pela manutenção do equilíbrio bacteriano em numerosos ecossistemas. Eles possuem a capacidade de integrar o seu material genético no genoma das bactérias, alterando as suas propriedades patogénicas. Assim, e à luz destes achados, pensa-se

que também o viroma possa ter um papel importante na disbiose da doença inflamatória intestinal.(41)

Relativamente ao micoma, foi descrito que doentes com DC possuem uma suscetibilidade aumentada para a infeção por *Candida albicans*.(6)

Vários estudos foram realizados no sentido de perceber o papel individual da colonização por alguns agentes patogénicos. Um dos agentes mais estudados foi o *Micobacterium avium paratuberculosis*, que pode ser isolado de vários alimentos como a carne, água e produtos lácteos. Contudo, a sua associação etiológica com a DII é controversa, devido aos resultados díspares dos estudos efetuados. Ainda assim, foi provado que a sua infeção em doentes com DC estava associada a uma resposta imunitária predominantemente mediada por linfócitos T, com elevada produção de TNF- α (*tumour necrosis factor alpha*). (34)

Um subgrupo específico de *E. coli* denominado por *Escherichia coli* aderente invasivo (AIEC, *adherent-invasive Escherichia coli*), foi fortemente associado à presença de DC ileal. Este microorganismo tem a capacidade de aderir e infiltrar a camada mucosa intestinal do íleo, e depois atingir a camada de células epiteliais devido aos seus filamentos de actina, e ao recrutamento de microtúbulos.(40) Os estudos efetuados demonstraram ainda que a sua presença está associada a formas mais graves e rapidamente progressivas de DC.(34, 42)

Durante anos tentou-se estabelecer a associação entre as *Helicobacter* e a DII, sem contudo se terem obtido resultados animadores. Contudo, o subgrupo enteropático de *Helicobacter* demonstrou ter a capacidade de induzir colite em roedores. Existe também uma prevalência mais elevada deste agente em biópsias do cólon de doentes com CU.(43, 44)

Mais recentemente, foi direcionado o foco dos estudos para o género *Campylobacter* e, na última década, foi possível estabelecer uma associação entre várias espécies de *Campylobacter* não-*jejuni* e a presença das duas principais formas de DII. A sua pesquisa, quer através do seu isolamento em cultura, quer através da pesquisa de anticorpos específicos

(num estudo com *C. concisus*), foi motivada pelo aumento de prevalência de DII em doentes com gastroenterite prévia (por *Campylobacter*, mas também por *Salmonella*). O seu mecanismo etiopatogénico ainda não está bem elucidado, mas sabe-se que bactérias do género *Campylobacter* são capazes de promover a translocação da flora comensal, e algumas espécies, como a *C. concisus*, têm a capacidade de provocar lesão celular e destruição das vilosidades intestinais.(34, 45)

Outros géneros como *Salmonella*, *Klebsiella* e *Yersinia* foram já descritos como tendo uma associação a esta doença, devido a um aumento de incidência de DII em doentes com historial de infeções prévias ou expostos a bactérias destes géneros.(34)

A disbiose pode diminuir as defesas do organismo à colonização por agentes patogénicos e promover o crescimento de patobiontes, organismos comensais capazes de induzir doença apenas quando o organismo hospedeiro tem alterações genéticas ou ambientais que levam a uma resposta imunitária inata ou adquirida anómalas.(6)

O aumento ou diminuição de certas espécies bacterianas comensais, e o isolamento de estirpes mais agressivas em tecidos afetados pelo processo inflamatório, pode igualmente ser visto como uma consequência e não um fator etiológico da doença. O ambiente menos favorável criado poderia levar à seleção de bactérias resistentes que subsistem num ambiente mais hostil.(46)

Para além das já mencionadas, foram já descritas mais alterações na composição da flora intestinal, e nas suas funções, que podem estar relacionadas com a DII. Um resumo das já descritas, e dessas outras, é feito na Tabela 2, apresentada de seguida.

