



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

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

JOANA CRISTINA MARIALVA SILVA

***A DICOTOMIA MICROBIOTA: AGENTE ETIOLÓGICO E
TERAPÊUTICO NA DOENÇA INFLAMATÓRIA
INTESTINAL***

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE FISIOPATOLOGIA

**TRABALHO REALIZADO SOB ORIENTAÇÃO DE:
PROF. DOUTORA ANABELA MOTA PINTO
MESTRE RUI VASCO QUINTAIS GRADIZ**

MARÇO DE 2016

ÍNDICE

RESUMO	1
PALAVRAS-CHAVE	2
ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS	5
1. INTRODUÇÃO.....	7
2. MATERIAIS E MÉTODOS	9
3. MICROBIOTA COMO MECANISMO ETIOLÓGICO DE DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL	10
3.1. A doença inflamatória intestinal.....	10
3.1.1. Introdução aos mecanismos fisiopatológicos da doença inflamatória intestinal	16
3.1.2. Constituição da microbiota.....	17
3.1.3. A microbiota como agente do sistema imunitário.....	19
3.1.3.1. Imunidade Inata	20
3.1.3.2. Imunidade Adaptativa	21
3.1.3.3. Resposta linfocitária T na Doença de crohn	23
3.1.3.4. Resposta linfocitária T na Colite ulcerosa.....	24
3.1.4. Constituição da microbiota na doença inflamatória intestinal.....	29
3.2. A influência da Genética e do Ambiente	33
3.2.1. A genética	33
3.2.2. O ambiente	35
4. MICROBIOTA NA BASE DO TRATAMENTO DA DII	36
4.1. Probióticos	36
4.1.1. Colite Ulcerosa	37
4.1.2. Doença de Crohn	42
4.2. Prebióticos e Simbióticos	43
4.2.1. Colite Ulcerosa	43

4.2.2. Doença de Crohn	46
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	47
5.1. Segurança	47
5.2. Solidez da evidência	49
5.3. Durabilidade do efeito	51
5.4. Aplicabilidade prática	51
5.5. Considerações finais.....	52
6. AGRADECIMENTOS	55
7. BIBLIOGRAFIA.....	56

Resumo

A etiologia das doenças inflamatórias intestinais, nomeadamente da doença de Crohn e da colite ulcerosa, é ainda desconhecida. No entanto, a microflora intestinal vem assumindo um papel determinante no início e manutenção da resposta inflamatória na mucosa intestinal. Efetivamente, nos últimos anos encontramos na literatura um reforço da hipótese de que a doença inflamatória intestinal resulta de interações desreguladas entre a microbiota e o sistema imune da mucosa, levantando-se a possibilidade de que de alguma forma a modulação da microbiota intestinal possa constituir um potencial alvo terapêutico para a doença.

Há evidência científica que implica que elementos específicos da microbiota saudável podem apresentar capacidades anti-patogénicas, conferindo maior resistência à colonização bacteriana patogénica do intestino. Tais resultados levaram à introdução de novos meios de intervenção terapêutica e profilática no contexto das doenças inflamatórias intestinais, baseados no consumo de culturas únicas ou mistas de microrganismos (probióticos), e/ou ingredientes nutricionais não digeríveis (prébióticos), com benefício para o equilíbrio intestinal, e contribuindo para o reforço imunológico.

Assim, o objetivo deste artigo de revisão foi o de sistematizar, através de uma revisão bibliográfica, os dados científicos publicados nos últimos dez anos, ao abrigo da temática do papel da flora intestinal na doença inflamatória intestinal. Pretendemos abordar não só a sua vertente etiológica, com referências ao desequilíbrio imune e ao estabelecimento de processos fisiopatológicos e inflamatórios, mas também a perspetiva terapêutica, que tem por base o restabelecimento da normal flora intestinal como chave da resolução dos fenómenos inflamatórios adjacentes.

Encontrámos evidências de que a utilização de probióticos e/ou prebióticos confere benefícios na manutenção do estado de remissão das doenças inflamatórias intestinais, com particular relevância na colite ulcerosa.

No entanto, a falta de sistematização dos estudos efetuados, de desenhos de investigação adequados, bem como amostras populacionais pouco representativas, enviesam a aceitação e aplicação rotineira desta terapêutica. Assistimos a uma tendência da sua incorporação nas linhas de orientação das organizações médicas europeias, mas com cautela, e estipulando critérios para a sua utilização. Para que a terapêutica com probióticos seja definitivamente aceite, são necessários ensaios mais sólidos, que selecionem e estudem separadamente os agentes probióticos, e não em combinação.

Palavras-chave

Doença inflamatória intestinal; microbiota; probióticos; prébióticos; fisiopatologia.

Abstract

The etiology of inflammatory bowel diseases, including Crohn's disease and ulcerative colitis, is still unknown. However, the gut microbiota has assumed a critical role initiating and maintaining the inflammatory response in intestinal mucosa. Indeed, in recent years we find in the literature a strengthening hypothesis that inflammatory bowel disease results from dysregulated interactions between microbiota and the immune mucosal system, raising possibility that somehow the modulation of intestinal microbiota could be a potential therapeutic target for the disease.

There is scientific evidence implicating that specific types of healthy microbiota may have anti- pathogenic abilities, providing greater resistance to pathogenic bacterial colonization of the intestine. These results led to the introduction of new ways of therapeutic and prophylactic intervention in the context of IBD based on the use of single or mixed cultures of microorganisms (probiotics) and/or nondigestible nutritional ingredients (prebiotics), contributing to gut and immune system health.

The aim of this review article was to systematize through a literature review, scientific data published in the last ten years, about the role of the gut in inflammatory bowel disease. We intend to address not only their etiological component, with references to immune imbalance and establishing pathophysiological and inflammatory processes, but also a therapeutic perspective, based on the restoration of normal intestinal flora as the key to solving the adjacent inflammatory phenomena.

We found evidence that the use of probiotics and/or prebiotics confers benefits in maintaining the state of remission in inflammatory bowel disease, with particular relevance in ulcerative colitis.

However, the lack of systematization of the studies, appropriate research designs as well as some non-representative population samples, skew acceptance and routine application of this therapy. We witness a trend of its incorporation into European medical organizations guidelines, but not without caution, stipulating criteria for their use. For therapy with probiotics to be finally accepted, it takes more robust testing, that select and separate probiotic agents in each study, instead of a single study using several probiotics.

Keywords

Inflammatory bowel disease; microbiota; probiotics; prebiotics; pathophysiology.

Lista de abreviaturas e acrónimos

AIEC: Estirpes aderentes invasivas de *E. coli* (*adherent invasive E. Coli*);

AKT/PI3K: proteína cinase B/ fosfatidilinositol 3-cinase (*protein kinase B/phosphatidylinositol 3-kinase*);

APC: Células apresentadoras de antígenos (*antigen presenting cells*);

ATG16L1: Proteína 16L1 relacionada com a autofagia (*autophagy related 16-like 1*);

CARD: Domínios de recrutamento e ativação das caspases (*caspase activation and recruitment domains*);

CDAI: Índice de atividade da doença de Crohn (*Crohn's disease activity index*)

CU: Colite Ulcerosa;

DC: Doença de crohn;

DII: Doença inflamatória intestinal;

ECCO: European Crohn's and Colitis Organisation;

FUT-2: fucosiltransferase-2;

GALT: Sistema imunitário associado ao intestino (*gut-associated lymphoid tissue*);

GATA-3: Fator de transcrição 3 da sequência "GATA" do DNA (*DNA sequence "GATA" transcription factor 3*);

ICAM: Molécula de adesão da célula intercelular (*intercellular adhesion molecule*);

IFN γ : Interferão gama;

IRGM: Família M da guanosina trifosfatase (*guanosine triphosphatase family M*);

LPS: Lipopolissacarídeos;

MALT: Tecido linfoide associado à mucosa (*mucous-associated lymphoid tissue*);

NOD: Nucleótidos de ligação de oligomerização (*nucleotide-binding oligomerization*);

PCR: Proteína C reativa;

SCCAI: Índice de atividade clínica de colite simplificado (*simplified clinical colitis activity index*)

STAT6: transdutor de sinal e ativador da transcrição número 6 (*signal transducer and activator of transcription 6*);

TGF: Fator de crescimento transformante (*transforming growth factor*);

TLR: Recetores do tipo toll (*toll like receptors*);

TNF: Fator de necrose tumoral (*tumor necrosis factor*);

TNFSF14: Membro 14 da superfamília dos fatores de necrose tumoral (*tumor necrosis factor superfamily member 14*).

1. Introdução

Tendo por base os conhecimentos atuais da fisiologia humana, é globalmente aceite o conceito da colonização intestinal por um vasto leque de microrganismos, hoje coletivamente designados por microbiota e previamente por flora intestinal.

Graças a um rápido progresso no desenvolvimento e aplicação das técnicas moleculares, é atualmente possível conhecer a composição, função, diversidade e potencial metabólico da flora microbiana intestinal [1]. Efetivamente, nos últimos anos tem-se procedido à identificação da diversidade de microrganismos que constituem a microbiota, e ao estudo da relação/interação que estas bactérias estabelecem com o organismo humano.

A flora comensal não coloniza passivamente o lúmen intestinal, bem pelo contrário, estabelece vias de comunicação com o sistema imunitário do hospedeiro, e interfere nos processos metabólicos, apresentando-se como um potencial “órgão esquecido” e pouco valorizado [1,2].

A camada única de 400 μm^2 de células epiteliais do intestino constitui a chamada barreira intestinal, que previne a entrada de antígenos que ativariam o sistema imunitário. O intestino possui uma extensa e ativa superfície de tecido linfóide associado ao intestino (GALT, *gut associated lymphoid tissue*), estruturas integradas no tecido linfóide associado à mucosa (MALT, *mucous-associated lymphoid tissue*). Este tecido linfóide assume, ao longo do tubo digestivo, padrões de organização distintos, de que se destacam, por exemplo, as placas de Peyer no intestino delgado (nomeadamente no íleo), ou os agregados linfocitários ao longo do cólon

O conceito de interação simbiótica entre a microbiota e o organismo humano baseia-se no estudo da forma como as bactérias comensais estabelecem comunicação com o sistema imunitário presente no intestino [2].

Em indivíduos saudáveis, a barreira intestinal constitui um recurso eficaz no combate aos antígenos presentes no lúmen, considerado na prática como um prolongamento do exterior do organismo. A incapacidade ou lesão desta barreira está assim associada à patogênese de diversas doenças, como por exemplo as doenças inflamatórias intestinais (DII) [3].

A doença de Crohn (CD) e a colite ulcerosa (CU) são os subtipos clínico-patológicos mais relevantes de doenças inflamatórias intestinais, a primeira caracterizando-se por uma inflamação crônica idiopática, que pode afetar qualquer segmento do trato gastrintestinal, mas com atingimento primordial do íleo terminal e do cólon, e a segunda por uma inflamação crônica, também idiopática, de sede cólica, e por vezes também retal. Para a sua gênese contribuem fatores de ordem genética, ambiental e imunológicos [4, 5].

