

Francisco Gonçalo Simões Baptista

# A importância do microbiota intestinal na Doença Inflamatória Intestinal

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Diana Jurado Serra Santos Serra e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Francisco Gonçalo Simões Baptista

# A importância do microbiota intestinal na doença inflamatória intestinal

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Diana Jurado Serra Santos Serra e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Francisco Gonçalo Simões Baptista, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n 2011151858, declaro assumir toda a responsabilidade pelo contudo da Monografia apresentada  Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade do Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor,  exceo das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 16 de setembro de 2016.

---

## **Agradecimentos**

À minha orientadora de monografia, Professora Doutora Diana Serra, pelo apoio, orientação, disponibilidade e todo o conhecimento transmitido.

À minha família, que sempre me incentivou para continuar a lutar pelos meus sonhos, pela coragem que me deram para enfrentar os desafios, pela paciência e sobretudo, pelo grande amor e apoio incondicionais.

Aos meus amigos da faculdade e de infância, pelos momentos de diversão, de motivação e inspiração, de alegria, que contribuíram para a pessoa que sou hoje.

A Coimbra, porque “amo-te com a força de quem não te quer ver partir”!

E a Farmácia, por saber que é uma luz que nunca se apagará da minha vida.

O meu mais sincero obrigado.

## Resumo

A doença inflamatória intestinal (DII) é uma patologia crônica, que pode surgir sob dois tipos de apresentação: colite ulcerosa, que é restrita à mucosa do cólon ou do reto, e a doença de Crohn, que pode afetar qualquer porção do trato gastrointestinal, incidindo principalmente sobre o intestino delgado e o cólon. Apesar das contínuas investigações, a sua etiologia continua desconhecida. Contudo, atualmente, considera-se que esta é uma doença multifatorial, resultando de predisposição genética da pessoa, do meio ambiente ou de fatores microbianos que conduzem a uma resposta imunológica intestinal inadequada.

O microbiota intestinal desempenha um papel muito importante no normal funcionamento do sistema digestivo. Vários estudos demonstraram que, a disbiose pode causar inflamação intestinal, característico da DII. Além disso, certas bactérias como a *Escherichia coli*, a *Mycobacterium avium* e a *Campylobacter* podem estar relacionadas com o desenvolvimento da DII.

Não havendo ainda cura para a DII, os tratamentos utilizados visam reduzir os sintomas, melhorar a qualidade de vida dos doentes e permitir uma remissão mais rápida da doença. Das várias terapêuticas existentes, destacam-se os antibióticos e os probióticos por terem uma ação relevante sobre o microbiota intestinal. Ainda assim, a possibilidade de novas terapêuticas têm sido alvo de inúmeras investigações.

**Palavras-chave:** doença inflamatória intestinal, etiologia, disbiose, bactérias, tratamentos.

## Abstract

Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic inflammatory disease, which can appear under two types of presentation: ulcerative colitis, which is restricted to the mucosa of the colon or rectum and Crohn's disease, which can affect any portion of the gastrointestinal tract, affecting mainly the small intestine and the colon. Despite ongoing research, the etiology of IBD remains unknown. However, currently, it is established that IBD is a multifactorial disease resulting from the genetic predisposition of the individual, environmental and microbial factors which lead to an inadequate immune intestinal response.

The intestinal microbiota plays an important role in the normal functioning of the digestive system. Several studies have shown that, dysbiosis can cause intestinal inflammation, typical of IBD. Furthermore, it is possible that some bacteria such as *Escherichia coli*, *Mycobacterium avium* and *Campylobacter*, can be responsible for the development of IBD.

Until now, there is no cure for IBD and treatments aim to reduce symptoms, to improve quality of life of patients and to achieve a faster remission. Of the various existing treatments, two of them have the intestinal microbiota as their main target: antibiotics and probiotics. The possibility of new therapies has been the subject of numerous researches.

**Keywords:** inflammatory bowel disease, etiology, dysbiosis, bacteria, treatments.

## Índice

<b>Resumo</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>2</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>4</b>
<b>1. Introdução Geral</b> .....	<b>5</b>
<b>2. Doença Inflamatória Intestinal</b> .....	<b>5</b>
2.1 Abordagem Histórica.....	6
2.2 Epidemiologia.....	6
2.3 Etiologia .....	7
2.4 Distúrbios na Estrutura e Função da Barreira Intestinal .....	10
2.5 Alteração do Microbiota Intestinal na DII: Causa ou Consequência da Doença? .....	11
2.5.1 Disbiose.....	12
2.5.2 Bactérias Potencialmente Responsáveis por Indução da Inflamação Intestinal .....	13
2.5.2.1 <i>Escherichia coli</i> na DII .....	14
2.5.2.2 <i>Mycobacterium avium</i> na DII .....	15
2.5.2.3 <i>Campylobacter</i> na DII.....	15
<b>3. Terapias Direcionadas contra o Microbiota Intestinal</b> .....	<b>16</b>
3.1 Antibióticos.....	17
3.2 Probióticos.....	18
<b>4. Terapias direcionadas contra alvos terapêuticos novos</b> .....	<b>19</b>
<b>5. Considerações Finais</b> .....	<b>21</b>
<b>Bibliografia</b> .....	<b>22</b>

**Lista de Abreviaturas**

**16 S rRNA** - RNA Ribossomal 16s

**AGCC** - Cadeias Curtas de Ácidos Gordos

**CARD1/CARD2/CARD15** - *Recruitment Domain-Containing Protein 1/2/15*

**CU** - Colite Ulcerosa

**DC** - Doença de Crohn

**DII** - Doença Inflamatória Intestinal

***E. coli*** - *Escherichia coli*

**MAP** - *Mycobacterium avium paratuberculosis*

**NOD2** - *Nucleotide Binding Oligomerization Domain Containing 2*

**SMAD7** - *Mothers against decapentaplegic homolog 7*

**SNC** - Sistema Nervoso Central

**TGF- $\beta$ 1** - Fator de Crescimento Transformante I

**TNF- $\alpha$**  - Fator de Necrose Tumoral alfa



## **I. Introdução Geral**

A doença inflamatória intestinal caracteriza-se por uma inflamação do trato gastrointestinal crônica e recidivante, de incidência crescente e de etiologia ainda não conhecida.

A doença inflamatória intestinal surge como sendo uma patologia que pode ser causada pela associação de diversos fatores. É uma doença para a qual não está definida uma etiologia, pelo que existe uma enorme variedade de estudos que têm vindo a demonstrar a importância da influência genética e dos fatores ambientais, nomeadamente para a doença de Crohn. A barreira intestinal, que desempenha uma função fundamental na defesa do organismo, pode sofrer disfunções que possibilitarão a invasão de bactérias luminais e o desencadeamento de uma inflamação intestinal crônica. Também as bactérias *Escherichia coli*, *Mycobacterium avium* e *Campylobacter* surgem com um papel de destaque neste processo inflamatório, penetrando no epitélio intestinal e debilitando o sistema imunitário, provocando a cronicidade da inflamação.

Não tendo cura e sendo uma doença crônica caracterizada por períodos de recidiva alternados por períodos de remissão, esta patologia tem um impacto económico elevado para o Sistema Nacional de Saúde. Os doentes sofrem um impacto negativo na sua qualidade de vida, tanto no domínio físico, psicológico e social, devido a frequentes hospitalizações, dispendiosos tratamentos e fármacos.

A presente monografia do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas tem como objetivo efetuar uma revisão bibliográfica, de modo a discutir o impacto das alterações do microbiota intestinal na doença inflamatória intestinal, nomeadamente a disbiose e os fatores microbianos, bem como a aplicação de várias terapêuticas e qual o papel do Farmacêutico no controlo desta doença.