Tabela 2 - Alterações da microbiota associadas a DII. Adaptado de Kostic et al, 2014

Composição da Flora Intestinal	Diminuição da diversidade alfa
	Diminuição de <i>Bacterioidetes</i> e <i>Fimircutes</i>

	Aumento de <i>Gamaproteobacteria</i>
	Presença de <i>E. Coli</i> , em particular as estirpes aderentes-invasivas.
	Presença de <i>Fusobacterium</i>
	Diminuição de <i>Clostridia</i> , <i>Ruminococcaceae</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i>
	Diminuição de <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>
Alterações de Função	Diminuição de ácidos gordos de cadeia curta (butirato)
	Diminuição da biossíntese de aminoácidos
	Aumento da auxotrofia (dificuldade de um microrganismo em sintetizar os seus compostos orgânicos)
	Aumento do transporte de aminoácidos
	Aumento do transporte de sulfato
	Aumento do <i>stress</i> oxidativo

Existem outras teorias que procuram explicar a fisiopatologia da DII à luz dos achados dos diversos estudos efetuados. À luz das alterações genéticas já descritas, por exemplo, as alterações da microbiota podem também ser induzidas pela eliminação deficitária de agentes patogénicos, quer através da autofagia, quer através dos mecanismos de defesa epitelial deficitários. Outros processos associados às vias da imunidade adquirida com ativação e resposta anómala de linfócitos T e mecanismos de imunotolerância podem também explicar as alterações da microbiota.(6, 11, 35, 39)

7.3. PROBIÓTICOS E PREBIÓTICOS E A DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

Nos últimos anos, foram várias as tentativas efetuadas para encontrar terapêuticas que conseguissem contornar as alterações da resposta imunitária do hospedeiro à disbiose da flora intestinal. Neste sentido surgiram os probióticos, os prebióticos, e os simbióticos. Os probióticos são definidos como um suplemento à base de microrganismos vivos que beneficiam o hospedeiro ao restaurarem o equilíbrio da flora intestinal. Os prebióticos podem-se definir como um alimento não digerível que estimula o crescimento ou a atividade de determinadas espécies bacterianas comensais. Sempre que um suplemento contenha ambos, e estes atuem sinergicamente, podemos defini-lo como simbiótico.(15, 47)

Os probióticos surgiram no sentido de colmatar a diminuição de determinadas espécies bacterianas observada em porções inflamadas do trato gastrointestinal. Exemplo disso é a diminuição de bifidobactérias ou de lactobacilos, cuja administração através de probióticos pode ajudar a restabelecer a homeostasia no intestino. Os mecanismos de atuação subjacentes compreendem a inibição do crescimento de bactérias patogénicas, aumento da coesão das células da camada epitelial intestinal, modulação da resposta imunitária da mucosa, aumento da secreção de produtos antimicrobianos, e ainda a decomposição no lúmen de antigénios patogénicos.(48)

Relativamente aos prebióticos, estes são na sua maioria hidratos de carbono não digeríveis pelas enzimas do trato gastrointestinal humano, mas que beneficiam as bactérias comensais através da sua fermentação. Alguns deles estão já presentes em alimentos, como é o caso de certos oligossacarídeos no leite materno, enquanto outros são adicionados aos alimentos. Destes são exemplo os frutooligossacarídeos, a inulina, os galactooligossacarídeos e os oligossacarídeos dos rebentos de soja.(49)

Nos últimos anos, têm sido realizados vários estudos para comprovar a eficácia da utilização dos probióticos e dos prebióticos no tratamento em crise da DII, e na manutenção da remissão. Apesar de existirem resultados contraditórios, a maioria identifica esta arma

terapêutica como benéfica. Contudo, ainda são necessários mais estudos para descobrir quais as espécies bacterianas mais benéficas, e suas combinações, para que os probióticos e prébióticos possam ser considerados como arma terapêutica útil, e contornar efeitos indesejáveis, como por exemplo, a introdução de resistências antibióticas com a alteração da flora comensal.(49)