A disbiose, um desequilíbrio da microbiota, com alteração da flora intestinal normal, e da sua relação com o hospedeiro, é um dos conceitos subjacentes à etiopatogenia da DII. Há evidência científica que demonstra que tipos específicos da microbiota saudável podem apresentar capacidades anti-patogénicas, conferindo maior resistência à colonização bacteriana patogénica do intestino [5].

Tais resultados levaram à introdução de novos meios de intervenção terapêutica e profilática no contexto das DII, baseados no consumo de culturas únicas ou mistas de microrganismos (probióticos) e/ou ingredientes nutricionais não digeríveis (prebióticos), com benefício para o equilíbrio intestinal, e com reforço imunológico [5-8].

O objetivo deste artigo de revisão é o de sistematizar, através de uma revisão bibliográfica, os dados científicos publicados ao abrigo da temática do papel da microbiota na DII. Pretendemos abordar a vertente fisiopatológica da doença inflamatória intestinal, nomeadamente os mecanismos inflamatórios e as alterações imunitárias, que permitiram identificar potenciais alvos terapêuticos, perspetivando o restabelecimento da flora intestinal

normal como chave da resolução dos fenómenos inflamatórios subjacentes nas doenças inflamatórias intestinais.

2. Materiais e Métodos

Para o presente artigo de revisão, foi realizada pesquisa bibliográfica com os motores de metadados SUM search e TRIPdatabase, a 31 de Julho de 2015, com as palavras-chave “inflammatory bowel disease AND probiotic AND etiology AND treatment”, tendo sido obtidos 81 artigos através da plataforma SUMSearch2 (www.sumsearch.org) e 62 através da plataforma TRIPdatabase (www.tripdatabase.com).

Procedeu-se igualmente à pesquisa de artigos através da plataforma PubMed a 31 de julho de 2015, usando os termos MeSH “inflammatory bowel disease”, “probiotics” e “prebiotics”, com a fórmula “inflammatory bowel disease AND probiotic AND etiology AND treatment”, tendo sido aplicados filtros restritivos, com preferência para estudos comparativos e revisões sistemáticas, tendo sido possível obter 72 artigos.

Os artigos consultados foram restritos aos últimos 10 anos, e às línguas portuguesa, inglesa, francesa e espanhola, critérios estes aplicados de forma transversal a todos os motores de pesquisa utilizados.

Foram ativados os pedidos de atualização por correio eletrónico de novos estudos sobreponíveis aos termos da pesquisa.

Procedeu-se também à pesquisa através do método “PICO”, segundo a fórmula “P (inflammatory bowel disease) I (Probiotics)” que produziu 81 resultados, com artigos sobreponíveis aos produzidos pelas plataformas supracitadas.

As *guidelines* elaboradas pela European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO) e suportadas pela Sociedade Portuguesa de Gastroenterologia, disponíveis para consulta através do *site* (www.spg.pt), foram igualmente consultadas.

A seleção dos estudos foi feita tendo por base não só a atualidade do artigo, mas também a indexação do mesmo e o fator de impacto das revistas, verificado através da plataforma Web Of Knowledge (www.webofknowledge.com). Dos 143 artigos obtidos através das plataformas SumSearch e TRIPdatabase, foram selecionados 20 artigos, com base na pertinência do conteúdo e no nível de citações (mínimo de 14 citações listadas no Web Of Knowledge, exceto para as publicações de 2015). Dos 72 artigos obtidos pela plataforma PubMed, 62 foram incorporados nesta revisão sendo que após a primeira leitura, 10 revelaram-se fora do âmbito da mesma.

3. Microbiota como mecanismo etiológico de Doença Inflamatória Intestinal

3.1. A doença inflamatória intestinal

A doença de Crohn (DC) e a colite ulcerosa (CU) são as duas entidades clínicas mais relevantes dentro do espectro das doenças inflamatórias intestinais (DII), sendo portanto as mais estudadas. Caracterizam-se, como já dissemos, por uma inflamação intestinal crónica idiopática, resultante da influência de fatores de ordem genética (presença de mutações genéticas responsáveis pela codificação de proteínas que interferem com a resposta imunitária), ambiental (exposição a antígenos e/ou substratos capazes de despoletar uma resposta inflamatória desadequada) e imunitária [4, 5].

Numa abordagem sucinta das características de cada entidade clínica, importa referir que a DC é uma patologia que afeta todo o tubo digestivo, determinada pela presença de inflamação disposta de forma segmentar, num padrão descontínuo, afetando segmentos do trato gastrointestinal que intercalam com áreas preservadas de doença. É uma doença transmural, com lesão de toda a espessura da parede intestinal, e com a possibilidade de desenvolvimento de fistulas intestinais e abscessos. Estes quadros motivam a classificação da doença em não obstrutiva, obstrutiva ou penetrante. Cursa também com manifestações extraintestinais, do foro reumatológico (sacroileíte), oftálmico (uveíte) ou dermatológico (eritema nodoso). Clinicamente, é usual identificar a apresentação clínica em 3 estádios, ligeira, moderada e grave, de acordo com sintomas da doença, perda de peso, exame objetivo e valor de proteína C reativa (PCR). Uma doença de estágio leve caracteriza-se por um doente capaz de se alimentar oralmente, perda de peso inferior a 10% do peso total, sem sinais de desobstrução ou desidratação, sem febre e sem massas abdominais à palpação. Possui habitualmente uma PCR elevada. Uma doença de Crohn de estágio moderado apresenta uma perda de peso superior a 10%, e o doente, com uma clínica de vômitos intermitentes. À palpação é comum encontrar-se uma massa dolorosa, com aumento da PCR. Por fim, o estágio grave caracteriza-se por um emagrecimento severo com índice de massa corporal inferior a 10Kg/m^2 , um exame físico com sinais de obstrução ou abscesso, acompanhado de uma elevação da PCR [9].

Uma das formas atualmente disponíveis para avaliar a atividade da DC passa pela utilização do índice de atividade da doença de Crohn (CDAI, *Crohn's disease activity index*). O CDAI tem aplicação principalmente na validação de doentes para inclusão em ensaios clínicos, ou em grupos específicos de estudos (categorizando a doença em leve, moderada ou grave). É igualmente utilizado para avaliar a evolução da doença ou o sucesso terapêutico, sendo aplicado antes e depois do tratamento, ajudando a objetivar se houve ou não benefício. Essencialmente, a finalidade do CDAI é incorporar indicadores de atividade da doença,

apresentando um resultado numérico como resultado do somatório dos sintomas. Entre estes indicadores, destacam-se a dor abdominal, diarreia, sensação de bem-estar geral e manifestações extraintestinais [9]. A tabela 1 apresenta um exemplo do formulário para aplicação deste índice.

Tabela 1: Índice de atividade da doença de Crohn (CAI). Adaptado de Dignass A. et al, 2010.

Variáveis	Avaliação		Fator
Diarreia	Número de vezes presente em 7 dias		Avaliação x 2
Dor abdominal	Ausente	0	Avaliação x 5
	Ligeira a moderada	1, ou 2	
	Grave	3	
Bem-estar geral	Bem	0	Avaliação x 7
	Intermédio	1, 2 ou 3	
	Terrível	4	
Manifestações extraintestinais	Artrite/artralgia	1	Avaliação x 20
	Uveíte	1	
	Lesões periorais	1	
	Doença perianal	1	
	Fístulas não anais	1	
	Febre >37,8°C (última semana)	1	
Medicação	Loperamida ou opióides	1	Avaliação x 30
Massa abdominal	Ausente	0	Avaliação x 10
	Questionável	2	
	Presente	5	
Hematócrito	Mulher: 47 - (valor atual)	-	Avaliação x 6
	Homem: 42 - (valor atual)	-	
Peso	Em kg	-	100 x [1-(valor atual/standard)]

A CU afeta essencialmente o cólon e o reto, e apresenta lesões intestinais dispostas num padrão contínuo, bem como manifestações extraintestinais mais frustres do que as observadas na DC (nomeadamente artropatia aguda, eritema nodoso e colangite esclerosante). É igualmente caracterizada, segundo critérios clínicos e analíticos, em 3 graus de gravidade. A colite ulcerosa ligeira caracteriza-se por uma clínica mais frustre, com menos de quatro dejeções diárias, uma pequena quantidade de sangue nas fezes, sem febre e sem taquicardia. Apresenta uma anemia ligeira e valores de velocidade de sedimentação inferiores a 30 mm/h; a colite severa caracteriza-se por uma clínica com seis ou mais dejeções diárias, maior quantidade de sangue objetivado nas fezes, temperatura corporal média igual ou superior a 37.5°C, frequência cardíaca superior a 90 batimentos por minuto, um valor de hemoglobina inferior a 7,5 g/dl e valores de velocidade de sedimentação superiores a 30 mm/h. Serão classificadas de colite ulcerosa de grau moderado todas as apresentações clínicas entre as duas descritas [9].

Globalmente, os sinais e sintomas mais frequentes na DII são a dor abdominal, diarreia crónica, perda ponderal e astenia nas fases ativas da doença. A presença de diarreia sanguinolenta é característica da CU. A DC pode, adicionalmente, apresentar-se com anemia e fistulas/abcessos peri-anais [4,10 - 12].

Por forma a quantificar a atividade da CU, os clínicos utilizam o score simplificado de atividade clínica da colite (SCCAI, *simple clinical colitis activity index*). O índice é constituído por um questionário referente aos sintomas da doença durante a semana anterior. É constituído por seis domínios: frequência de dejeções (frequência total e durante a noite), urgência de defecação, presença de sangue nas fezes, bem-estar geral e ainda presença de manifestações extraintestinais de CU. Depois da recodificação, o SCCAI classifica o doente em uma de duas categorias: doença não ativa (SCCAI <5) ou ativa (SCCAI ≥ 5). A tabela 2 exemplifica este índice [5].

Tabela 2: Índice simplificado de atividade clínica da colite (SCCAI). Adaptado de Cammarota G., 2015.

Descrição	Score	Pontuação
Frequência de dejeções (dia)	0 a 3	0
	4 a 6	1
	7 a 9	2
	>9	3
Frequência de dejeções (noite)	0	0
	1 a 3	1
	4 a 6	2
Urgência defecatória	Ausente	0
	Ligeira	1
	Imediata	2
	Incontinência	3
Sangue nas fezes	Ausente	0
	Vestigial	1
	Ocasional	2
	Frequente (>50% das defecações)	3
Bem-estar geral (classificado de 0 a 10)	≥ 7	0
	6	1
	5	2
	4	3
	<4	4
Manifestações extraintestinais	Artrite	0 se ausente
		1 se presente
	Uveíte	0 se ausente
		1 se presente
	Eritema nodoso	0 se ausente
		1 se presente

	Pioderma gangrenoso	0 se ausente
		1 se presente
Se somatório < 5 = doença não ativa; Se somatório ≥ 5 =doença ativa.		