## **2. Doença Inflamatória Intestinal**

O termo DII engloba dois tipos principais de patologias: a Doença de Crohn (DC) e a Colite Ulcerosa (CU) (HEAD, K., *et al.*, 2004; HOLD, G. L., *et al.*, 2014). A CU é caracterizada pela existência de uma inflamação, normalmente superficial e restrita à mucosa do cólon e reto (ORDÁS, I., *et al.*, 2012). Por sua vez, na DC, verifica-se uma inflamação transmural que poderá afetar qualquer porção do trato gastrointestinal, desde a boca ao ânus, sendo que as zonas habitualmente mais afetadas são o íleo distal e a região íleo-cecal (HEAD, K., *et al.*, 2004).

## **2.1 Abordagem Histórica**

Embora este assunto não seja consensual, pensa-se que a Doença de Crohn tenha sido descrita pela primeira vez em 1761, pelo anatomista Giovanni Battista Morgagni (1682-1771), que relata um caso de um paciente de 20 anos, do sexo masculino, com enterocolite granulomatosa, que morre por perfuração do íleo terminal (DICKINSON, G.T., GODDEN, J.O., 1964; KIRSNER, J. B., 1995). Mais tarde, em 1859, num caso reportado por Samuel Wilks (1824-1911), foi usado pela primeira vez o termo Colite Ulcerosa (CU) para descrever a morte de uma mulher de 42 anos, em que se verificaram episódios repetidos de diarreia e febre, que se prolongaram durante meses, com envolvimento do cólon e reto (WILKS, S., 1859; *The Secret History of Crohn's Disease – History cooperative*).

Foi, no entanto, o século XX que ficou marcado pela descoberta formal da Doença de Crohn. Embora em 1909, Braun tenha descrito inúmeros casos de doença inflamatória envolvendo o intestino delgado, só em 1932 o médico gastroenterologista Burril Bernard Crohn e os seus dois colegas, Gordon Oppenheimer e Leon Ginzburg, publicam um artigo intitulado “Regional Enteritis, a Pathological and Clinical Entity” na revista “Journal of the American Medical Association” onde relatam formalmente a descoberta da Doença de Crohn, tentando fazer a sua diferenciação relativamente a outras patologias (JOBANPUTRA, S., WEISS, E. G., 2007; KORELITZ, B. I., 1982; ARNOTT, I. D., 2003). Crohn descreve-a como “uma doença do íleo terminal, que afecta principalmente jovens adultos e é caracterizado por uma inflamação sub-aguda ou crónica necrosante e cicatrizante” (KORELITZ, B. I., 1982; ARNOTT, I. D., 2003; MYRELID, P., 2009). No ano de 1954, Erick Brooke, continuando o trabalho iniciado por Crohn, tenta demonstrar que os aspetos clínicos da doença gastrointestinal descrita por Crohn seriam diferentes dos verificados na Colite Ulcerosa, criando uma distinção entre as duas doenças, algo que não foi imediatamente aceite (LOCKHART-MUMMERY, H. E., MORSON, B. C., 1960). Somente cinco anos mais tarde se passa a assumir que a DC e a CU são patologias distintas. O cirurgião H.E. Lockhart-Mummery provou a teoria do Braun ao destacar separadamente os aspetos patológicos típicos da DC e da CU (DICKINSON, G.T., GODDEN, J.O., 1964; KIRSNER, J. B., 1995; LOCKHART-MUMMERY, H. E., MORSON, B. C., 1960).

## **2.2 Epidemiologia**

A incidência da DII aumentou substancialmente nos últimos anos, sendo considerada, atualmente, uma das doenças que afeta o trato gastrointestinal mais prevalentes (LOFTUS, E. V., 2004). Esta doença afeta indivíduos de qualquer idade, apresentando maior incidência em

adolescentes e adultos jovens dos 15 aos 35 anos, e adultos dos 50 aos 70 anos (ANDERSEN, V., et al., 2012).

Estima-se que a incidência e prevalência da DII sejam mais elevadas em países industrializados, como nos países do Norte da Europa ou dos Estados Unidos da América (ANDERSEN, V., et al., 2012; YE, Y., et al., 2015). Atualmente estima-se que existem 1,4 milhões de indivíduos afetados nos EUA e 2,2 milhões na Europa (LOFTUS, E. V., 2004).

De acordo com um estudo de prevalência da DII em Portugal, determinou-se um aumento de 86 doentes por 100.000 habitantes em 2003 para 146 doentes por 100.000 habitantes em 2007. No caso da Colite Ulcerosa, a prevalência aumentou de 42 doentes por 100.000 habitantes em 2003 para 43 doentes por 100.000 habitantes em 2007. Para a Doença de Crohn, a prevalência aumentou de 71 doentes por 100.000 doentes em 2003 para 73 doentes por 100.000 habitantes em 2007 (AZEVEDO, L. F, 2010).

### 2.3 Etiologia

Apesar dos recentes avanços no conhecimento dos mecanismos moleculares subjacentes ao aparecimento da DII, a etiologia da DII ainda não está totalmente esclarecida (ALASTAIR, F., et al., 2011).

Não obstante, existem várias teorias que sugerem que fatores genéticos, imunológicos, bacterianos e ambientais são os mais importantes para determinar o aparecimento desta doença (Figura I) (HART, A. L., Ng, S. C., 2015).

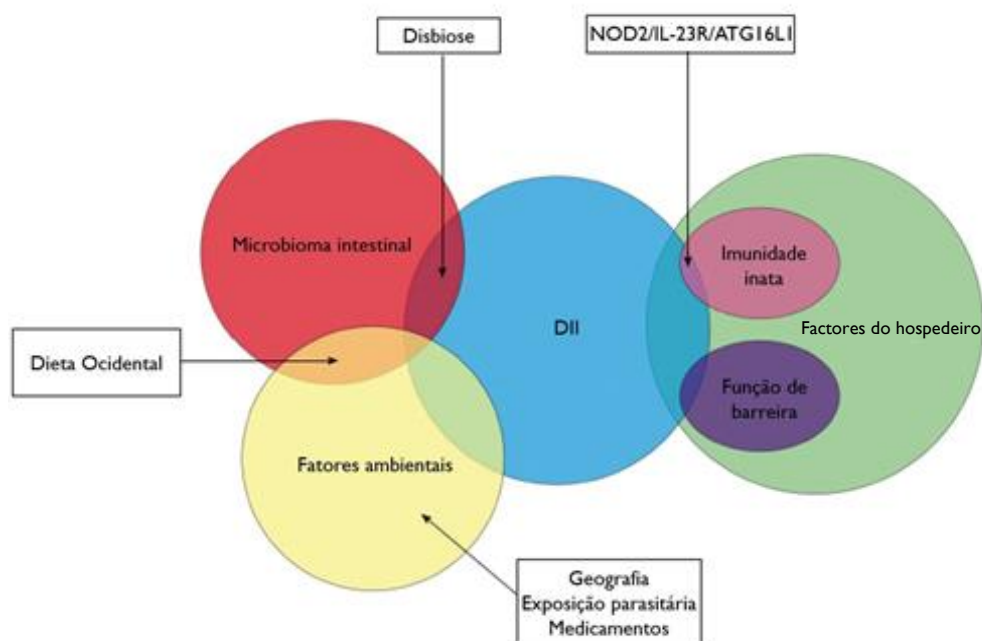


Figura I Etiologia da DII. Adaptado de HOLD, G. L., et al., 2014.

Relativamente à influência genética nesta patologia, a DII é uma doença poligénica complexa, tendo já sido identificado um conjunto de genes associado ao aumento da suscetibilidade de um indivíduo para desenvolver doença (BAUMGART, D. C., CARDING, S. R., 2007).

Estudos realizados com gémeos monozigóticos e com familiares de doentes com DII demonstraram, pela primeira vez, que os fatores genéticos têm grande relevância para o aparecimento da DC (PRESS, D., 2016). O risco de um descendente de primeiro grau com DC na família é cinco vezes superior, com maior probabilidade de ocorrer progressão da doença com idade mais jovem (HRNČÍŘOVÁ, L., et al., 2014).

O primeiro gene a ser identificado no contexto da DII foi o NOD2/CARD15 (*nucleotide binding oligomerization domain containing 2/ recruitment domain-containing protein 15*) gene com 12 exões localizado no cromossoma 16. (JIANZHONG H., 2014).