Ainda assim, todos estes estudos provaram que a flora intestinal (e as tentativas de manipulação da mesma) pode representar uma das soluções para a cura de uma doença crónica, através da sua capacidade de modulação do sistema imunitário, quer estimulando a resposta, quer através da sua atividade anti-inflamatória.(47-49)

8. AMBIENTE E DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

Os fatores ambientais foram dos primeiros elementos etiológicos a serem estudados na tentativa de compreender a fisiopatologia da DII. Particularmente o tabaco, desde a sua associação com a doença em 1982, apresenta resultados diversos no que toca ao tipo de doença em estudo. Na CU o efeito do consumo de tabaco está associado a uma diminuição do risco de desenvolvimento da doença e a uma progressão mais favorável, com um menor taxa de crises associadas. Na DC o efeito é justamente o oposto, conferindo uma maior suscetibilidade, com pior prognóstico após instalação.(5, 50)

As causas para o efeito do tabaco na CU permanecem ainda por esclarecer. Todavia, pensa-se que esse efeito advém das características anti-inflamatórias da nicotina. Esta é responsável pela diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias com a IL-1 β ou o TNF α . Adicionalmente, os macrófagos de indivíduos fumadores possuem défices ao nível da eliminação de bactérias intracelulares, e a exposição da mucosa cólica à nicotina em ratinhos está associada a diminuição da resposta mediada pelos linfócitos T, com diminuição da inflamação.(50)

O papel do *stress* na DII está ainda pouco esclarecido. Sabe-se que doentes com DII sujeitos a maiores níveis de *stress* (medido como sintomas de ansiedade e depressão) costumam ter um pior prognóstico associado, com um maior número de crises e diminuição do tempo de remissão. Contudo ainda não foi possível estabelecer uma associação de causa-efeito.(5) Julga-se que um mecanismo psiconeuroimunológico possa ser o responsável. Ao contrário do que se pensava, o cortisol libertado em resposta ao *stress* não possui apenas um efeito imunossupressor. Uma estimulação basal de baixas doses de cortisol possui um efeito imunoestimulador, com aumento da produção de IL-6 e TNF α pelos macrófagos, em resposta ao reconhecimento de LPSs presentes em bactérias.(51)

Com o aparecimento da industrialização, e com a associação epidemiológica entre os países industrializados e o aumento de incidência de DII, também a poluição é tida hoje em dia como fator ambiental potencialmente envolvido na fisiopatologia da doença.(5) Um estudo de 2010 demonstrou que existe um aumento do número de doentes com DII em áreas onde existe um aumento da concentração de gases poluentes, como o dióxido de enxofre ou o óxido nítrico no ambiente. Este fenómeno era particularmente evidente em crianças e adultos jovens, não existindo correlação com doentes que desenvolviam DII em idades mais avançadas.(52) Não é contudo possível afirmar uma relação causa-efeito, mas pensa-se que a suscetibilidade genética, e o facto de as crianças serem mais suscetíveis aos efeitos deletérios dos gases do efeito de estufa, possam explicar os achados epidemiológicos.(52)

Sabe-se também que a poluição, devido ao efeito pró-inflamatório dos gases poluentes, contribui para um aumento de suscetibilidade para o desenvolvimento de doenças inflamatórias, como a esclerose múltipla ou a artrite reumatoide. Tal associação causa-efeito não se encontra ainda estabelecida para a DII.

Outros fatores ambientais, como os antigénios presentes nos alimentos, ou a toma crónica de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) têm sido também alvo de estudo. A toma crónica de AINEs leva à diminuição da produção de prostaglandinas por parte da mucosa gastrointestinal, deixando-a mais propensa a lesões. Pensa-se assim que a sua toma crónica pode promover uma progressão mais rápida da doença.(37)

Ainda assim, nenhum destes fatores explica por si só o surgimento da doença, sublinhando-se uma vez mais o papel que a interação entre os diversos fatores de suscetibilidade do hospedeiro e de exposição ambiental podem ter no aparecimento desta patologia.(5, 37)

9. DISCUSSÃO

A DII é uma entidade clínica para a qual atualmente apenas se dispõe de tratamento de remissão e manutenção. Em termos de tratamento com intuito curativo, a medicina atual apenas consegue oferecer tratamento cirúrgico a doentes com formas extensas e agressivas de colite ulcerosa (através da proctocolectomia total), induzindo limitações à qualidade de vida dos doentes.