Para o diagnóstico definitivo destas patologias é essencial o recurso a métodos complementares de diagnóstico, nomeadamente métodos invasivos como a colonoscopia com biópsia. No entanto, os métodos não invasivos são igualmente uma ferramenta a ter em conta no processo diagnóstico, e de seguimento. É corrente a utilização de biomarcadores da DII, nomeadamente os realizados em amostras de fezes, já que estão mais diretamente ligados à atividade intestinal. De entre estes, a calprotectina é o mais utilizado. As funções conhecidas da calprotectina estão associadas aos processos de defesa através da ação do zinco (atividade antibacteriana e antifúngica). A sua concentração está diretamente correlacionada com o grau de inflamação na amostra. Considera-se o teste negativo se a concentração for inferior a 50µg/g, indeterminado se compreendido entre 50,1 e 150,0 µg/g, e positivo se maior ou igual a 150,1 µg/g. Em amostras de fezes, a calprotectina demonstra ser um bom marcador biológico por permanecer estável até sete dias, e por se apresentar uniformemente distribuída na amostra [4, 10 - 12].

Faz parte dos protocolos terapêuticos para ambas as patologias (DC e CU) a administração de salicilatos, corticoides (prednisolona, budesonide), azatioprina e outros imunossuppressores, e terapêuticas “biológicas” com anticorpos monoclonais tais como infliximab, em doses e esquemas adequados a cada uma das patologias e à sua fase (ativa ou em remissão).

3.1.1. Introdução aos mecanismos fisiopatológicos da doença inflamatória intestinal

Na pesquisa da etiologia da DII, várias hipóteses são colocadas, como por exemplo, um desequilíbrio entre fatores pró-inflamatórios e a resposta anti-inflamatória mediada pelas células T, um desvio da resposta imunitária, em consequência de defeitos na apresentação de antígenos, uma disfunção relacionada com uma barreira epitelial não íntegra, ou um desequilíbrio da microbiota com alteração da normal flora intestinal e da sua relação com o hospedeiro (disbiose). Estes mecanismos serão abordados com maior detalhe ao longo deste trabalho [13, 14].

Importa definir alguns conceitos da fisiologia e da patologia inerentes à mucosa intestinal e à microbiota propriamente dita, por forma a compreender o papel que ambas possuem em contexto da DII.

A barreira intestinal é constituída pelas células epiteliais intestinais, constituindo a primeira defesa ativa contra agentes patogénicos ao nível do intestino. Das estruturas associadas ao GALT, destacamos as placas de Peyer.

As placas de Peyer são agregados de tecido linfóide que se distribuem ao longo do intestino delgado, logo abaixo do epitélio intestinal. Estas placas são compostas por folículos de células B, que se encontram sob áreas especializadas do epitélio, conhecido como epitélio associado a folículos, e estão intercaladas por zonas de células T que ocupam as áreas entre os folículos. Este epitélio associado aos folículos contém células chamadas células multi-fenestradas ou M, cuja função é transportar o antígeno luminal para a área folicular. As células dendríticas, presentes nas placas de Peyer, são células apresentadoras de antígenos (APC, *antigen presenting cells*) que atuam como sentinelas, trocando informações entre as células epiteliais da barreira intestinal e as bactérias, tanto comensais como patogénicas do lúmen [2].

As junções “apertadas” (*tight-junctions*) entre as células epiteliais permitem a entrada seletiva de fluidos, nutrientes e microrganismos. A permeabilidade do intestino normal é assim dependente de um epitélio intacto, da presença de muco à superfície, do peristaltismo, e da secreção de fatores de proteção do hospedeiro [2].

Em indivíduos saudáveis, a barreira intestinal constitui um recurso eficaz no combate aos antígenos presentes no lúmen, considerado na prática como um prolongamento do exterior do organismo. Defeitos na barreira epitelial podem levar a uma sobre-exposição ao GALT de antígenos luminiais nocivos, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$, *tumor necrosis factor alpha*), e na inflamação das mucosas. A incapacidade ou lesão desta barreira está assim associada à patogénese de diversas doenças, como por exemplo as doenças inflamatórias intestinais (DII) [3].

A inflamação crónica intestinal poderá assim resultar, em parte, de um desequilíbrio na resposta imunitária local (mediada pelas células de Paneth, pelas células epiteliais tipo M, e pelas células dendríticas, capazes da ativação de linfócitos T em Th1, Th2 ou Th17) na presença de *triggers* ambientais, em indivíduos geneticamente suscetíveis.

3.1.2. Constituição da microbiota

O local mais frequentemente afetado pela DII é o colon, onde encontramos igualmente a maior concentração bacteriana de todo o trato gastrointestinal [12].

Para perceber o papel da microbiota na fisiopatologia da DII, importa conhecer a sua composição normal. A microbiota humana constitui um ecossistema complexo, com cerca de 10^{14} bactérias pertencentes a 1 000 espécies diferentes, maioritariamente anaeróbias, e com uma composição, em menor percentagem, de fungos, parasitas e vírus [15]. Estes microrganismos

aumentam, tanto em concentração como em complexidade, do topo proximal (boca) para o distal (ânus) do trato gastrointestinal, estando distribuídos consoante a figura 1.

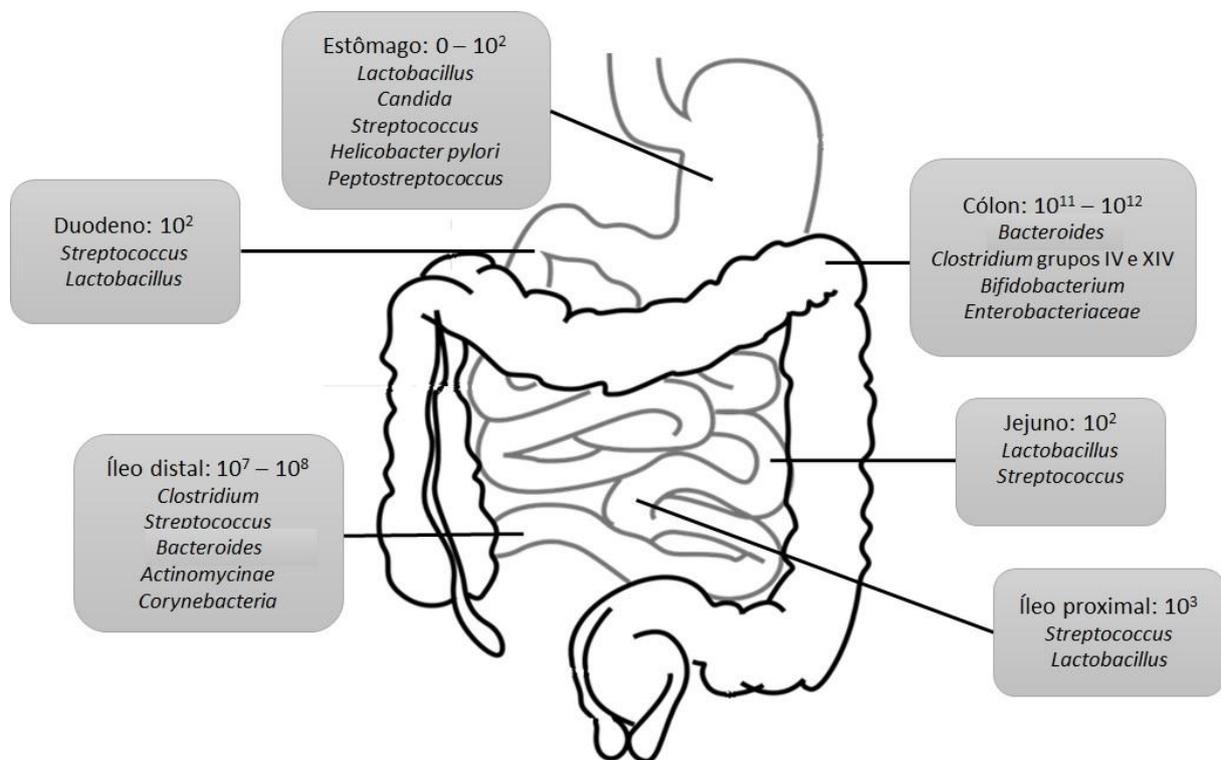


Figura 1: Composição e concentrações da microbiota ao longo do trato gastrointestinal. Adaptado de: Sartor R. et al., 2008

Maioritariamente, a microbiota é composta por bactérias dos filos *Bacteroidetes* e *Firmicus* (90%), sendo os géneros *Bacteroides* (filo *Bacteroidetes*), *Faecalibacterium* (filo *Firmicus*) e *Bifidobacterium* (filo *Firmicus*) os mais representativos da flora. As restantes espécies bacterianas pertencem aos filos *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia*. Outros géneros, tais como *Escherichia* (família *Enterobacteriaceae*) e *Lactobacillus* (família *Lactobacillaceae*), estão presentes em menor extensão. Espécies do género *Bacteroides* constituem de *per si* cerca de 30% de todo o volume da microbiota, sugerindo que este género é especialmente importante no funcionamento do hospedeiro [16].

Importa no entanto frisar que, embora exista uma base comensal comum, a microbiota é uma comunidade bacteriana específica de cada indivíduo, e relativamente constante ao longo dos anos, apresentando variações interpessoais não desprezáveis. Certos fatores ambientais podem afetar diretamente a sua abundância relativa, mas não alteram a presença das colônias primárias específicas do indivíduo [5].

3.1.3. A microbiota como agente do sistema imunitário

Para além do conceito mais lato de flora intestinal, esta pode ser igualmente definida como um sistema funcional com responsabilidade nos processos metabólicos da homeostasia intestinal, na defesa contra patógenos exógenos (competindo com estes na colonização do lúmen), e na maturação do sistema imunitário e da própria mucosa intestinal. Adicionalmente, tem funções bem estabelecidas de digestão e absorção de nutrientes, e de secreção hormonal, mediadas pelo epitélio intestinal.

Durante muitos anos, estas funções foram estudadas separadamente, sem que se analisasse a fisiopatologia gastrointestinal focando a dualidade metabolismo/imunidade, com a microbiota como mediador.

A microbiota produz diversos metabolitos que afetam profundamente a função epitelial intestinal, o balanço energético do hospedeiro e a resposta imunitária. Assim, por exemplo, metaboliza ativamente muco (importante reservatório de glicanos que, nos mamíferos, fornece uma fonte de nutrição bacteriana em condições de jejum prolongado), e também as células epiteliais descamadas e os hidratos de carbono não absorvidos da dieta. Estes últimos são fermentados pela microbiota intestinal para produzir ácidos gordos de cadeia curta que, por sua vez, controlam tanto o processo de lipogénese como a produção de hormonas intestinais com papel na regulação da imunidade. [17, 18].

Tendo um papel de relevo na regulação do sistema imunitário, é cada vez maior o interesse da comunidade científica no estudo das alterações que conduzem ao aparecimento da doença inflamatória.