A proteína NOD2 é um recetor de reconhecimento padrão envolvido na imunidade inata, responsável pelo reconhecimento do dipéptido de muramilo, que é um produto bacteriano derivado do peptidoglicano da parede celular constituinte das bactérias Gram-positivas e negativas. O NOD2 pode ser expresso pelas células de Paneth, embora também possa ser expresso por macrófagos, células dendríticas, células não-Paneth e por linfócitos T (CARD, T., 2006).

Estudos genéticos permitiram a identificação de diversas mutações no gene NOD2/CARD15. O mecanismo responsável pela mutação ainda não está esclarecido. Não obstante, verificou-se que as mutações neste gene contribuem para a deterioração da barreira da mucosa intestinal e, conseqüentemente, da resposta imunológica (HRNČÍŘOVÁ, L., et al., 2014). Somente três polimorfismos comuns em pacientes com DC foram associados a um risco aumentado de desenvolvimento da doença: Arg702Trp (R702W), Gly908Arg (G908R) e L1007fsinsC (3020insC), localizados nos exões 4, 8 e 11, respetivamente (BUHNER, S., 2006).

Recentemente, polimorfismos no gene NOD2 foram associados a disbiose em doentes com DC. Estudos sugerem que distúrbios na expressão de NOD2 pelas células de Paneth conduzem a uma produção diminuída de peptídeos anti-microbianos, permitindo a proliferação de bactérias nas criptas intestinais e tornando a barreira intestinal vulnerável à invasão por microorganismos resultando em disbiose, típica da DII (SARTOR, R. B., MAZMANIAN, S. K., 2012; BOUMA, G., STROBER, W., 2003; FUKATA, M., ARDITI, M., 2013).

De um ponto de vista ambiental, são vários os fatores que podem contribuir para a manifestação da doença, sejam eles o tabagismo, a dieta e o stress.

Como referido anteriormente, a incidência da DII é superior em países industrializados. Algumas propostas apresentadas para a existência de um maior número de casos nestes países estão relacionadas com a hipótese de elevadas condições de higiene e saneamento básico (SARTOR, R. B., 2006).

Através de vários estudos de coorte e meta-análises, verificou-se que também o tabagismo poderá estar relacionado com o aumento do risco de DC (YE, Y., *et al.*, 2015). Estima-se que os indivíduos fumadores possuam um risco 2 a 4 vezes superior de desenvolverem DC em relação a pessoas não fumadoras. Para além disso, somente os ex-fumadores abstinentes por um período superior a 4 anos demonstram ter a mesma probabilidade de vir a desenvolver a doença (apresentando uma evolução clínica semelhante) do que tem os não fumadores (LAKATOS, P., 2007). Relativamente aos consumidores passivos, os dados disponíveis ainda são insuficientes, havendo necessidade de maior investigação nesta área. Contudo, foi realizado um estudo *cohort* que compara a exposição passiva do tabaco por parte de crianças dos 0 aos 5 anos com um grupo controlo, tendo-se verificado que crianças expostas ao fumo apresentavam um maior risco de desenvolver, mais tarde, a DC na zona do íleo-cólon do que crianças não expostas (CHIVESE, T., *et al.*, 2015).

Embora o mecanismo de ação do tabaco ainda seja desconhecido, considera-se que esteja relacionado com o aumento da apoptose das células epiteliais do intestino, com o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (fator de necrose tumoral alfa – TNF- $\alpha$ ), com a redução da proliferação de células T e, finalmente, com a alteração da resposta macrofágica (CHIVESE, T., *et al.*, 2015; RAZANI-BOROUJERDI, S., *et al.*, 2007).

Para além do tabaco, a dieta poderá ser, igualmente, um fator desencadeador da DII. Por exemplo, os polissacarídeos da dieta são metabolizados em ácidos gordos de cadeia curta, como o butirato, propionato, entre outros, pelas bactérias comensais. Contudo, estes ácidos gordos de cadeia curta podem alterar o pH e a permeabilidade do cólon, proporcionando o aparecimento de DII (PRESS, D., 2016). Apesar de ainda não haver resultados conclusivos nestes estudos, é de referir que surgiram alguns indícios de que a ingestão de produtos industrializados e a baixa ingestão de fibras podem contribuir para o aumento de risco de DC (YE, Y., *et al.*, 2015).

O *stress*, já muito conhecido por aumentar o risco de problemas gastrointestinais, pode estar diretamente relacionado com o surgimento desta doença. O trato gastrointestinal possui um sistema nervoso próprio conhecido como sistema entérico. Este, por sua vez, é formado por uma série de células nervosas que possuem ligação com o sistema nervoso central (SNC) e o cérebro. Assim, como o trato gastrointestinal responde a estímulos nervosos, um estado de ansiedade/stress pode conduzir a uma iniciação/reativação de uma

inflamação no intestino e, conseqüentemente, a DII (YE, Y., *et al.*, 2015; SARTOR, R. B., 2006).

Por último, as bactérias são descritas como um possível fator preponderante para o desenvolvimento de DII. Existe, como mencionado acima, idades mais propícias para o início da doença. Nos primeiros anos de vida, o microbiota humano caracteriza-se por ter uma baixa complexidade e estabilidade devido a vários fatores, como mudanças da dieta (da amamentação para alimentos sólidos), doença e puberdade (DOMINGUEZ-BELLO, M.G., *et al.*, 2011). Esta característica, também detetada nos idosos, torna-o vulnerável para a DII (KOSTIC, A. D., *et al.*, 2014). De facto, a ação das bactérias na DII tem sido um assunto muito discutido pelos cientistas como possível causa para o aparecimento desta patologia. Uma das evidências que levou à sua investigação foi a elevada concentração de bactérias nos locais das lesões com úlceras aftosas (característica de estágios iniciais da doença) (PRESS, D., 2016). Inúmeros estudos têm sido realizados com o objetivo de encontrar uma bactéria responsável pela doença, ou que lhe esteja associada, nomeadamente a *Escherichia coli*, a *Mycobacterium* e a *Campylobacter* (BOSCA-WATTS, M. M., 2015).

#### **2.4 Distúrbios na Estrutura e Função da Barreira Intestinal**

A barreira intestinal representa a principal estrutura física contra a invasão bacteriana. Contudo, disfunções nesta barreira poderão possibilitar a invasão por bactérias luminais, podendo desencadear-se uma inflamação intestinal crónica.

A parede intestinal possui quatro camadas: mucosa, submucosa, camada muscular e serosa. A camada de muco, formada através da polimerização de mucinas, é responsável por manter a barreira intacta, pois tem a forma de um gel que se expande ao longo do lúmen que protege o epitélio e impede a invasão de bactérias (GEREMIA, A., *et al.*, 2014). A polimerização de mucinas é controlada pela expressão de mucina MUC1 (BAUMGART, D. C., SANDBORN, W. J., 2012). No caso de pessoas afetadas com doença de Crohn, a expressão da mucina MUC1 está diminuída, predispondo a um aumento da adesão e invasão por bactérias luminais (BAUMGART, D. C., SANDBORN, W. J., 2012).

A segunda linha de defesa à invasão bacteriana situa-se no interior da camada da mucosa, conhecido como epitélio intestinal. Esta barreira é constituída por enterócitos epiteliais e células especializadas, como células caliciformes e células de Paneth, e a sua integridade é mantida por junções ocludentes, junções de adesão e desmossomas que formam o complexo de junção intercelular apical. Estudos recentes associaram, também, uma alteração desta

barreira à DII, embora não se tenha concluído se representa uma causa ou uma consequência da patologia (SALIM, S. Y., SÖDERHOLM, J. D., 2011).