É por isso vital a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos desta doença para no futuro ser possível disponibilizar terapêuticas dirigidas e minimamente invasivas, mantendo a qualidade de vida dos indivíduos afetados.(1, 2)

Sabemos hoje que a DII é uma doença com etiologia multifatorial, com fatores ambientais, microbianos (flora intestinal), imunológicos e de suscetibilidade genética interagindo numa rede dinâmica e complexa, que apenas agora começa a ser compreendida.(5, 37).

Nesta revisão bibliográfica, foi feita uma abordagem de dois dos grandes grupos etiológicos estudados: o genótipo do hospedeiro e a flora intestinal.

Foi possível verificar que estão já identificados inúmeros fatores de suscetibilidade, contudo apenas alguns possuem uma via fisiopatológica direta identificável e compreendida. No campo do genótipo destacam-se particularmente o gene NOD2, a IL23 e alguns genes reguladores de autofagia. Já no campo da flora microbiana a redução das espécies produtoras de ácidos gordos de cadeia curta, e a variação do número e diversidade total das espécies bacterianas, são os achados mais consistentes com o desenvolvimento desta doença.

Os *Genome Wide Association Studies* vieram ajudar a decodificar o genótipo com a identificação de cerca de 163 *loci* de risco, a maioria localizando-se em regiões do genoma não codificantes ou cujo significado não se encontra ainda esclarecido.(5, 28, 30)

Não obstante, esses estudos permitiram já identificar alguns genes de risco, e a sua relação com a DII parece indiciar uma desregulação dos mecanismos de resposta imunitária associada

à barreira intestinal. Desde o reconhecimento bacteriano (NOD2), à regulação dos processos de autofagia e apoptose celular (ATG16L1, IRGM, LRRK2), e às vias da resposta imunológica adquirida (genes do complexo MHC II e IL23), tudo aponta para um papel fundamental dos mecanismos de defesa imunológica e da imunotolerância do epitélio intestinal na DII.(7, 11, 12, 16, 21)

Outro facto interessante resultante desses estudos foi a associação encontrada entre alguns genes de suscetibilidade com patologias autoimunes que muitas vezes acompanham a DII, como é o caso da poliartrite reumática, o que pode ser importante para a compreensão da diversidade fenotípica da DII e suas manifestações extra-intestinais.(24)

As alterações genéticas já identificadas revelam um estado pró-inflamatório de base, e um aumento da suscetibilidade à infeção por agentes patogénicos, como condicionantes de uma resposta anormal do organismo. Também os genes codificadores de elementos responsáveis pela integridade da barreira intestinal (camada mucosa e *tight-junctions* epiteliais) podem estar envolvidos, aumentando assim a suscetibilidade das camadas mais profundas à proliferação bacteriana.(26)

Assim, a componente genética, e a componente imunológica, parecem estar intrinsecamente ligadas, a primeira enquanto entidade indutora de desregulação e a segunda enquanto mecanismo fisiopatológico induzido pelas alterações do genótipo.(5, 37)

A epigenética assume-se como o próximo passo na investigação. A sua importância foi já revelada através de estudos com formas familiares de neoplasias, cuja simples transmissão alélica não permitia explicar o surgimento ou ausência de doença nas sucessivas gerações. Também na DII, e à luz da descoberta dos *loci* de risco, a transmissão de alterações sequenciais do genoma não consegue por si só ser a explicação.(28, 29) Na verdade, dados epidemiológicos revelam que, apesar da identificação de genes de suscetibilidade, existe uma baixa concordância para gémeos monozigóticos e ocorre alteração do padrão epidemiológico

em populações migrantes.(3, 4, 7, 9). Assim, no futuro, as regiões não codificantes devem também ser alvo de estudo no sentido de perceber a influência que podem ter na estrutura da cromatina e no processo de transcrição do ADN. Mais uma vez, os estudos mostram uma possível relação dos fatores ambientais externos com a metilação do ADN, suportando a teoria de que a DII poderá ser uma doença multifatorial, cuja genética confere suscetibilidade, não sendo determinista.(28, 29, 53)