Embora não tenha sido identificado nenhum agente etiopatogénico específico, admite-se que alguns microrganismos autóctones poderão adquirir papéis patogénicos em indivíduos geneticamente predispostos, e expostos a agentes dietéticos ou ambientais, alterando dessa forma a regulação do sistema imunitário. A estes microrganismos, dá-se o nome de patobiontes. A constante estimulação antigénica a que a microbiota é sujeita nestas condições, leva a uma ativação contínua dos linfócitos T, com a conseqüente lesão inflamatória crónica que caracteriza os quadros de DII [5].

Em indivíduos saudáveis, a microbiota ativa uma sequência de respostas homeostáticas através das células epiteliais, macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e B/plasmócitos, permitindo dessa forma a coexistência com microrganismos e produtos bacterianos potencialmente tóxicos [18 - 20].

Abordamos, de seguida, sucintamente, a relação entre os sistemas imunitários inato e adaptativo no contexto das DII.

3.1.3.1. IMUNIDADE INATA

No que diz respeito à relação entre o sistema imunitário inato e a DII, estudos indicam que bactérias patogénicas e seus produtos podem causar inflamação da mucosa do intestino, através do envolvimento deste sistema. A expressão pela mucosa inflamada do intestino de moléculas de adesão, tais como a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM1, *intercellular adhesion molecule 1*) permite a migração e adesão de células mononucleares e polimorfonucleares circulantes, desencadeando os processos de imunidade inata [12, 19].

Ainda no capítulo da imunidade inata, destaca-se o papel dos recetores do tipo toll (TLRs, *toll like receptors*). As APC, das quais são exemplo as células dendríticas e os macrófagos, possuem TLRs com diferentes especificidades para antígenos microbianos presentes na mucosa intestinal. Estes, através dos TLR, induzem uma resposta imunitária inata, a qual se traduz na produção de moléculas pró-inflamatórias. Estes recetores serão melhor abordados no subcapítulo 3.1.3.4 [12, 18 - 20].

3.1.3.2. IMUNIDADE ADAPTATIVA

Está já estabelecido que o reconhecimento de antígenos derivados de bactérias comensais pelo sistema imunitário adaptativo é um processo que desempenha um papel chave na patogénese da DII.

Na verdade, os estudos efetuados têm demonstrado um papel determinante dos linfócitos T no processo inflamatório de origem intestinal.

Os linfócitos T, assim chamados pelo facto de a sua produção ocorrer no timo, diferenciam-se, a partir de uma célula sem funções previamente atribuídas (naïve, CD4+). A diferenciação origina células T citotóxicas (CD8+), auxiliares (CD4+), natural killer T (NKT), de memória (CD197), reguladoras (FOXP3, *forkhead box P3*, uma proteína com participação no sistema imunitário) ou gama-delta ($\gamma\delta$).

Os linfócitos T auxiliares (Th, *T helper*) ou CD4+, podem ser classificados de acordo com o seu tipo de resposta, em pelo menos duas vertentes Th1 e Th2 (ver Figura 2) [12].

Os linfócitos T reguladores (Tregs, *regulatory T cells*) um subconjunto imunomodulador de linfócitos T CD4+, são capazes de suprimir a função e a diferenciação dos linfócitos Th1 e Th2. Curiosamente, na presença de IL-6, o TGF- β 1 derivado de Tregs pode induzir a diferenciação de células Th17 [12].

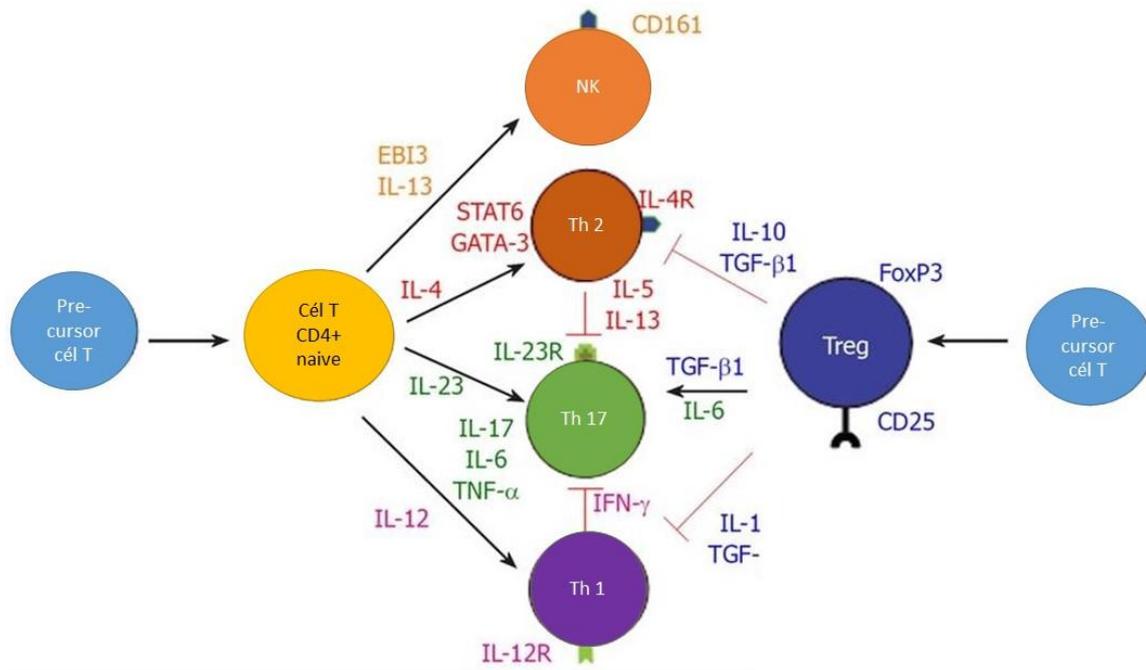


Figura 2: Diferenciação dos linfócitos T. Adaptado de: Shih e Targan, 2008. Quando estimuladas, as células T CD4+ naiva diferenciam-se em 3 subconjuntos principais, Th1, Th2 e células Th17. A IL-12 induz a formação de linfócitos Th1 produtores de IFN- γ . A IL-23 promove o desenvolvimento de linfócitos T auxiliares (ou CD4+) produtores de IL-17. A IL-4 induz a ativação do transdutor de sinal e ativador da transcrição número 6 (STAT6, *signal transducer and activator of transcription 6*), promovendo a expressão do fator de transcrição 3 da sequência "GATA" do DNA (GATA-3, *DNA sequence "GATA" transcription factor 3*), que leva à indução da expressão de IL-4 e à diferenciação de linfócitos Th2 [12, 19].

Tanto as células Th1 como as Th2 demonstraram participar na resposta inflamatória intestinal crônica, com a DC a demonstrar um perfil de citocinas predominantemente provenientes do tipo Th1, e a CU um perfil de citocinas predominantemente do tipo Th2 (ver Tabela 3) [12, 18 - 20].

Tabela 3: Perfis de citocinas na DII. Adaptado de Shih e Targan 2008.

Resposta imunitária inata			Resposta imunitária adaptativa		
Citocinas	DC	CU	Citocinas	DC	CU
IL-1 β	↑	↑	IL-5	N	↑
IL-6	↑	↑	IL-13	N	↑
IL-8	↑	↑	IL-17	↑	N
IL-12	↑	N	IL-21	↑	N
IL-18	↑	↑	IFN- γ	↑	N
IL-23	↑	N	TL1 α	↑	?
IL-27	↑	N			
TNF α	↑	↑			
TNFSF14	↑	↑			
TL1 α	↑	↑			

↑: aumentado; N: normal; IL: interleucina; TNF: fator de necrose tumoral; TNFSF14: fator de necrose tumoral superfamília 14. TL: linfócito T; IFN: interferão.

3.1.3.3. RESPOSTA LINFOCITÁRIA T NA DOENÇA DE CROHN

O perfil de citocinas Th1, incluindo o IFN- α , a IL-12 e o TNF- α , está elevado nos doentes com DC [9]. Pensa-se que a DC é mediada através das células Th1 devido aos elevados níveis de IL-12 e de IFN- γ verificados nestes doentes, e devido ao facto de o tratamento com anti-IFN- γ ou anti-IL-12 ter sido eficaz na inibição da evolução da doença [12].

Verifica-se um aumento da expressão de TNF- α e de TNFSF14 na mucosa intestinal de doentes com a doença de Crohn. A estimulação do recetor do TNFSF14 induziu a produção de IFN- γ (um ativador de macrófagos) nos linfócitos T da lâmina própria [4, 5, 12, 19].

Um subconjunto de células T produtoras de IL-6 e IL-17, denominadas por linfócitos Th17, emergiu também como um importante mediador da resposta dos linfócitos T na inflamação intestinal. A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória que promove a ativação de

outros linfócitos T, e estimula fibroblastos, células endoteliais, macrófagos e células epiteliais a produzir vários mediadores pró-inflamatórios, tais como IL-1, IL-6, TNF, metaloproteases e quimiocinas.

A IL-23 promove o aparecimento de linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-17 através de mecanismos distintos dos verificados para os linfócitos Th1 (STAT1) e 2 (STAT6). Além disso, a colonização bacteriana estimula a expressão de IL-23 por células dendríticas do íleo, e os níveis de IL-17 e IL-23 estão aumentados no soro e na análise de segmentos intestinais afetados pela DC [4, 12, 18, 19].

3.1.3.4. RESPOSTA LINFOCITÁRIA T NA COLITE ULCEROSA

Na colite ulcerosa, verifica-se que a resposta linfocitária se efetua predominantemente através de linfócitos Th2, produtores de IL-4 e IL-13, mediada por células especializadas, tais como os linfócitos T NK. Ao determinar o perfil de citocinas das células mononucleares da lâmina própria, isoladas a partir de tecido recuperado de resseções ileais e/ou cólicas de doentes com DII, verificou-se que as células mononucleares dos doentes com CU segregavam quantidades elevadas de IL-13 e IL-5, citocinas relacionadas com linfócitos Th2. Estas células mononucleares produtoras de IL-13 e IL-5 apresentavam marcadores específicos que indicaram tratar-se de linfócitos NK. Estes linfócitos T NK diferiam dos T NK “clássicos” por não expressarem recetores característicos. As células NK isoladas de doentes com CU exibiram citotoxicidade para as células epiteliais. Esta população de células pode ser, possivelmente, a responsável pela citotoxicidade observada no epitélio da CU. Em conjunto, estes dados mostram que a CU está associada a uma resposta atípica de linfócitos Th2, mediada por um subconjunto distinto de células NK produtoras de IL-13, e que são citotóxicas para as células epiteliais. No entanto, o peso que este mecanismo poderá ter na proliferação da inflamação no contexto da CU permanece ainda por determinar [12, 18].

A identificação das diferentes estirpes bacterianas está dependente de recetores transmembranares de reconhecimento de padrões moleculares, que incluem a família dos TLR e recetores intracelulares semelhantes a nucleótidos de ligação de oligomerização (recetores NOD-like: *nucleotide-binding oligomerization-like receptors*) [18].