Para além das duas linhas de defesa à invasão bacteriana mencionadas, as células epiteliais podem libertar defensinas (as  $\alpha$ -defensinas são produzidas pelas células de Paneth e as  $\beta$ -defensinas são produzidas pelas células epiteliais não Paneth) (WEHKAMP, J., et al., 2003; WEHKAMP, J., et al., 2005). As defensinas são pequenas proteínas catiónicas que atuam contra bactérias, fungos e vírus encapsulados, através da penetração na membrana celular (COURTH, L. F., et al., 2015). Tendo-se verificado, em biópsias provenientes de doentes com DC, baixos níveis de defensinas, pensa-se que a sua secreção pelas células epiteliais possa estar comprometida nestes doentes (WEHKAMP, J., et al., 2003). Uma das teorias propostas para explicar essa secreção diminuída apresenta a hipótese de existir uma perturbação na expressão de  $\alpha$ -defensinas pelas células de Paneth. Uma causa apresentada para justificar esta perturbação foi uma mutação no gene NOD2, o qual, sendo um dos responsáveis pela regulação da expressão de  $\alpha$ -defensinas, poderia estar diretamente relacionado com o seu défice (WEHKAMP, J., et al., 2005).

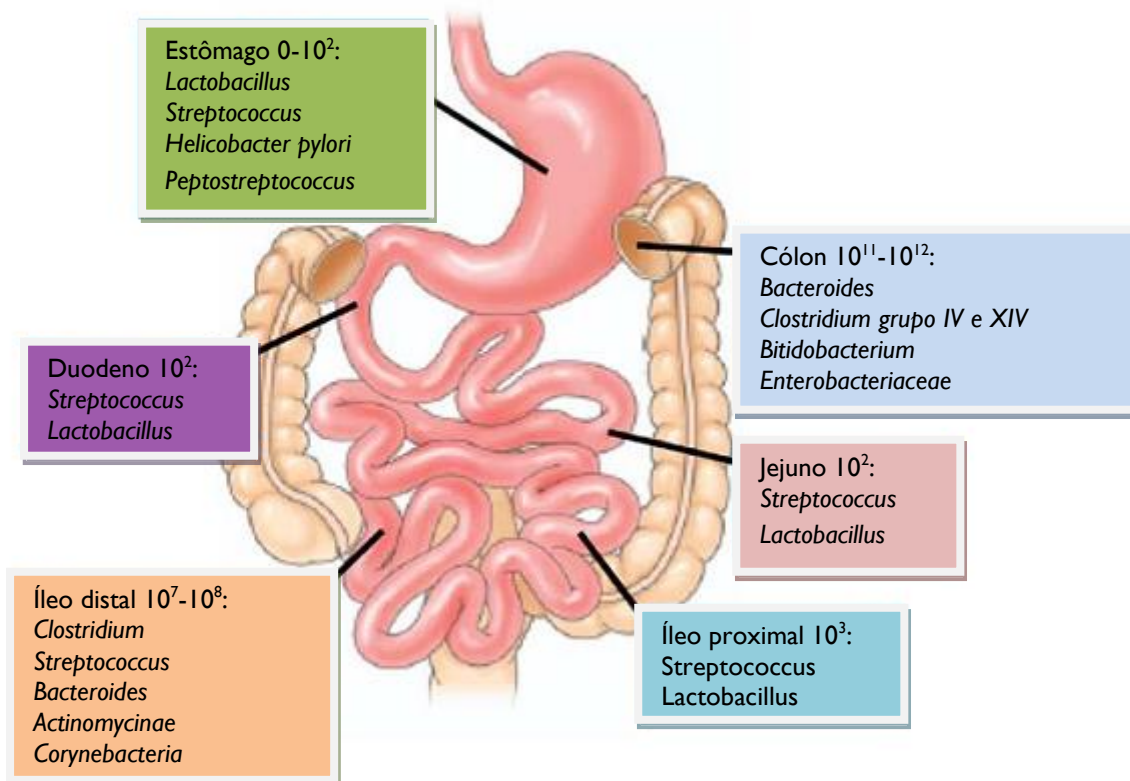
## **2.5 Alteração do Microbiota Intestinal na DII: Causa ou Consequência da Doença?**

O corpo humano é constituído por mais de 100 triliões de microorganismos, principalmente bactérias, sendo a proporção, relativamente à quantidade das células hospedeiras, de 10:1 (MADIGAN, T. M. et al., 2006).

O trato gastrointestinal é colonizado por diferentes espécies de microorganismos, coletivamente denominado por microbiota intestinal (Figura 2) (SARTOR, R. B., MAZMANIAN, S. K., 2012). O microbiota intestinal estabelece com o hospedeiro uma relação simbiótica contribuindo para o normal funcionamento do sistema digestivo, nomeadamente na digestão, absorção e armazenamento de nutrientes, para a prevenção da colonização por agentes patogénicos e também, por exemplo, para a estimulação da secreção de substâncias antimicrobianas. De facto, vários estudos apontam para que o microbiota intestinal seja essencial para a homeostase do intestino, afetando múltiplas facetas da imunidade do hospedeiro (BROOKS, G. F. et al., 2004).

Em situações fisiológicas, a flora intestinal de um indivíduo é, habitualmente, constituída pelos filos *Firmicutes* (64%) e *Bacteroidetes* (23%), sendo que os filos *Proteobacteria* e *Actinobacteria* estão presentes em menor percentagem. Em condições normais, poderão ocorrer pequenas alterações das proporções e da estabilidade destas bactérias devido a

vários fatores como: dieta, viagens, meio ambiente, antibióticos e tabaco (LOZUPONE, C. A. et al., 2012).



**Figura 2** Composição e quantidade das espécies bacterianas predominantes ao longo das regiões do trato gastrointestinal. Adaptado de SARTOR, R. B., MAZMANIAN, S. K., 2012.

Em situações patológicas, como na DII, têm-se observado alterações profundas no microbiota intestinal relacionadas com mecanismos como: disbiose intestinal, indução de inflamação intestinal por patógenos, alterações genéticas que conduzem a disbiose e imunorregulação deficitária (SARTOR, R. B., MAZMANIAN, S. K., 2012).

### 2.5.1 Disbiose

A disbiose intestinal define-se como o desequilíbrio da flora intestinal entre os microorganismos benéficos e patogênicos, originando uma situação prejudicial à saúde do indivíduo. É um processo que se caracteriza pela modificação da composição da flora intestinal, redução da diversidade bacteriana, expansão de patobiontes e alteração da capacidade funcional microbiana (BUTTÓ, L. F., et al., 2015). Este desequilíbrio pode ser causado por fatores genéticos, estilos de vida (dieta ou stress), histórico de infecções, padrões de higiene/alergias e antibióticos (BUTTÓ, L. F., et al., 2015).



Através de estudos de metagenomas (ou 16 S rRNA), demonstrou-se uma diminuição da quantidade de diversas espécies existentes no microbiota intestinal de doentes com DC, nomeadamente de *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, ambas conhecidas pela sua ação benéfica para a homeostase da microflora intestinal, quando comparada com indivíduos controlo (BOSCAWATTS, M. M., 2015; MATSUOKA, K., KANAI, T., 2014; TAMBOLI, C. P., 2004). Alguns autores destacam, de um modo característico, a redução de bactérias pertencentes à ordem *Clostridiales*, tais como *Faecalibacterium prausnitzii*, na mucosa ileal e no cólon de indivíduos com DC. Esta bactéria possui propriedades anti-inflamatórias e pensa-se que pode ter um papel protetor ou terapêutico para a prevenção ou tratamento da DC (WRIGHT, E. K., et al., 2015).

A disbiose desempenha um papel muito importante na DC, um vez que a diminuição de bactérias produtoras de butirato, um ácido gordo de cadeia curta (AGCC), tem consequências diretas no meio ambiente intestinal, designadamente a diminuição da sobrevivência dos enterócitos, aumento da produção de citocinas inflamatórias e a diminuição da eliminação de *Proteobacteria* (agente potencialmente patogénico). As espécies bacterianas anaeróbias facultativas do *Proteobacteria* tendem a ser mais resistentes a espécies reativas de oxigénio produzidas durante a inflamação, dando-lhes uma vantagem seletiva sobre os anaeróbios predominantemente obrigatórios de *Firmicutes* e *Bacteroides* (OBERC, A., COOMBES, B. K., 2015).