Relativamente à flora intestinal, esta é essencial para a manutenção da homeostasia do trato gastrointestinal. Além da degradação de nutrientes presentes na dieta (tornando possível a sua absorção) e da síntese de vitaminas, a sua atividade protetora contra microorganismos patogénicos parece ser um dos elementos que a colocam no centro da etiopatogenia da doença.(15, 36, 37)

Os estudos (técnicas de sequenciação de RNA ribossomal 16S e metagenómica) têm-se focado na identificação de alterações da composição do microbioma em indivíduos afetados, comparando porções saudáveis e inflamadas do intestino, tentando justificar a assimetria no padrão de segmentos afetados entre os vários doentes.(15, 32)

As várias alterações encontradas (quer na diminuição do número de espécies, quer na presença de espécies habitualmente não colonizadoras), são descritas como mecanismo indutor de uma resposta inflamatória, mas mais estudos são necessários para concluir se aquelas serão a causa ou a consequência de uma desregulação da barreira epitelial intestinal. Os estudos demonstraram também que, a progressão em gravidade das lesões inflamatórias parece ter um potencial de seleção de estirpes mais virulentas, com capacidade de invasão das camadas mais profundas do epitélio, contribuindo para o agravamento adicional do processo inflamatório.(34, 42, 46)

A estabilidade da composição da flora intestinal, e a presença de certas espécies em número adequado, são essenciais para a regulação da resposta inflamatória (limitando a

mesma) e para a manutenção da integridade e regeneração da barreira epitelial. Para esta estabilidade da flora intestinal e da barreira epitelial, os ácidos gordos de cadeia curta produzidos por determinadas espécies bacterianas demonstraram ter um papel fundamental. Foi com base neste pressuposto que se tentaram desenvolver probióticos e prebióticos que auxiliassem na manutenção das funções do epitélio intestinal. Apesar dos resultados mostrarem, após sua administração, melhorias na progressão da doença e na redução do número de crises, são necessários estudos adicionais que identifiquem as composições ideais (número e diversidade de espécies bacterianas) a utilizar. Um facto que não pode ser ignorado é que, apesar de aparentemente inócuos, probióticos e/ou prebióticos podem induzir disbiose, ou até mesmo favorecer a colonização por espécies resistentes a antibióticos no organismo. Apesar da sua inclusão em algumas *guidelines* como forma terapêutica, mais estudos são necessários para clarificar a eficácia e segurança dos probióticos e prebióticos como tratamento adjuvante da DII.(33, 38, 48)

A infecção prévia por espécies bacterianas patogénicas pode provocar, por competição direta e pelas suas propriedades antibacterianas, alterações na flora intestinal, bem como, por ação direta, lesões no epitélio intestinal.

Para além das bactérias, o viroma é um conceito recente que relaciona a multiplicação de bacteriófagos com alteração do microbioma através da indução de alterações no genoma de bactérias da flora comensal, alterando dessa forma o seu potencial patogénico, e seleccionando determinadas espécies. Tal foi possível observar pela relação inversa entre o aumento do número de bacteriófagos e a diminuição do número de espécies bacterianas presentes. Ainda assim, é um conceito que requer estudos mais aprofundados enquanto mecanismo indutor de disbiose.(41, 54)

As alterações genéticas, ao influenciarem os mecanismos de imunotolerância e de defesa da barreira intestinal, podem condicionar a composição da flora comensal. Estas alterações

conferem uma oportunidade para que organismos patogénicos habitualmente não colonizadores se tornem parte integrante da flora intestinal, acabando por invadir camadas mais profundas do epitélio intestinal. Outros estudos demonstraram que, quando as condições do hospedeiro são alteradas, como sucede nos portadores de determinadas mutações, as bactérias da flora comensal podem adquirir potencial patogénico, invadindo e colonizando camadas mais profundas da barreira epitelial.(6, 19, 34, 39, 40)