Os TLR's constituem um grupo de recetores que se expressam em diferentes células do sistema imunitário, estabelecendo um sistema de reconhecimento arquetípico que lhes permite distinguir os diversos agentes patogénicos dos que são *self*, isto é, próprios do organismo. Estão descritos, até à data, dez TLR's no organismo, considerados mediadores do sistema imunitário humano, com um papel na atividade inicial da resposta imunitária adaptativa. Os TLR's reconhecem os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*), assim como os padrões moleculares associados a risco, derivados de tecido necrótico ou isquémico (DAMPs, *danger-associated molecular patterns*). A título de exemplo, o TLR2 reconhece vários PAMP's de bactérias gram positivas, tais como lipoproteínas, enquanto os TLR3, 7 e 8 são ativados via RNA viral, o TLR4 pelos lipopolissacarídeos (LPS) das bactérias gram negativas e o TLR5 pelas flagelinas bacterianas. Os TLR levam à ativação de fatores de transcrição (como NF- κ B), com consequente produção de interferões e citocinas tanto pró-inflamatórias, como efectoras, que conduzem a uma resposta imunitária adaptativa. No intestino delgado, e em condições normais, o TLR4 promove o recrutamento de linfócitos B, e subsequente produção de IgA pelos plasmócitos localizados no subepitélio.

A ligação de LPS, flagelinas ou outros componentes bacterianos a estes recetores estimula cascatas de sinalização que incluem o fator nuclear κ B (NF- κ B), proteína cinase B/ fosfatidilinositol-3'-cinase (AKT/PI3K, *protein kinase B/phosphatidylinositol 3-kinase*), e vias da proteína cinase ativadas pela mitogénese. Estas vias são contrariadas através de mediadores inibitórios, tais como o inibidor do NF- κ B (IB), interferão (IFN), interleucina 10 (IL-10), fator de transformação do crescimento (TGF, *transforming growth factor*), uma proteína com

responsabilidades no controlo da proliferação e diferenciação celular) e eicosanoides [prostaglandina E2 (PGE2), lipoxinas]. O ótimo funcionamento e regulação destas vias de inibição requer interações parácrinas entre as células epiteliais e os linfócitos T reguladores (Treg) da lâmina própria, que segregam TGF e IL-10 [18,19]. Este mecanismo encontra-se esquematizado na figura 3.

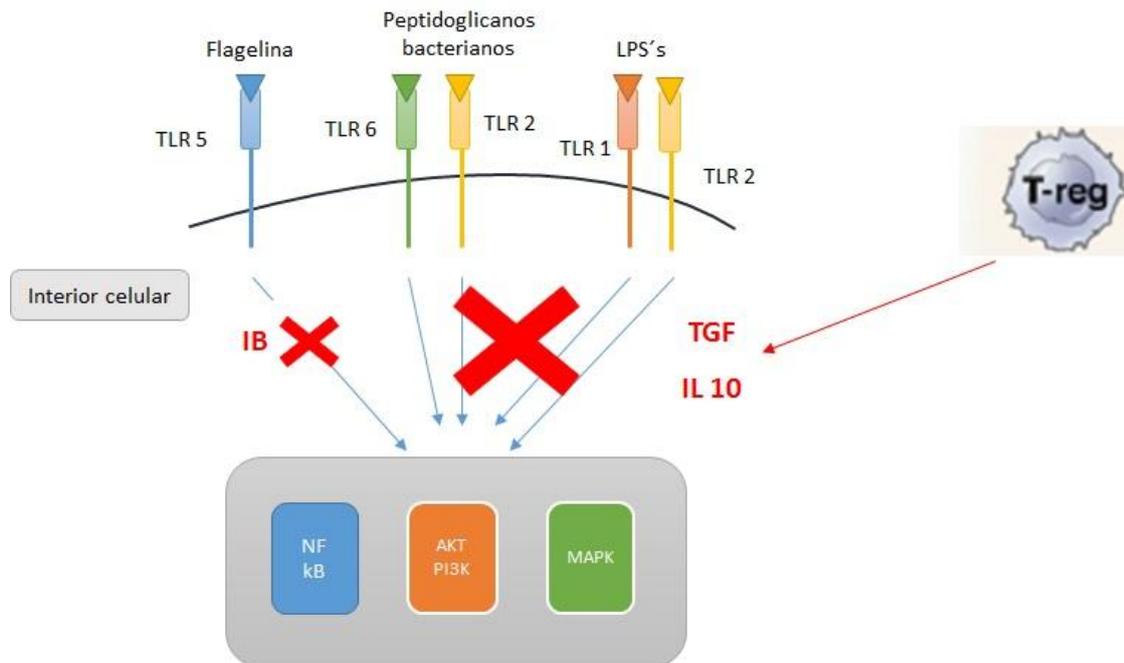


Figura 3: Reconhecimento bacteriano via receptores tipo toll. TLR: recetor tipo toll; LPS's: lipopolissacarídeos; NF-kB: via fator nuclear kB; AKT/PI3K: via proteína cinase B/ fosfatidilinositol-3'-cinase; MAPK: via proteína cinase ativada pela mitogénese; IB: Inibidor fator nuclear kB. TGF; Fator crescimento transformante; IL-10: Interleucina 10. Adaptado de Sartor R. et al., 2008.

A IL-10 é uma citocina produzida maioritariamente por monócitos e, em menor grau, por linfócitos. Esta citocina tem um efeito pleiotrófico na imunoregulação e nas reações de inflamação. Ela sub-regula a expressão de citocinas dos linfócitos Th1, e aumenta a sobrevivência, proliferação e produção de anticorpos pelos linfócitos B. Adicionalmente, e tal como já foi referido, é capaz de bloquear a atividade da via do NF-kB. O papel essencial da IL-10 da mucosa, na regulação deste mecanismo protetor, é sugerido pela ativação persistente de NF-kB e a expressão de TLR2 e de quimiocinas em murganhos com deficiência de IL-10, nos quais se desenvolveu colite crónica após associação com *Enterococcus faecalis* [18]. Assim, a

regulação negativa das respostas imunitárias inatas do hospedeiro para com a microflora patogénica/não comensal (da qual a IL-10 é um bom exemplo) é um processo chave para a manutenção da homeostasia intestinal [12].

Num estudo realizado com camundongos desprovidos de microbiota, a colonização intestinal com *Enterococcus faecalis* ou *Bacteroides vulgatus* ativou transitoriamente, através do TLR2 e TLR4, as vias de sinalização do NF- κ B, sinalizando e induzindo a expressão de quimiocinas nas células epiteliais. Em hospedeiros saudáveis, a sinalização e expressão de quimiocinas, e a utilização da via do TLR2 foram atenuadas 7 a 10 dias após colonização bacteriana com os agentes acima descritos, por produção de TGF pelos linfócitos Treg da lâmina própria, sugerindo que esta produção inibe a ativação do NF- κ B epitelial [18].

A microbiota estimula respostas imunes que produzem tolerância imunológica em hospedeiros saudáveis, levando a uma diminuição de respostas mediadas por TLR, a uma diminuição dos rácios IL12/10 e IL 23/10 nas células, a respostas regulatórias nos linfócitos T, e à secreção de IgA, ao invés de IgG, pelos plasmócitos. Os hospedeiros saudáveis possuem microbiota capaz de reconhecimento através de imunoglobulinas, maioritariamente através da secreção de IgA e não de IgG ou IgM, de conotação mais patogénica. A IgA desempenha predominantemente a função de neutralização dos microrganismos, ligando-se a recetores na superfície destes e impedindo a interação com as células do hospedeiro [18, 19, 20].

A IgA é a imunoglobulina predominante nas secreções, destacando-se como principal local de produção as vias aéreas, o intestino e o leite materno, entre outros. É produzida por plasmócitos localizados subepiteliaismente, sendo transportada pelas células epiteliais através de um processo denominado transcitose. No nosso organismo, a IgA intestinal assume um papel de destaque dado que, cerca de 80% dos plasmócitos se localizam na lâmina própria do intestino, que produz em média 40 a 60 mg/kg/dia de IgA, um valor que ultrapassa a quantidade

produzida de todos os outros isótipos combinados. A nível do trato gastrointestinal as estruturas responsáveis pela produção de IgA podem ser divididas em dois compartimentos: as estruturas de indução placas de Peyer e folículos linfóides isolados, onde ocorre a ativação de células B) e as estruturas efetoras (lâmina própria, onde se faz a produção de IgA). Os centros germinativos presentes no GALT diferem dos existentes nos restantes tecidos linfóides na medida em que são capazes de produzir especificamente IgA, embora não se compreenda totalmente como se processa esta produção [19, 20].

Num estudo realizado em 2008, ratinhos desprovidos de microbiota apresentaram um subdesenvolvimento da mucosa e do sistema imunitário a nível sistémico, com diminuição da celularidade nas placas de Peyer, na lâmina própria, nódulos linfáticos mesentéricos e baço, e com diminuição da função imunitária da própria mucosa. O estudo concluiu que a exposição intestinal a estirpes bacterianas ativava vias protetoras, prevenindo subseqüentes respostas lesivas aos mesmos estímulos [18].

Estudos em modelos animais totalmente desprovidos de microbiota permitiram investigar os processos de sinalização das respostas imunitárias com origem na própria microbiota. Os ratinhos utilizados nestes estudos apresentaram défices de imunidade a vários níveis, incluindo uma diminuição da expressão, no epitélio intestinal, de peptídeos antimicrobianos, de linfócitos T ativados, de plasmócitos, e uma insuficiente síntese de IgA, produzida em condições normais por estímulo microbiota [17-21].

Os resultados obtidos em ratinhos com défice de linfócitos B são também um bom exemplo das complexas interações entre microbiota e epitélio intestinal, constatando-se, nas experiências realizadas, que estando presentes alterações da imunidade adquirida, a microbiota estimula a imunidade inata no epitélio. Outros estudos demonstraram que os ratinhos sem microbiota, ou tratados com antibioterapia de largo espectro, apresentaram reações alérgicas

exacerbadas, com eosinofilia e basofilia marcadas, aumento da produção de IgE e de citocinas associadas aos linfócitos T helper 2 (Th2). Estes resultados permitiram aos autores deduzir considerações acerca da importância da colonização do lúmen intestinal nos primeiros anos de vida como fator protetor para o desenvolvimento de DII [17-24].

3.1.4. Constituição da microbiota na doença inflamatória intestinal

Como referido no subcapítulo 3.1.1., o íleo distal e o cólon possuem uma grande concentração bacteriana comensal. Esta população bacteriana pode incluir agentes patogénicos que poderão ser diretamente responsáveis por iniciar e promover a DII em doentes com uma alteração genética subjacente ou com uma alteração no sistema imunitário. Vários estudos têm demonstrado que existem diferenças na microbiota entre indivíduos saudáveis e com DII [12].