Chow e Mazmanian definiram o termo patobionte como um simbiote que é capaz de promover uma patologia somente quando as condições ambientais ou genéticas no hospedeiro sofrem alterações. Enquanto que normalmente os patobiontes são encontrados em pequena quantidade no conjunto de microorganismos, em situações de disbiose, eles aumentam em número e causam doença em indivíduos suscetíveis (BUTTÓ, L. F., et al., 2015).

### **2.5.2 Bactérias Potencialmente Responsáveis por Indução da Inflamação Intestinal**

Alguns microrganismos têm sido propostos como potenciais agentes na patogénese da DII, nomeadamente a *Chlamydia trachomatis*, *Listeria monocytogenes*, a *Saccharomyces cerevisiae* e a *Pseudomonas matophila* (LAKATOS, P.L., et al., 2006; LIVERANI, E., et al., 2014). Embora este assunto ainda não esteja completamente esclarecido, pensa-se que a *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP), a *Escherichia coli* aderente-invasiva e a *Campylobacter* sejam as bactérias mais prováveis de se poderem relacionar com esta patologia (LAKATOS, P.L., et al., 2006).

### 2.5.2.1 *Escherichia coli* na DII

A *E. coli* é uma bactéria anaeróbia facultativa do tipo Gram-negativo, normalmente presente no trato gastrointestinal, que assume um papel importante na manutenção da homeostase do intestino e da estabilidade na flora microbiana luminal (BOSCA-WATTS, M. M., 2015; OBERC, A., COOMBES, B. K., 2015).

Contudo, algumas estirpes desta bactéria foram adquirindo fatores de virulência específicos, como toxinas, adesinas e sistemas de secreção, resultando no desenvolvimento de características patogênicas que participam em processos de DII (OBERC, A., COOMBES, B. K., 2015). Entre essas estirpes, existem seis grupos que já estão bem caracterizados: *E. coli* difusamente aderente, *E. coli* enteroagregativa, *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteroinvasiva, *E. coli* enteropatogênica e *E. coli* enterotoxigênica (LAPAQUETTE, P., et al., 2010).

Num estudo conduzido por Darfeuille-Michaud et al em pacientes com doença de Crohn, foi demonstrado que a bactéria *E. coli* estava presente nas biópsias ileais dos doentes, constituindo entre 50% a 100% do número total de bactérias aeróbias e anaeróbias presentes em ambas as lesões ileais precoces e crônicas (DARFEUILLE-MICHAUD, A., et al., 2004). Verificou-se que esta bactéria não possuía os fatores de virulência típicos de *E. coli* patogênicas, embora fosse igualmente virulenta (OBERC, A., COOMBES, B. K., 2015; KAAKOUSH, N. O., et al., 2012). Esta nova estirpe possuía a capacidade de aderir às células epiteliais do intestino através da polimerização de actinas e microtúbulos, e de sobreviver e replicar-se no citoplasma da célula hospedeira após a lise do vacúolo endocítico, sem induzir a morte celular. Deste modo, conseguia replicar-se de forma contínua e ativar células do sistema imunológico, estimulando a liberação de TNF- $\alpha$  e a formação de granulomas, características presentes na DC (HOLD, G. L., et al., 2014). Estas propriedades, tão diferentes das estirpes já caracterizadas, conduziram o grupo do investigador Darfeuille-Michaud a propor uma nova estirpe patogênica: *Escherichia coli* Aderente-Invasiva (AIEC). Dentro desta estirpe, a mais estudada pelos investigadores é a estirpe de referência LF82 (TAWFIK, A., et al., 2014).

Estudos posteriores vieram reforçar a relação entre a AIEC e a DC, mencionando que, em indivíduos que manifestavam a patologia, a mucosa ileal apresentava 36,4% de *Escherichia coli* Aderente-Invasiva e o cólon 3,7% (BOSCA-WATTS, M. M., 2015).

Embora esta bactéria pareça estar fortemente relacionada com a DII, até hoje ainda não está esclarecido se é um agente causador da doença ou um agente que contribui para o seu desenvolvimento.

### 2.5.2.2 *Mycobacterium avium* na DII

A *Mycobacterium avium* é uma bactéria Gram-positiva, patogénica obrigatória intracelular, ácido-resistente e dependente da micobactina (uma substância lipossolúvel que permite a utilização de ferro) para a sua replicação (EUROPE, W., 2002; LIVERANI, E., et al., 2014).

A MAP tem vindo a ser relacionada com a DC desde as suas primeiras descrições em 1913, sendo alvo de inúmeras investigações com o objetivo de esclarecer a sua relação com a doença. Esta bactéria é responsável pela doença de Johne, uma enterite infecciosa crónica em ruminantes com características semelhantes à DII (LIVERANI, E., et al., 2014).

Vários estudos têm demonstrado uma maior prevalência desta bactéria em indivíduos com DC em relação a pacientes com CU ou indivíduos saudáveis, infetando especificamente tecidos lesionados, sangue e leite materno dos doentes (BARNICH, N., 2007).

A MAP tem a capacidade de invadir células epiteliais do intestino, induzindo danos nos tecidos e inflamação. Vários estudos referem, também, que os macrófagos infetados com a MAP viável estão associados a uma elevada produção do fator de necrose tumoral – alfa (TNF- $\alpha$ ), o qual é um marcador da doença de Crohn (OBERC, A., COOMBES, B. K., 2015).

Até ao momento presente, ainda não existem estudos que comprovem que a MAP é responsável pelo desenvolvimento da DC. A deteção do DNA de MAP no sangue e tecido intestinal de pacientes com DC sugere o envolvimento desta bactéria na ocorrência desta patologia (LIVERANI, E., et al., 2014). A presença desta bactéria em doentes com DC poderá ser explicada pelo aumento da permeabilidade intestinal e/ou incapacidade por parte dos macrófagos em eliminar a MAP nestes doentes (LIVERANI, E., et al., 2014). Não obstante, ainda não está totalmente esclarecido se esta bactéria é um agente causador de DC ou se somente coloniza a mucosa depois desta já estar inflamada (NASER, S. A., 2014).

### 2.5.2.3 *Campylobacter* na DII

*Campylobacter* é um género de bactérias Gram-negativas, inicialmente descrito em 1886, por Theodore Escherich (EPPS, S., et al., 2013). A sua relação com as doenças inflamatórias intestinais é recente, sendo a *Campylobacter jejuni* a causa principal de gastroenterite em todo o mundo devido à sua capacidade de ligar e penetrar o epitélio intestinal (EPPS, S., et al., 2013). As espécies de *Campylobacter* encontradas em doentes com DC são: *C. concisus*, *C. showae*, *C. hominis*, *C. gracilis*, *C. rectus*, *Campylobacter ureolyticus* e *C. jejuni* (BOSCA-WATTS, M. M., 2015).

Estudos demonstram que o risco de desenvolver DII é elevado no primeiro ano após ser obtido um resultado positivo para infecção por *Campylobacter*. Este risco continua em níveis elevados até dez anos após o início da infecção (BOSCA-WATTS, M. M., 2015).

Estudos recentes têm demonstrado que o DNA e os níveis de IgG do *Campylobacter concisus* estão presente em quantidades elevadas em pacientes com DC com idades mais jovens (HOLD, G. L., et al., 2014). Alguns estudos sugerem que esta bactéria tem a capacidade de colonizar e aderir ao epitélio intestinal, causando danos e degradação do microvilos (BOSCA-WATTS, M. M., 2015; ZHANG, L., 2014). Esta espécie tem maior prevalência no cólon de pacientes adultos, embora também esteja presente no íleo, ceco e reto (MAN SM, et al., 2010).