Relativamente aos fatores ambientais, estes podem ser um fator protetor ou potenciador de desenvolvimento na doença. Entre eles incluem-se a dieta (particularmente a vitamina D), o consumo de tabaco, a toma de antibióticos, a atividade física e o *stress*. O estudo do expossoma, isto é, o conjunto de todos os fatores ambientais externos a que o indivíduo é exposto, desde a gestação *in utero* até ao final da vida, procura explicar o que fatores dependentes do hospedeiro não conseguiram até então.(9) Não tem sido possível, no entanto, correlacionar a presença de fatores de risco ambientais com o risco de desenvolver DII, ou com a sua progressão, após instalação.

10. CONCLUSÃO

Para que possam vir a ser desenvolvidas terapêuticas com potencial curativo no campo da DII, é importante clarificar quais as vias envolvidas na fisiopatologia da doença inflamatória intestinal e identificar os seus agentes etiológicos.

A maioria dos agentes (ambientais, microbianos e genéticos) já identificados provoca uma desregulação na resposta imunitária inata e adquirida do hospedeiro. Todavia, a sua ação isolada não é suficiente para induzir doença, nem nos permite prever a progressão da mesma, pelo que o futuro da investigação nesta área passa pela clarificação da interação dinâmica entre os vários agentes etiológicos conhecidos.

11. AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Doutor Rui Gradiz, e coorientadora Prof^a Doutora Anabela Mota Pinto, pela disponibilidade, compreensão e profissionalismo, que sempre demonstraram no acompanhamento deste trabalho de revisão. Foram sem dúvida um exemplo de rigor e competência que tentei espelhar no trabalho que fui desenvolvendo ao longo dos últimos meses.

Aos meus amigos e família pelo apoio dado e toda a paciência que tiverm com as minhas ausências e que sempre me motivaram para continuar a trabalhar.

Aos meus avós Alice e Bernardo, por me terem ensinado que nada na vida é conseguido sem espírito de sacrifício e ambição de ser sempre mais e melhor.

12. BIBLIOGRAFIA

1. Ordás I, Eckmann L, Talamini M, Baumgart DC, Sandborn WJ. Ulcerative colitis. *The Lancet*. 2012;380(9853):1606-19.
2. Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *The Lancet*. 2012;380(9853):1590-605.
3. Molodecky NA, Soon IS, Chernoff G, Benchimol EI, Kaplan GG, Rabi DM, et al. Increasing Incidence and Prevalence of the Inflammatory Bowel Diseases With Time, Based on Systematic Review. *Gastroenterology*. 2012;142(1):46-54.
4. Ko Y, Butcher R, Leong RW. Epidemiological studies of migration and environmental risk factors in the inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*. 2014;20(5):1238-47.
5. Zhang YZ, Li YY. Inflammatory bowel disease: pathogenesis. *World J Gastroenterol*. 2014;20(1):91-9.
6. Cammarota G, Ianiro G, Cianci R, Bibbo S, Gasbarrini A, Curro D. The involvement of gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: potential for therapy. *Pharmacol Ther*. 2015;149:191-212.
7. Fengming Y, Jianbing W. Biomarkers of inflammatory bowel disease. *Dis Markers*. 2014;2014:710915.
8. Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D. The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. *Gastroenterology*. 2014;146(6):1489-99.
9. Ananthkrishnan AN. The exposome in inflammatory bowel disease. *Tropical Gastroenterology*. 2014;35(3):135-40.
10. Gordon H, Trier Moller F, Andersen V, Harbord M. Heritability in inflammatory bowel disease: from the first twin study to genome-wide association studies. *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21(6):1428-34.
11. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2011;474(7351):307-17.