Uma das diferenças é que há uma diminuição da biodiversidade na DII em comparação com indivíduos saudáveis, diminuição essa de até 30% -50%. A redução da diversidade na DII deve-se à perda de bactérias anaeróbicas comensais tais como *Bacteroides*, *Eubacterium*, e espécies de *Lactobacillus* [9]. A diversidade é geralmente tida como uma característica que confere benefício, concedendo resistência a um ecossistema. Por exemplo, esta diversidade iria oferecer redundância ou duplicação funcional na comunidade microbiana, garantindo que processos-chave, tais como a digestão e absorção de nutrientes, estejam sempre assegurados. Adicionalmente, é um mecanismo necessário à manutenção da homeostasia intestinal, em caso de oscilação ou perda de subpopulações. A perda desta biodiversidade no intestino humano pode levar a disbiose, e resultar em lesões na mucosa. Uma segunda diferença da microbiota é que existem menos *Firmicutes* na DII em comparação com indivíduos saudáveis. Foram identificados 13 subtipos diferentes de *Firmicutes* na microbiota da DC, em comparação com 43 na microbiota saudável. Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,025$) [12]. Em

terceiro lugar, existem agentes patogénicos que são encontrados em maiores concentrações na microbiota da DII, e que têm sido implicados/associados ao seu desenvolvimento. Estes patógenos incluem, *Fusobacterium*, *Verrucomicrobium*, *Desulfovibrio*, *Mycobacterium paratuberculosis*, vários *Clostridia*, *Mycobacterium paratuberculosis* e *Listeria monocytogenes* [12, 18, 25 - 29]. Durante este subcapítulo iremos abordar mais aprofundadamente esta alteração da constituição da microbiota.

A instabilidade da microbiota tanto em doentes com CU como com DC, não só na fase de doença ativa como durante a fase de remissão, está comprovada [5, 18]. Efetivamente, nestes doentes observou-se um aumento da população microbiota dos géneros *Bacteroides*, *Genus*, *Salmonella*, *Shigella* e de estirpes mais invasivas de *Escherichia coli* (observados principalmente na doença de Crohn), assim como *Mycobacterium*, não sendo no entanto consensuais as alterações observadas em todos os estudos.

Os géneros *Desulfovibrio* e *Bilophila* estão largamente presentes na flora comensal dos doentes com DII, sendo responsáveis pela redução do sulfito e sulfato, e pela degradação de taurina, respetivamente. Os seus catabólitos são responsáveis por *triggers* pró-inflamatórios e por toxicidade aumentada na mucosa intestinal.

A função autofágica dos macrófagos encontra-se reduzida na DC, diminuindo assim o controlo da replicação da *E. Coli*. Doentes com DC de localização ileal são anormalmente colonizados por estirpes aderentes invasivas de *E. coli* (AIEC, *adherent invasive E. coli*), capazes de se replicarem dentro de células do epitélio, induzindo recrutamento local de macrófagos, onde persistem e se replicam, secretando grandes quantidades de TNF. Barnich e Darfeuille-Michaud analisaram em 2012 a presença desta AIEC que persiste nas células epiteliais, e em macrófagos, e que colonizam seletivamente o íleo dos doentes com DC. Foram observados em 65% das ressecções ileais de doentes com inflamação crónica, em 36% das

biópsias da mucosa em doentes com recorrência da doença pós-recessão, e em 22% das biópsias em doença endoscopicamente normal no ileo. Em contraste, esteve presente em 6% das amostras colhidas na população de controlo. No entanto, não apresentam uma razão para esta colonização seletiva na DC. [5, 18, 28].

O género *Faecalibacterium*, igualmente numericamente reduzido nas DII, merece destaque pelas propriedades anti-inflamatórias que lhe são atribuídas, em indivíduos saudáveis [5].

Especificamente na DC, bactérias do género *Bifidobacterium* estão também em menor número na DC [5]. São também interessantes os resultados encontrados por Ianiro em 2014 [29] sobre a colonização por *Candida albicans* em doentes com DC, tendo este autor observado um aumento na frequência da infeção por este agente tanto nos doentes como nos seus familiares conviventes [29].

No que toca à colite ulcerosa, apesar de alguns microrganismos terem sido associados à doença (como por exemplo *Helicobacter* enterohepáticas), suspeita-se do envolvimento das estirpes que compõem a normal microbiota no desenvolvimento e manutenção da patologia [30] e a flora associada à mucosa parece ter um papel mais preponderante do que as bactérias do lúmen intestinal, pela proximidade com o epitélio do hospedeiro [30].

Num estudo realizado por Macfarlane S. et al [30], recorrendo a biópsias retais, foram feitas análises bacteriológicas comparativas, por forma a determinar a existência ou não de diferenças na microbiota entre os doentes com colite ulcerosa e o grupo controlo de indivíduos saudáveis. Foram encontradas várias colónias bacterianas em ambos os grupos, com uma redução significativa do número de bactérias *Bifidobacterium* nos doentes com CU, sugerindo uma função protetora para este género [30]. A tabela 4 apresenta um resumo das principais estirpes envolvidas na alteração da microbiota, em doentes com DII.

Tabela 4: Principais patobiontes envolvidos na DII. Adaptado de: Cammarota G. et al., 2015.

Patogénio	DII	Amostra	Prevalência (%)		
			DC	CU	Controlo
<i>Escherichia coli</i>	DC e CU	Biópsia da mucosa cólica	75 ^a , 43 ^b , 29 ^c	69 ^a 14 ^b 19 ^c	40 ^a , 17 ^b , 9 ^c
	DC	Granuloma	80	-	10
	DC e CU	Biópsia da mucosa cólica	75	100	25
<i>AEIC</i>	DC e CU	Biópsia da mucosa cólica	21,7 (íleo) 3,7(cólon)	0	6,2 (íleo) 1,9 (cólon)
<i>Clostridium difficile</i>	DC, CU e colite indeterminada	Camada leucocitária após centrifugação	16	16	47
	DC e CU, ambas em remissão	Fezes	6	7	2
<i>Mycobacterium avium</i>	DC e CU	Biópsia da mucosa cólica	51,9	-	16,7
	DC	Biópsia da mucosa cólica	92	-	26
<i>Mycobacterium avium paratuberculosis</i>	DC e CU	Camada leucocitária após centrifugação	46	44	20
<i>Campylobacter genus</i>	DC	Biópsia da mucosa cólica	82	-	23
	DC	Fezes	72	-	30
<i>Campylobacter concisus</i>	DC	Biópsia da mucosa cólica	51	-	2
	DC	Fezes	65	-	30(saudáveis) 33 (não-DII)
Família <i>Helicobacteraceae</i>	DC e CU	Biópsia da mucosa cólica	91,7 (do total de DII)		25 (saudáveis) 100 (SII)
Espécies <i>Helicobacter</i> enterohepáticas	CU	Biópsia da mucosa cólica	-	42	19

AEIC: estirpes aderentes invasivas de *E. coli*. DII: doença inflamatória intestinal. SII: síndrome do intestino irritável.

Sartor R., entre outros autores, comparou a microbiota de indivíduos com DII com a de indivíduos saudáveis, observando uma diminuição da diversidade e da estabilidade homeostática, conseqüente à alteração da composição da flora, no primeiro grupo. As alterações na composição e inevitavelmente da função microbiana nas DII resultam, segundo este autor,

de uma sobre-estimulação imunitária, de disfunção epitelial ou de um aumento da permeabilidade da barreira mucosa intestinal [18].

3.2. A influência da Genética e do Ambiente

3.2.1. A genética

A predisposição genética, a influência ambiental e nutricional, os patógenos intestinais, o *stress* psicológico, e uma alteração na função da barreira intestinal, são importantes fatores, atualmente aceites, na patogénese da DII. As reações desajustadas dos linfócitos T e das citocinas pró-inflamatórias são os denominadores comuns de todos os fatores contributivos nesta patogénese [31].

Estudos alargados de associação genómica permitiram encontrar vários genes associados ao aparecimento de DII [32, 33]. Estes genes, que constituem, por si só, fatores de risco para a doença, codificam proteínas que participam na regulação da microbiota, como os nucleótidos de ligação de oligomerização 2 / domínios de recrutamento e ativação das caspases 15 (NOD2/CARD15, *nucleotide-binding oligomerization / caspase activation and recruitment domains*), ou na resposta imunitária a agentes externos. A alteração da função destas proteínas consequente à mutação destes genes constitui uma diminuição da defesa do organismo, importante no contexto da doença intestinal, com prejuízo tanto da imunidade inata como da adquirida. Variantes genéticas do domínio NOD2 e da proteína 16L1 relacionada com a autofagia (ATG16L1, *autofagy related 16-like 1*) são as mais frequentemente associadas à DII. A deteção da mutação do gene NOD2 em cerca de 25% dos doentes com DC foi um passo importante na compreensão do contexto molecular da doença. As proteínas NOD2 funcionam como um sensor intracelular dos constituintes da parede bacteriana, afirmando-se como uma peça essencial na resposta imunitária [32, 33].

Evidências *in vitro* de estudos científicos indicam que indivíduos em que o processo de autofagia se encontra alterado devido a mutações nos genes ATG16L1, NOD2 e IRGM (*immunity-related GTPase family, M*), apresentam um aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa, *tumor necrosis factor alpha*) e a interleucina 6 (IL6). Este aumento leva a uma exacerbação da inflamação pré-estabelecida e a uma lesão tecidual com consequente translocação bacteriana na mucosa lesada e posterior recrutamento de células inflamatórias [5, 32, 33].

Doentes com DC são largamente colonizados por AEIC, bactérias capazes de proceder a uma lise vacuolar que lhes permite uma replicação intracelular no epitélio intestinal. São também capazes, na presença de condições favoráveis, de replicação nos macrófagos chamados ao local da invasão. É neste ponto que os polimorfismos associados à DC possuem um papel relevante: são as alterações nos genes NOD2, ATG16L1 e IRGM que afetam o processo de autofagia, permitindo a colonização persistente e crescente desta estirpe de *E. Coli* [34].

O gene NOD2 ativa a resposta imunitária através do reconhecimento do muramildipeptídeo, um componente dos peptidoglicanos da parede bacteriana. Desta forma, é possível ao organismo distinguir as bactérias invasoras, como *Shigella* ou *Listeria*, das bactérias comensais. Variantes polimórficas do NOD2 têm sido fortemente associadas a um risco aumentado de desenvolver DC, pois estas variantes de risco diminuem a expressão das α -defensinas 5 e 6 nas células de Paneth, as quais configuram a resposta imunitária normal nestas células, quando expostas a agentes bacterianos, resultando num aumento da colonização por estirpes bacterianas aderentes-invasivas. Além disso, estes polimorfismos associados ao gene NOD2 diminuem a ativação do NF- κ B em resposta à presença de peptidoglicanos ou muramildipeptídeo, constituintes da parede bacteriana. Desta forma, a capacidade de distinção entre agentes patogénicos e não patogénicos está comprometida, com alteração da resposta imunitária adaptativa [5, 34].

Encontrou-se igualmente relação entre as mutações genéticas ligadas à DII e os TLR's. O gene NOD2 modula respostas com base nos TLR2, 3 e 4, com produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF-alfa, com diminuição da eficiência da resposta imunitária [5].