Outro estudo recente demonstrou que o *C. jejuni*, por sua vez, promove a translocação de bactérias luminas comensais. Este processo foi, inicialmente, considerado essencial para a tolerância imunológica na mucosa do trato gastrointestinal. No entanto, eventualmente percebeu-se que poderia, na realidade, afetar a resposta normal da mucosa ao microbiota intestinal, despoletando uma resposta inflamatória no intestino (HOLD, G. L., et al., 2014; OBERC, A., COOMBES, B. K., 2015).

### 3. Terapias Direcionadas contra o Microbiota Intestinal

Dado ainda não existir cura para a DII, as estratégias utilizadas no tratamento desta doença visam reduzir a inflamação, controlar os sintomas e complicações e manter a remissão da doença, com o mínimo de efeitos colaterais e o menor custo.

O tratamento selecionado para cada doente depende da localização e gravidade da doença, das complicações e da resposta ao tratamento anteriormente utilizado. Em casos muito graves, poderá haver necessidade de se recorrer a cirurgia com o objetivo de melhorar a qualidade de vida do doente (WRIGHT, E. K., et al., 2015).

A cirurgia poderá ser realizada por dois motivos principais: intratabilidade clínica ou complicações da doença. A primeira razão é a mais frequente e acontece como resultado da dificuldade no controlo dos sintomas com doses máximas de medicação ou da existência de efeitos colaterais importantes do tratamento clínico (HWANG, J.M., VARMA, M.G., 2008). Quanto às complicações agudas da DII, estas podem ser diversas, nomeadamente: abscessos abdominais, abscessos anais, oclusão intestinal, megacólon tóxico e hemorragia (STRONG, S. A., 2007). Evidências demonstram que as recidivas pós operatórias são frequentes e, por isso, a extensão e a gravidade da doença devem ser analisadas cautelosamente, antes de se realizar a cirurgia (SANTOS, J.R., J.C.M., 1999).

As terapias mais usadas para o tratamento da DII incluem agentes anti-inflamatórios (por exemplo, amino-salicilatos como o 5-ASA), fármacos imunossupressores (como os corticosteróides) e antibióticos. Devido aos avanços que têm sido alcançados relativamente ao conhecimento da fisiopatologia da DII, têm-se surgido nos últimos anos novas opções terapêuticas, nomeadamente os probióticos com o objetivo de combater o desequilíbrio microbiano intestinal (PRESS, D., 2016).

### **3.1 Antibióticos**

Os diversos estudos que têm vindo a demonstrar a importância da flora bacteriana na DII tornaram os antibióticos um dos métodos farmacológicos a utilizar no tratamento desta doença. Os antibióticos apresentam mais vantagens relativamente a outras terapêuticas existentes, uma vez que, modificando a flora bacteriana, podem ser utilizados para combater o desequilíbrio microbiano intestinal (CARRIÈRE, J., 2014). São, então, nomeadamente utilizados no tratamento de fístulas, abscessos abdominais, crescimento anormal bacteriano e em doenças perianais (CARRIÈRE, J., 2014).

Considerando os mecanismos de ação dos antibióticos mais utilizados no tratamento da DII, estes medicamentos serão responsáveis pela inibição das bactérias patogénicas, pela redução do número total de bactérias intestinais ou pela diminuição da estimulação antigénica do sistema imunitário da mucosa intestinal, sendo, por isso, usados como tratamento primário ou de infeções intercorrentes (HOLD, G. L., *et al.*, 2014).

Os antibióticos mais usados na DII são o metronidazol e ciprofloxacina. Estes fármacos podem ajudar na redução da má absorção, da distensão gasosa e da flatulência causadas pelo elevado crescimento bacteriano. No entanto, a longo prazo, o aparecimento de efeitos adversos sistémicos limita a sua administração (MATSUOKA, K., KANAI, T., 2014).

O metronidazol é um fármaco de primeira linha em infeções gastrointestinais, destinado ao tratamento de parasitoses intestinais, infeções por anaeróbios e, devido às suas propriedades anti-inflamatórias, é, também, usado no tratamento da doença perianal e no retardamento das recidivas pós-cirúrgicas da DC. Contudo, a sua utilização mais prolongada leva a efeitos adversos leves e moderados, como dor muscular, fraqueza, náuseas, dor de cabeça, infeção por fungos ou diminuição de apetite (PRESS, D., 2016; SCRIBANO, M. L., 2013).

Vários artigos referem a eficácia da ciprofloxacina no tratamento de DC, sendo considerada na terapêutica de doentes intolerantes ao metronidazol e, em pessoas com DC resistente, é combinada com tratamentos considerados convencionais (CARRIÈRE, J., 2014).

De referir que, apesar da elevada tolerância que lhe está associada, não apresenta efeitos significativos na remissão da DC. (OBERC, A., COOMBES, B. K., 2015).

Evidências demonstraram que o uso frequente de antibióticos aumenta o risco de infeção por *Clostridium difficile* (PRESS, D., 2016).

### 3.2 Probióticos

A utilização de probióticos no tratamento da DII surgiu a partir de evidências que demonstraram que a disbiose estava subjacente à patogénese da DC.

Os probióticos são microorganismos benéficos que, quando ingeridos, podem influenciar a composição da flora intestinal, a atividade metabólica e a imunomodulação, conduzindo a efeitos favoráveis para o hospedeiro devido à sua capacidade de sobreviver aos movimentos peristálticos. Estes microorganismos podem alterar a diversidade microbiana por inibição competitiva de outras bactérias, aumentar a função da barreira da mucosa através da produção de ácidos gordos de cadeia curta (AGCC), interagir com a mucosa intestinal de um doente com doença de Crohn estimulando uma resposta anti-inflamatória, e alterar a regulação do sistema imunitário através da estimulação da secreção da imunoglobulina IgA ou da redução na produção de TNF- $\alpha$  (HOLD, G. L., et al., 2014; LICHTENSTEIN, L., et al., 2016).

Os probióticos mais utilizados no tratamento de Doenças Inflamatórias Intestinais são o *Lactobacillus sp.*, *Bifidobacterium sp.*, *Saccharomyces boulardii*, *E. coli* Nissle 1917 e VSL#3 (WRIGHT, E. K., et al., 2015).

Um estudo in vitro sobre a ação do probiótico *E. coli* Nissle 1917 demonstrou os efeitos benéficos deste probiótico através da inibição da produção de IL-8 por células intestinais epiteliais, estimulados por TNF- $\alpha$ . Outro estudo, em doentes com DC, demonstrou que o probiótico *E. coli* Nissle 1917 levou a uma remissão mais rápida da doença, comparativamente a indivíduos não tratados (CARRIÈRE, J. (2014); MATSUOKA, K., KANAI, T., 2014); KAMADA, N., et al., 2007).

Pesquisas realizadas com o intuito de associar a levedura *Saccharomyces boulardii* com a DC comprovaram que a utilização concomitante deste probiótico com a mesalazina conduzia a melhores resultados na remissão da doença do que apenas a utilização da mesalazina (ISAACS K, HERFARTH H., 2008).

VSL#3 é uma preparação liofilizada contendo oito bactérias diferentes: *Lactobacillus acidophilus*, *L.bulgaricus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium breve*, *B. infantis* e *B.longum*. O mecanismo de ação deste probiótico ainda não está totalmente

esclarecido mas pensa-se que leva a um aumento das células T reguladoras no intestino (MATSUOKA, K., KANAI, T., 2014).

A *Lactobacillus rhamnosus* GG tem sido associada a uma melhoria da mucosa intestinal provocada por um aumento da resposta imunitária das IgA, embora os resultados ainda não sejam conclusivos (HEAD, K., et al., 2004).

Atualmente, os probióticos estão mais recomendados na CU relativamente à DC, mostrando eficácia na indução e manutenção da remissão (PRESS, D., 2016).

#### **4. Terapias direccionadas contra alvos terapêuticos novos**

As DII são uma doença multifactorial resultante da combinação da predisposição genética, fatores ambientais, disbiose e imunorregulação deficitária. Porém, inúmeros fatores ainda necessitam de ser investigados e esclarecidos, como a sua etiologia.