12. Kabi A, Nickerson KP, Homer CR, McDonald C. Digesting the genetics of inflammatory bowel disease: insights from studies of autophagy risk genes. *Inflamm Bowel Dis.* 2012;18(4):782-92.
13. Shaw MH, Kamada N, Warner N, Kim YG, Nunez G. The ever-expanding function of NOD2: autophagy, viral recognition, and T cell activation. *Trends in immunology.* 2011;32(2):73-9.
14. Grimes CL, Ariyananda Lde Z, Melnyk JE, O'Shea EK. The innate immune protein Nod2 binds directly to MDP, a bacterial cell wall fragment. *Journal of the American Chemical Society.* 2012;134(33):13535-7.
15. Stephani J, Radulovic K, Niess JH. Gut microbiota, probiotics and inflammatory bowel disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2011;59(3):161-77.
16. Cho JH, Brant SR. Recent insights into the genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2011;140(6):1704-12.
17. Coulombe F, Divangahi M, Veyrier F, de Leseleuc L, Gleason JL, Yang Y, et al. Increased NOD2-mediated recognition of N-glycolyl muramyl dipeptide. *The Journal of experimental medicine.* 2009;206(8):1709-16.
18. Homer CR, Richmond AL, Rebert NA, Achkar JP, McDonald C. ATG16L1 and NOD2 interact in an autophagy-dependent antibacterial pathway implicated in Crohn's disease pathogenesis. *Gastroenterology.* 2010;139(5):1630-41, 41 e1-2.
19. Kuballa P, Huett A, Rioux JD, Daly MJ, Xavier RJ. Impaired autophagy of an intracellular pathogen induced by a Crohn's disease associated ATG16L1 variant. *PLoS One.* 2008;3(10):e3391.
20. Cadwell K, Patel KK, Maloney NS, Liu TC, Ng AC, Storer CE, et al. Virus-plus-susceptibility gene interaction determines Crohn's disease gene Atg16L1 phenotypes in intestine. *Cell.* 2010;141(7):1135-45.

21. Tong Y, Yamaguchi H, Giaime E, Boyle S, Kopan R, Kelleher RJ, 3rd, et al. Loss of leucine-rich repeat kinase 2 causes impairment of protein degradation pathways, accumulation of alpha-synuclein, and apoptotic cell death in aged mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(21):9879-84.
22. Ardesia M, Ferlazzo G, Fries W. Vitamin D and inflammatory bowel disease. *BioMed research international*. 2015;2015:470805.
23. Reich KM, Fedorak RN, Madsen K, Kroeker KI. Vitamin D improves inflammatory bowel disease outcomes: basic science and clinical review. *World J Gastroenterol*. 2014;20(17):4934-47.
24. Wellcome Trust Case Control C, Australo-Anglo-American Spondylitis C, Burton PR, Clayton DG, Cardon LR, Craddock N, et al. Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nature genetics*. 2007;39(11):1329-37.
25. Frosali S, Pagliari D, Gambassi G, Landolfi R, Pandolfi F, Cianci R. How the Intricate Interaction among Toll-Like Receptors, Microbiota, and Intestinal Immunity Can Influence Gastrointestinal Pathology. *J Immunol Res*. 2015;2015:489821.
26. Soderman J, Noren E, Christiansson M, Bragde H, Thiebaut R, Hugot JP, et al. Analysis of single nucleotide polymorphisms in the region of CLDN2-MORC4 in relation to inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2013;19(30):4935-43.
27. Baranska M, Trzcinski R, Dziki A, Rychlik-Sych M, Dudarewicz M, Skretkiewicz J. The role of N-acetyltransferase 2 polymorphism in the etiopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 2011;56(7):2073-80.
28. Ventham NT, Kennedy NA, Nimmo ER, Satsangi J. Beyond gene discovery in inflammatory bowel disease: the emerging role of epigenetics. *Gastroenterology*. 2013;145(2):293-308.