Apesar da homozigotia para o gene NOD2 representar um risco 20 vezes superior para doença de Crohn, principalmente de localização ileal, menos de 20% dos doentes com DC são homozigóticos para o gene [34].

3.2.2. O ambiente

Revisões sistemáticas mostraram uma relação negativa entre o aporte vegetal da dieta e o risco de DII, nomeadamente de CU, enquanto o aporte lipídico (colesterol total), ácidos gordos ómega 6 e a ingesta de carne apresentaram correlação positiva com o risco da doença [35].

Os fatores dietéticos individuais e o balanço energético foram sugeridos como importantes agentes na indução, direta ou indireta, de alterações na população microbiota e na integridade da barreira intestinal, assim como na regulação das respostas imunitárias. O aporte energético excessivo foi reconhecido como um agente de crescimento de patógenos de sede intestinal. Desta forma, é reconhecido o potencial da modulação nutricional como agente de prevenção e tratamento de fases precoces da doença inflamatória intestinal [35]. Os açúcares refinados e os aditivos alimentares, tais como o ferro, podem levar a um aumento da proliferação de estirpes bacterianas patogénicas, incluindo *E coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterococcus faecalis*, sendo necessária e benéfica a sua evicção da dieta diária [36].

A evidência científica aponta fortemente na direção de uma relação entre alterações poligenéticas e a DII, sendo a heterogeneidade da DII resultante tanto da complexidade do

background genético individual, como dos estilos de vida e fatores ambientais, sem excluir as variações interpessoais da microbiota [34].

4. Microbiota na base do tratamento da DII

Determinadas estirpes bacterianas têm sido relacionadas com um papel protetor ativo no combate ao aparecimento da DII, tanto competindo diretamente com agentes patogénicos, como prevenindo a sua colonização intestinal, ou exercendo ainda um papel anti-inflamatório local [37].

Os probióticos foram definidos, conjuntamente pela FAO (*Food and Agriculture Organization*), e pela OMS (Organização Mundial de Saúde), em 2001, como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício de saúde ao hospedeiro” [37].

Os prebióticos são definidos como alimentos / fibras naturais não digeríveis que induzem alterações específicas na microbiota, fornecendo benefício ao hospedeiro, em bem-estar e saúde [36].

Os simbióticos consistem em suplementos nutricionais que combinam probióticos com prebióticos, permitindo a sinergia dos benefícios de cada um [37].

4.1. Probióticos

O facto de uma microbiota mais suscetível à proliferação de microrganismos patogénicos e à instalação de doença poder ser passível de remodelagem através da administração de probióticos, resultando numa flora mais robusta e resistente à doença, é ainda uma questão sem resposta sólida [37].

Os estudos realizados nesta temática poderão apresentar resultados mais fidedignos e reprodutíveis se otimizados: através da utilização de determinadas estirpes por cada estudo; das formulações utilizadas (misturas de probióticos ou simbióticos); e da manipulação da dieta de forma a modificar o perfil microbiótico e metabólico global [22, 25 - 27, 36].

Os polimorfismos genéticos relacionados com a DII poderão ser controlados através da administração probiótica, e vice-versa. Polimorfismos dos genes relacionados com a DII, dos quais o FUT2 (que codifica α 1,2-fucosiltransferase, e está associado a perfis alterados da microbiota) é exemplo, pode melhorar a resposta seletiva a prebióticos [36].

4.1.1. Colite Ulcerosa

Vários probióticos têm sido testados nos doentes com CU, tanto isoladamente como em combinação de estirpes. Entre os probióticos, a *E. coli* Nissle 1917 (uma estirpe não patogénica de *E. Coli*), em administrações isoladas, é a melhor estudada. Quatro estudos randomizados concluíram que seria tão eficaz e segura quanto a administração de um salicilato, a messalazina, na manutenção da remissão em doentes com CU [9, 17, 38, 39].

Adicionalmente, a administração retal de *E. Coli* Nissle 1917 foi significativamente mais eficaz do que o placebo em doentes com CU ligeira a moderada, em fase ativa e em localizações distais. [39].

O *Lactobacillus rhamnosus* GG foi comparável à messalazina na manutenção da remissão da CU. Igualmente, foi testada a administração retal de Lactobacilli em doentes com CU do hemicílon esquerdo, tendo sido obtidos resultados interessantes: um curso de tratamento de 8 semanas com *Lactobacillus reuteri* obteve taxas de remissão significativamente maiores do que o placebo, em amostras pediátricas [40].

As leveduras têm sido igualmente alvo de investigação no contexto da colite ulcerosa. A levedura probiótica *Saccharomyces boulardii* (*S. boulardii*) mostrou eficácia na indução de remissão em doentes com CU ativa ligeira a moderada, intolerantes a corticosteroides, assim como na remissão de colite ulcerosa ligeira a moderada, de localização distal, em doentes intolerantes a salicilatos [41]. No entanto, os estudos disponíveis, sendo não randomizados e não controlados, não permitem que se retirem conclusões fidedignas acerca do papel do *S. boulardii* na colite ulcerosa [41].

As combinações de probióticos têm sido largamente investigadas nos doentes com CU, sendo a combinação representada por VSL#3 a mais extensamente estudada. A VSL#3 pode ser definida como um *cocktail* probiótico composto por estirpes pertencente ao género *Bifidobacterium* (*Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, e *Bifidobacterium longum*), e quatro estirpes pertencentes ao género *Lactobacillus* (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactobacillus plantarum*) [42].

Esta mistura mostrou, num primeiro estudo não randomizado e de pequena dimensão [5], ser eficaz na manutenção da remissão clínica da CU em doentes intolerantes ou alérgicos aos salicilatos [5]. Desde então, os benefícios do VSL#3 têm sido comprovados em vários estudos subsequentes, nomeadamente em estudos controlados e randomizados com utilização de placebo. Estes demonstram claramente a eficácia da mistura, quando administrada durante 6 a 12 semanas, na indução de remissão em doentes com CU ligeira a moderada sem resposta a tratamento com corticoterapia convencional, ou sem terapia prévia [42, 43].

Os resultados obtidos em adultos foram confirmados na população pediátrica, tanto na indução como na manutenção da remissão da colite ulcerosa leve a moderada, tanto em ensaios abertos como em estudos controlados com placebo [44].

Uma meta-análise de 2014 reuniu dados de estudos controlados randomizados publicados em inglês, que pretendiam estabelecer qual a eficácia da mistura probiótica VSL#3 em doentes adultos com CU. Os autores concluíram que a mistura, dada conjuntamente com a terapêutica convencional para a CU (com messalazina e/ou imunomoduladores), melhorava as taxas de resposta (Odds Ratio (OR) = 3.03; 95%; intervalo de confiança (IC) = 1.89–4.83; $p < 0.001$) e de remissão (OR = 2.4; 95% CI = 1.48–3.88; $p = 0.007$) quando comparada com a administração isolada de terapêutica convencional [45].

Os efeitos da mistura VSL#3 são particularmente interessantes numa entidade clínica distinta, a pouchite. Passamos a contextualizar sucintamente esta patologia e as evidências na utilização de VSL#3 [46].

A proctocolectomia total com encerramento em bolsa ileal e anastomose íleo-anal representa hoje em dia o tratamento cirúrgico de escolha para os doentes com polipose adenomatosa familiar ou CU. A pouchite, uma inflamação não específica (idiopática) do reservatório ileal, é a complicação pós-operatória a longo prazo mais comum no tratamento cirúrgico da CU com este tipo de anastomose [46].

A etiologia da pouchite é ainda desconhecida, sendo presumivelmente multifatorial. No entanto, a resposta imediata ao tratamento com antibióticos sugere um papel patogénico da microbiota, sendo que recentemente a pouchite foi associada a uma menor proporção bactérias anaeróbias/aeróbias, e a uma diminuição da concentração de lactobacilos e bifidobactérias nas fezes destes doentes [46].

Associadamente a esta resposta ao tratamento com antibióticos, é evidente a superioridade da mistura VSL#3 no tratamento da pouchite em vários estudos. Destaca-se um estudo com 40 doentes com pouchite divididos em dois grupos e sujeitos a tratamento com placebo versus VSL#3. Todos os 20 pacientes tratados com placebo mostraram uma recaída

durante o período de follow-up. Em contraste, 17 dos 20 (85%) pacientes tratados com VSL # 3 ainda estavam em remissão após 9 meses. Curiosamente, todos estes 17 pacientes mostraram recidiva da inflamação após 4 meses de suspensão do tratamento ativo com a mistura probiótica. As concentrações fecais de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, e *Streptococcus thermophilus* aumentaram significativamente 1 mês após o início do tratamento, mantendo-se estáveis apenas no grupo de doentes sob VSL#3 [46].

No que diz respeito ao mecanismo de ação da mistura nestes doentes, crê-se que a administração contínua de VSL # 3 diminui a atividade das metaloproteinases da matriz (grupo de enzimas capazes de degradar vários componentes da matriz extracelular), aumenta significativamente os níveis teciduais de IL-10, e diminui significativamente os níveis nos tecidos das citocinas pró-inflamatórias IL-1, TNF-alfa e interferão γ [46].

Os efeitos de outras combinações probióticas foram igualmente avaliados, embora não tenham sido obtido resultados tão expressivos quanto os verificados com a mistura VSL#3. As misturas de *Lactobacillus* não mostraram eficácia clínica no tratamento da colite ulcerosa. A suplementação de messalazina com *Lactobacillus delbruekii* e *Lactobacillus fermentum* foi eficaz na diminuição quer dos níveis cólicos de IL-6, NF- κ B e TNF- α , quer do recrutamento leucocitário, assim como dos níveis de calprotectina fecal, na colite ulcerosa leve a moderada, embora sem repercussão significativa na clínica dos doentes [46].

Foram feitos ensaios clínicos utilizando combinações de estirpes pertencentes aos géneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. A estirpe BB-12 de *Bifidobacterium lactis* e a estirpe LA-5 do *L. acidophilus* não mostraram eficácia superior ao placebo, na manutenção da remissão [47]. Por outro lado, a combinação de *Streptococcus faecalis* T-110, *Clostridium butyricum* TO-A e *Bacillus mesentericus* (BIO-THREE) mostrou resultados positivos na indução ou

manutenção da remissão em doentes com CU ativa ligeira, indicando tanto eficácia como segurança na administração desta mistura no âmbito do tratamento das DII [49].

Várias revisões sistemáticas e meta-análises referentes à eficácia dos probióticos, tanto na indução como na manutenção da remissão em doentes com colite ulcerosa mostraram resultados discrepantes entre si. Uma revisão sistemática com a chancela do Cochrane Collaboration Group não encontrou vantagem estatisticamente significativa na administração de probióticos versus placebo e/ou terapêutica convencional, em termos de remissão clínica em doentes com colite ativa [50].