Atualmente, estão disponíveis alguns tratamentos para alívio de sintomas da DII, mas nenhum apresenta propriedades curativas. Para além disso, acresce o facto destas terapêuticas possuírem muitos efeitos adversos, custos elevados e acesso dificultado, o que se traduz num risco de não-adesão à terapêutica para os doentes. Um conhecimento cada vez mais aprofundado do microbioma na DII leva a que estejam a ser desenvolvidos novos tratamentos (KOSTIC, A. D., et al., 2014).

Estudos recentes demonstraram que a terapia anti-TNF, isolada ou associada com um imunossupressor é um dos tratamentos mais eficazes no tratamento da DII. É fundamental uma pesquisa continuada que possa levar ao desenvolvimento de novas moléculas que reduzam o risco de infeção ou que curem por completo a doença (PRESS, D., 2016).

Moléculas como Vedolizumab melhoram a imuno-modulação específica do intestino e o perfil de segurança. Outras moléculas, como o Ustekinumab, também demonstraram bons resultados aos doentes intolerantes à terapia anti-TNF. Contudo, deverão ser consideradas novas moléculas, como anti-MAdCAM, anticorpos anti-IL-23 e moléculas com ação sobre SMAD7 (PRESS, D., 2016).

Os estudos mais recentes demonstraram que a inflamação intestinal associada à DC provém da diminuição da citocina imunossupressora fator de crescimento transformante (TGF- $\beta$ 1). No processo inflamatório, há produção de TGF- $\beta$ 1 pelos macrófagos, a qual inibe a proliferação das células T e os macrófagos, reduzindo, assim, a resposta inflamatória gerada. Contudo, o aumento de uma proteína intracelular que se liga ao recetor da TGF- $\beta$ 1, a SMAD7, provoca a degradação da citocina imunossupressora fator de crescimento transformante (TGF- $\beta$ 1), resultando na exacerbação da inflamação verificada na doença de

Crohn (SANJABI, S., *et al.*, 2009; ARDIZZONE, S., *et al.*, 2016). Recentemente, a possibilidade de existirem moléculas com ação sobre a SMAD7 tem suscitado a atenção de muitos investigadores. Neste contexto, está a ser desenvolvido o *mongersen*, um oligonucleotídeo que tem como alvo o mRNA do SMAD7, levando à diminuição dos níveis proteicos do SMAD7 (ARDIZZONE, S., *et al.*, 2016).



## **5. Considerações Finais**

Há cada vez mais evidências de que a incidência da DII tem vindo a aumentar mundialmente, inclusive em Portugal.

Existem estudos que já indiciam a disbiose, que se caracteriza pelo desequilíbrio da flora intestinal entre os microorganismos entéricos e patogénicos, como uma das principais causas da inflamação intestinal. Os fatores genéticos, o estilo de vida adotado (ao nível de dieta ou stress), o histórico de infeções, os padrões de higiene e de alergias que a pessoa apresenta, e os antibióticos são alguns dos fatores apresentados como responsáveis pela modificação da flora intestinal. No entanto, a etiologia da doença ainda é desconhecida, pelo que todos estes dados devem ser alvo de futuras investigações com a finalidade de aprofundar os conhecimentos existentes.

Na última década, o tratamento da DII evoluiu bastante, com o aparecimento de diversos fármacos destinados a bloquear componentes específicos da inflamação intestinal, como o Anti-TNF. Apesar das vantagens dos tratamentos convencionais, que reduzem as crises agudas e prolongam a remissão da doença, os novos fármacos são importantes para tratar as apresentações moderadas a graves da DII. Entre as novas terapêuticas já inseridas no mercado, destaca-se o Vedolizumab e o Ustekinumab, que apresentam resultados promissores no tratamento desta patologia. A molécula mais recente a ser estudada, e que parece ser bastante promissora, é destinada mais especificamente à DC e passa pela diminuição da quantidade da proteína intracelular SMAD7, um dos responsáveis pela exacerbação da inflamação.

Os tratamentos já existentes para a DII ajudam a aliviar os sintomas. Contudo, devido aos efeitos adversos e aos custos elevados que lhes estão associados, surge alguma insatisfação por parte dos doentes, que se pode traduzir numa não adesão à terapêutica. Assim, a intervenção do farmacêutico comunitário é imperativa no aconselhamento, na garantia da adesão e no acompanhamento a esses doentes. O farmacêutico deve evidenciar como o tratamento é fundamental para melhorar a qualidade de vida do doente e como o seu seguimento rigoroso pode evitar a ocorrência de complicações da doença ou recidivas.

A contribuição do farmacêutico, enquanto profissional de saúde, tem sido fundamental nos avanços que se têm verificado na investigação desta patologia, tendo um papel fulcral no desenvolvimento de novos tratamentos e no esclarecimento dos mecanismos desta patologia.

## Bibliografia

ALASTAIR, F., et al. (2011). *Nutrition in Inflammatory Bowel Disease*. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, 35, 571-580.

ANDERSEN, V., et al. (2012). *Diet and risk of inflammatory bowel disease*. Digestive and Liver Disease, 44, 185-194.

ARDIZZONE, S., et al. (2016). *Mongersen, an oral Smad7 antisense oligonucleotide, in patients with active Crohn's disease*. Therapeutic Advances in Gastroenterology, 9, 527-532.

ARNOTT, I. D. (2003). *Crohn's disease or Crohn's diseases?* Gut, 52, 460-461.

AZEVEDO, L. F., et al. (2010). *Estimating the prevalence of inflammatory bowel disease in Portugal using a pharmaco-epidemiological approach*. Pharmacoepidemiology and Drug Safety, 19:499-510.

BARNICH, N. (2007). *Role of bacteria in the etiopathogenesis of inflammatory bowel disease*. World Journal of Gastroenterology, 13, 5571.

BAUMGART, D. C., CARDING, S. R. (2007). *Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology*. The Lancet, 369,1627-1640.

BAUMGART, D. C., SANDBORN, W. J. (2012). *Crohn's disease*. The Lancet, 380, 1590-1605.

BOSCA-WATTS, M. M. (2015). *Pathogenesis of Crohn's disease: Bug or no bug*. World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology, 6, 1.

BOUMA, G., STROBER, W. (2003). *The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease*. Nat Rev Immunol, 3, 521-533.

BROOKS, G. F. et al. (2004) *Normal Microbial Flora of the Human Body*. In: Brooks, G. F. et al. (Eds.). Medical Microbiology, 23ª Edição. Mcgraw-Hill Education, pp. 198-199.

BUHNER, S. (2006). *Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation?* Gut, 55, 342-347.

BUTTÓ, L. F., et al. (2015). *Mechanisms of Microbe–Host Interaction in Crohn's Disease: Dysbiosis vs. Pathobiont Selection*. Front. Immunol, 6:555.

CARD, T. (2006) *Mechanisms of Disease : pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis*. Nature Clinical Practice: Gastroenterology & Hepatology. Vol. 3, NO 7.