29. Stylianou E. Epigenetics: the fine-tuner in inflammatory bowel disease? *Curr Opin Gastroenterol*. 2013;29(4):370-7.
30. Karatzas PS, Mantzaris GJ, Safioleas M, Gazouli M. DNA methylation profile of genes involved in inflammation and autoimmunity in inflammatory bowel disease. *Medicine (Baltimore)*. 2014;93(28):e309.
31. Comito D, Cascio A, Romano C. Microbiota biodiversity in inflammatory bowel disease. *Italian Journal of Pediatrics*. 2014;40:32.
32. Carriere J, Darfeuille-Michaud A, Nguyen HT. Infectious etiopathogenesis of Crohn's disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20(34):12102-17.
33. Ferreira CM, Vieira AT, Vinolo MA, Oliveira FA, Curi R, Martins Fdos S. The central role of the gut microbiota in chronic inflammatory diseases. *J Immunol Res*. 2014;2014:689492.
34. Hold GL, Smith M, Grange C, Watt ER, El-Omar EM, Mukhopadhyaya I. Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: what have we learnt in the past 10 years? *World J Gastroenterol*. 2014;20(5):1192-210.
35. Abraham C, Medzhitov R. Interactions between the host innate immune system and microbes in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2011;140(6):1729-37.
36. Geremia A, Biancheri P, Allan P, Corazza GR, Di Sabatino A. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmun Rev*. 2014;13(1):3-10.
37. Corridoni D, Arseneau KO, Cominelli F. Inflammatory bowel disease. *Immunol Lett*. 2014;161(2):231-5.
38. Geuking MB, Koller Y, Rupp S, McCoy KD. The interplay between the gut microbiota and the immune system. *Gut Microbes*. 2014;5(3):411-8.
39. Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2008;134(2):577-94.

40. Hrnčirova L, Krejsek J, Splichal I, Hrnčíř T. Crohn's disease: a role of gut microbiota and Nod2 gene polymorphisms in disease pathogenesis. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2014;57(3):89-96.
41. Brooks J, Watson AJ. The Enteric Virome in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*. 2015;149(4):1120-1.
42. Tawfik A, Flanagan PK, Campbell BJ. Escherichia coli-host macrophage interactions in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterology*. 2014.
43. Thomson JM, Hansen R, Berry SH, Hope ME, Murray GI, Mukhopadhyaya I, et al. Enterohepatic Helicobacter in Ulcerative Colitis: Potential Pathogenic Entities? *PLoS One*. 2011;6(2):e17184.
44. Peloquin JM, Nguyen DD. The microbiota and inflammatory bowel disease: insights from animal models. *Anaerobe*. 2013;24:102-6.
45. Kalischuk LD, Inglis GD, Buret AG. Campylobacter jejuni induces transcellular translocation of commensal bacteria via lipid rafts. *Gut pathogens*. 2009;1(1):2.
46. Golinska E, Tomusiak A, Gosiewski T, Wiecek G, Machul A, Mikołajczyk D, et al. Virulence factors of Enterococcus strains isolated from patients with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2013;19(23):3562-72.
47. Lomax AR, Calder PC. Prebiotics, immune function, infection and inflammation: a review of the evidence. *Br J Nutr*. 2009;101(5):633-58.
48. Bai AP, Ouyang Q. Probiotics and inflammatory bowel diseases. *Postgrad Med J*. 2006;82(968):376-82.
49. Orel R, Kamhi Trop T. Intestinal microbiota, probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20(33):11505-24.
50. Lakatos PL, Szamosi T, Lakatos L. Smoking in inflammatory bowel diseases: Good, bad or ugly? *World J Gastroenterol*. 2007;46(13):6134-9.

51. Mawdsley JE, Rampton DS. Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut*. 2005;54(10):1481-91.
52. Kaplan GG, Hubbard J, Korzenik J, Sands BE, Panaccione R, Ghosh S, et al. The inflammatory bowel diseases and ambient air pollution: a novel association. *The American journal of gastroenterology*. 2010;105(11):2412-9.
53. Yi JM, Kim TO. Epigenetic alterations in inflammatory bowel disease and cancer. *Intestinal research*. 2015;13(2):112-21.
54. Wang W, Jovel J, Halloran B, Wine E, Patterson J, Ford G, et al. Metagenomic analysis of microbiome in colon tissue from subjects with inflammatory bowel diseases reveals interplay of viruses and bacteria. *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21(6):1419-27.