- CARRIÈRE, J. (2014). *Infectious etiopathogenesis of Crohn's disease*. World Journal of Gastroenterology, 20, 12102.
- CHIVESE, T., et al. (2015). *The Influence of Second-Hand Cigarette Smoke Exposure during Childhood and Active Cigarette Smoking on Crohn's Disease Phenotype Defined by the Montreal Classification Scheme in a Western Cape Population, South Africa*. PLOS ONE, 10, e0139597.
- COURTH, L. F., et al. (2015). *Crohn's disease-derived monocytes fail to induce Paneth cell defensins*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 112, 14000-14005.
- DARFEUILLE-MICHAUD, A., et al. (2004). *High prevalence of adherent-invasive Escherichia coli associated with ileal mucosa in Crohn's disease*. Gastroenterology, 127, 412-421.
- DICKINSON, G.T.; GODDEN, J.O. (1964). *Idiopathic Inflammatory Disease of the Intestine*. Canada. Canadian Medical Association, v. 91, n.1, p. 40-41
- DOMINGUEZ-BELLO, M.G., et al. (2011). *Development of the human gastrointestinal microbiota and insights from high-throughput sequencing*. Gastroenterology 2011;140:1713–1719.
- EPPS, S., et al. (2013). *Foodborne Campylobacter: Infections, Metabolism, Pathogenesis and Reservoirs*. International Journal of Environmental Research and Public Health, 10, 6292-6304.
- EUROPE, W., (2002). *Crohn's disease caused by Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis: a public health tragedy whose resolution is long overdue*. Journal of Medical Microbiology, 51, 3-6.
- FUKATA, M., ARDITI, M. (2013). *The role of pattern recognition receptors in intestinal inflammation*. Mucosal Immunol, 6, 451-463.
- GEREMIA, A., et al. (2014). *Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease*. Autoimmunity Reviews, 13, 3-10.
- HART, A. L., Ng, S. C. (2015). *Crohn's disease*. Medicine, 43, 282-290.
- HEAD, K., et al. (2004). *HR*, 9: 360-401.
- HOLD, G. L., et al. (2014). *Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis : What have we learnt in the past 10 years?*, 20, 1192–1210.
- HRNČÍŘOVÁ, L., et al. (2014). *Review articles Crohn's disease : a role of gut microbiota and nod2 gene polymorphisms in disease pathogenesis*. 57:89-96.

- HWANG, J.M., VARMA, M.G. (2008). *Surgery for inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol; 14:2678-2690.
- ISAACS K, HERFARTH H. (2008). *Role of probiotic therapy in IBD*. Inflammatory Bowel Disease. 14:1597–605.
- JIANZHONG H. (2014). *The Genetic Predisposition And The Interplay Of Host Genetics And Gut Microbiome In Crohn's Disease* NIH Public Access, 34, 763-770.
- JOBANPUTRA, S., WEISS, E. G. (2007). *Strictureplasty*, 1, 294-302.
- KAAKOUSH, N. O., et al. (2012). *Microbial Dysbiosis in Pediatric Patients with Crohn's Disease*. Journal of Clinical Microbiology, 50, 3258-3266.
- KAMADA, N., et al. (2007). *Nonpathogenic Escherichia coli Strain Nissle 1917 Inhibits Signal Transduction in Intestinal Epithelial Cells*. Infection and Immunity, 76, 214-220.
- KIRSNER, J. B. (1995). *The Historical Basis of the Idiopathic Inflammatory Bowel Diseases*. Inflammatory Bowel Diseases, 1, 2-26.
- KOSTIC, A. D., et al. (2014). *The Microbiome in Inflammatory Bowel Disease : Current Status*. Gastroenterology, 146, 1489-1499.
- LAKATOS, P.L., et al. (2006). *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, 12, 1829-41.
- LAKATOS, P. (2007). *Smoking in inflammatory bowel diseases: Good, bad or ugly?* World Journal of Gastroenterology, 13, 6134.
- LAPAQUETTE, P., et al. (2010). *Crohn's disease-associated adherent-invasive E.coli are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly*. Cellular Microbiology, 12, 99-113.
- LICHTENSTEIN, L., et al. (2016). *Probiotics and prebiotics in Crohn's disease therapies*. Best Practice Research Clinical Gastroenterology, 30, 81-88.
- LIVERANI, E., et al. (2014). *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in the etiology of Crohn's disease, cause or epiphenomenon ?*. 20, 13060-13070.
- LOCKHART-MUMMERY, H. E., MORSON, B. C. (1960). *Crohn's Disease (Regional Enteritis) of the Large Intestine and its Distinction from Ulcerative Colitis*. Gut, 1, 87-105.

- LOFTUS, E. V. (2004). *Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences*. *Gastroenterology*, 126, 1504-1517.
- LOZUPONE, C. A. et al. (2012). *Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota*. *Nature*, vol. 489, pp. 220-229.
- MADIGAN, T. M. et al. (2006). *Brock Biology of Microorganisms*. In: Madigan, T. M. et al. (Eds.). *Microbial Symbioses*, 13ª Edição. Pearson, pp. 766-823.
- MAN SM, et al. (2010). *Host attachment, invasion, and stimulation of proinflammatory cytokines by Campylobacter concisus and other non-Campylobacter jejuni Campylobacter species*. *J Infect Dis*; 202: 1855-1865.
- MATSUOKA, K., KANAI, T. (2014). *The gut microbiota and inflammatory bowel disease*. *Seminars in Immunopathology*, 37, 47-55.
- MYRELID, P. (2009). *Surgery and immuno modulation in Crohn's disease*. Linköping University Medical Dissertation No 1150.
- NASER, S. A. (2014). *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis causes Crohn's disease in some inflammatory bowel disease patients*. *World Journal of Gastroenterology*, 20, 7403.
- OBERC, A., COOMBES, B. K. (2015). *Convergence of External Crohn's Disease Risk Factors on Intestinal Bacteria*. *Front. Immunol*, 6:558.
- ORDÁS, I., et al. (2012). *Ulcerative colitis*. *The Lancet*, 380, 1606-1619.
- PRESS, D. (2016). *Recent insights into the molecular pathogenesis of Crohn's disease: a review of emerging therapeutic targets*. 59-70.
- RAZANI-BOROUJERDI, S., et al. (2007). *T Cells Express 7-Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits That Require a Functional TCR and Leukocyte-Specific Protein Tyrosine Kinase for Nicotine-Induced Ca<sup>2+</sup> Response*. *The Journal of Immunology*, 179, 2889-2898.
- SALIM, S. Y., SÖDERHOLM, J. D. (2011). *Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases*. *Inflammatory Bowel Diseases*, 17, 362-381.
- SANJABI, S., et al. (2009). *Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF- $\beta$ , IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity*. *Current Opinion in Pharmacology*, 9, 447-453.
- SANTOS, J.R., J.C.M. (1999). *Doença de Crohn - Aspectos clínicos e diagnósticos*. *VerBrásColoproct*; 19): 276-285.

- SARTOR, R. B. (2006). *Mechanisms of Disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis*. *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology*, 3, 390-407.
- SARTOR, R. B., MAZMANIAN, S. K. (2012). *Intestinal Microbes in Inflammatory Bowel Diseases*. *Am J Gastroenterol Suppl*, 1, 15-21.
- SCRIBANO, M. L. (2013). *Use of antibiotics in the treatment of Crohn's disease*. *World Journal of Gastroenterology*, 19, 648.
- STRONG, S. A. (2007). *Surgery for Crohn's Disease*. *The ASCRS Textbook of Colon and Rectal Surgery*, 584-600.
- TAMBOLI, C. P. (2004). *Dysbiosis in inflammatory bowel disease*. *Gut*, 53, 1-4.
- TAWFIK, A., et al. (2014). *Escherichia coli - host macrophage interactions in the pathogenesis of inflammatory bowel disease*. 20, 8751-8763.
- The Secret History of Crohn's Disease – History cooperative* [Acedido a 19/07/16]. Disponível em: <http://historycooperative.org/the-secret-history-of-crohns-disease/>
- WEHKAMP, J., et al. (2005). *Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease*. *Proc Natl AcadSci USA*;102:18129-34.
- WEHKAMP, J., et al. (2003). *Inducible and Constitutive  $\beta$ -Defensins Are Differentially Expressed in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis*. *Inflammatory Bowel Diseases*, 9, 215-223.
- WILKS S. (1859). *Morbid appearances in the intestine of Miss Banks*. London. *Medical Times and Gazete*, v. 2, n. 1, p. 264-269.
- WRIGHT, E. K., et al. (2015). *Recent Advances in Characterizing the Gastrointestinal Microbiome in Crohn's Disease: A Systematic Review*. 21, 1219-1228.
- YE, Y., et al. (2015). *The epidemiology and risk factors of inflammatory bowel disease*. 8, 22529–22542.
- ZHANG, L. (2014). *Campylobacter concisus and inflammatory bowel disease*. *World Journal of Gastroenterology*, 20, 1259.