Tal ausência de evidência foi igualmente encontrada em análises posteriores [51]. No entanto, dados mais recentes de uma meta-análise de estudos controlados randomizados revelaram taxas de remissão significativamente maiores para o grupo dos probióticos em comparação com placebo, em doentes com CU ativa ($p=0.0001$, risco relativo 1.80). Na análise de subgrupos, esta vantagem só foi confirmada para a mistura VSL#3 ($p=0.004$, risco relativo 1.74) [5].

Outro estudo em modelos animais demonstrou que a conjugação de 2 probióticos melhorava significativamente as funções da barreira epitelial, tanto em condições livres de doença como em estados inflamatórios. Assim, os autores determinam a utilização de probióticos em distúrbios gastrointestinais associados a disfunção epitelial [52].

A administração de probióticos em iogurte foi igualmente testada. Num estudo que visava avaliar as alterações dos parâmetros inflamatórios após a ingestão de iogurte suplementado com um probiótico (*Lactobacillus rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14) em doentes com DII (20 doentes, em que 15 sofriam de DC e 5 de CU versus 20 indivíduos saudáveis no grupo de controlo), foi evidenciado que após um mês de ingestão deste iogurte, os doentes apresentavam uma diminuição significativa de células T reguladoras [54].

Numa primeira análise aos estudos apresentados, podemos observar que os dados disponíveis não são conclusivos quanto ao uso de probióticos, mesmo em casos de doença em fase de remissão.

4.1.2. Doença de Crohn

Os ensaios clínicos visando o uso de probióticos centram-se maioritariamente nos doentes com colite ulcerosa, estando disponível um menor número de estudos na DC. Dignass et al [12], na publicação que constitui o consenso das linhas orientadoras da European Crohn's and Colitis Organization (ECCO) para o tratamento da DC, evidencia os estudos mais relevantes e seus resultados, no contexto da avaliação da terapêutica probiótica nesta doença [12]. Tomando como primeiro exemplo o *Lactobacillus casei* DN-114 001, a sua administração em doentes com DC demonstrou uma forte inibição de estirpes aderentes invasivas de *E. Coli* (AEIC), sugerindo que este probiótico poderia ser de valor terapêutico significativo nesta doença [9, 55, 56].

Em contrapartida, noutros estudos, o mesmo grupo de *Lactobacillus* não foi capaz de demonstrar o poder terapêutico que se antevia segundo outros autores. Quando administrado como adjuvante, ou seja, de forma complementar, à terapia convencional (aminossalicilatos e/ou imunossuppressores e/ou esteroides) de forma a prolongar o intervalo livre de doença na população pediátrica com DC em remissão, o *L. rhamnosus GG* não conseguiu demonstrar superioridade sobre o placebo [9].

Em dois estudos controlados randomizados, o *Lactobacillus johnsonii* (*L. johnsonii*) não foi eficaz na prevenção de recorrência pós-operatória da DC [57, 58]. Mesmo quando os dados destes estudos foram reunidos e submetidos a uma meta-análise, o *Lactobacillus* não demonstrou qualquer diferença estatisticamente significativa nas taxas de recidiva na DC em remissão

(clínica ou cirúrgica). O risco relativo da recidiva no grupo do *Lactobacilli* versus placebo foi de 1,15 [intervalo de confiança (IC) de 95% = 0.90–1.48], enquanto que o risco relativo da recidiva endoscópica foi de 1.31 (95% IC = 0.57–3.00). Adicionalmente, verificou-se uma ausência de eficácia destas bactérias na regulação da produção de citocinas pró-inflamatórias IL-10 pelas células T CD4+ do epitélio intestinal, mecanismo habitualmente desregulado na presença de DII [20, 57, 58, 59].

Dados relativos a outras bactérias probióticas, tais como a *E. coli* Nissle 1917, ou à mistura VSL#3, são relativamente escassos, antigos e pouco sólidos [5, 17].

Embora com resultados potencialmente promissores noutros estudos, o *S. boulardii* não provou ser melhor do que o placebo a melhorar as taxas de remissão ou o *score* CDAI em doentes com DC ativa [60].

Duas revisões sistemáticas realizadas pela Cochrane Database, demonstraram não existir evidência da superioridade dos probióticos sobre placebos na indução e na manutenção da remissão em doentes com DC [9].

A escassez de ensaios controlados randomizados, e o pequeno número de doentes submetidos a ensaios clínicos constituem as grandes limitações dos estudos publicados [61].

4.2. Prebióticos e Simbióticos

4.2.1. Colite Ulcerosa

No que diz respeito aos prebióticos, os dados atualmente disponíveis sobre o seu uso para o tratamento da CU são ainda escassos e algo fragmentados. De entre os prebióticos disponíveis, os géneros alimentares com cevada germinada (GBF, *germinated barley foodstuff*) são os mais frequentemente estudados. O GBF é um prebiótico rico em glutamina e em

hemicelulose, isolado fisicamente do bagaço de cerveja [5]. Em modelos animais com ratinhos, o tratamento com GBF levou a um aumento na produção de ácidos gordos de cadeia curta, e a uma diminuição nos movimentos peristálticos, assim como a uma melhoria do nível de dano tecidual do cólon e da frequência de diarreia sanguinolenta [5].

Quando adicionada à terapêutica convencional para a CU, com o objetivo de manter a fase de remissão na doença quiescente, o GFB apresentou uma diminuição significativa das taxas de recorrência quando comparado com uma estratégia de tratamento convencional, apresentando igualmente uma diminuição das citocinas pró-inflamatórias séricas IL6 e IL-8, e um aumento do número de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* de efeito benéfico na flora comensal [61, 62].

O estimulante de crescimento bifidogénico é uma preparação prébiotica que contém 20% de soro de leite liofilizado fermentado com *Propionibacterium freudenreichii* ET-3, uma bactéria utilizada na confeção do queijo suíço, que estimula seletivamente o crescimento de bifidobactérias através da ação do seu ingrediente principal, o ácido 1,4- dihidroxi-2-naftóico. A administração oral do estimulante de crescimento bifidogénico, em associação com a terapêutica convencional (salicilatos e/ou esteroides) durante 4 semanas, levou a uma melhoria no índice de atividade clínica e do aspeto endoscópico. Estes resultados levaram os autores a afirmar a possibilidade deste prebiótico se apresentar como uma alternativa não tóxica de tratamento da CU [63].

Há relatos esporádicos do uso de simbióticos na CU, sem resultados suficientemente concretos. A combinação entre *Bifidus longum* e Sinergy 1 (um substrato de inulina oligofrutose) foi avaliada nos doentes com CU ativa, como adjuvante ao tratamento médico convencional, num pequeno estudo randomizado controlado com placebo, demonstrando uma tendência ($p=0,06$) de benefício sobre o placebo [64].

Um outro estudo controlado randomizado, levado a cabo em doentes com CU de grau ligeiro a moderado, em fase de remissão, demonstrou a superioridade da combinação entre o probiótico *B. longum* e o prebiótico *Psyllium* (em associação com a terapêutica médica convencional) sobre a administração isolada do probiótico ou do prebiótico no que diz respeito à qualidade de vida associada à DII (avaliada através de questionários estandardizados, Inflammatory Bowel Disease Questionnaires) e à capacidade de redução da proteína C reativa (CRP, *C-reactive protein*, um reagente de fase aguda indicador de inflamação), respetivamente [65].

A administração de inulina associada com uma série de probióticos com presumível benefício no contexto dos distúrbios gastrointestinais (*Bifidobacterium infantis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus sporogenes* e *Streptococcus thermophilus*) em períodos curtos de tratamento, demonstrou taxas interessantes de remissão clínica em doentes com CU recidivante (45%), mesmo depois de tratados com messalazina [5].

Adicionalmente, um curso de tratamento de um ano com esteroides e salicilatos, conjuntamente com um simbiótico composto por *B. breve* e um galactooligossacarídeo, resultou numa melhoria significativa em doentes com CU ativa, de grau ligeiro a moderado [66].

Por fim, foram investigados, num pequeno ensaio não randomizado, os efeitos de um simbiótico composto por papa de aveia e *L. plantarum* 299v administrado em conjunto com a terapêutica convencional, tendo sido obtidos resultados satisfatórios na redução do índice clínico de atividade da CU, o SCCAI [5].

4.2.2. Doença de Crohn

Para esta doença, os dados disponíveis sobre prebióticos e simbióticos são ainda mais escassos do que os disponíveis para os probióticos. Num pequeno ensaio clínico, foi fornecida uma suplementação de frutooligossacarídeos que aumentou a flora de *Bifidoacterium* na mucosa intestinal e no conteúdo fecal, melhorando o score CDAI em dez doentes com DC ativa [67]. No entanto, um ensaio clínico duplamente cego, controlado com placebo, feito a maior escala, não confirmou estes resultados [68].

A administração de inulina enriquecida com oligofrutose durante 4 semanas, foi eficaz na redução da atividade inflamatória da doença, e na modulação da composição microbiota, aumentando a concentração da espécie *B. longum*, num estudo controlado com placebo realizado em doentes com DC activa, de grau ligeiro a moderado, ou quiescente [69].

Também foi estudada, no âmbito da DC, a lactulose como agente prebiótico terapêutico. O estudo em causa concluiu que este dissacarídeo não oferecia benefícios aos doentes com DC, particularmente no que diz respeito ao índice de atividade clínica da doença.

Os autores apontam para a importância de mais e mais alargados estudos nesta área para que se possa avaliar de forma eficaz o potencial benefício dos prebióticos na qualidade de vida dos doentes com DII [70].

Uma mistura simbiótica de *B. longum* com Synergy 1 foi eficaz na melhoria da sintomatologia, na redução do índice CDAI, e nos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias, aumentando a concentração de bifidobactérias na microbiota [61, 71].

Em conclusão, probióticos, prebióticos e simbióticos são efetivamente alvo de investigação no âmbito da doença de Crohn, mas, à semelhança do que já foi descrito nos capítulos anteriores, de forma pouco sustentada [19, 37].

5. Discussão e Conclusão

O ser humano e a sua microbiota evoluíram conjuntamente ao longo dos tempos até atingirem um estado de tolerância e até de sinergismo, com benefícios mútuos para ambas as partes como resultado das suas atividades e dinâmica. Cada vez mais se reúne evidência, tanto em estudos animais como em humanos, sugestiva de que a DII representa um desequilíbrio nesta dinâmica indivíduo/microbiota. [12, 13, 14, 18, 22, 30, 36, 72].

Assim, os probióticos e prebióticos têm sido investigados em ensaios clínicos como potenciais recursos terapêuticos na DII. Vários estudos revelam eficácia dos probióticos na terapêutica da colite ulcerosa, mas os estudos com probióticos e prebióticos na doença de Crohn são menos sólidos [72]. Todavia, num grande número de estudos os resultados obtidos são incongruentes e, por vezes, conflitantes.

5.1. Segurança

Vários estudos foram levados a cabo na tentativa de perceber melhor o perfil de segurança dos probióticos, e as revisões sistemáticas disponíveis concordam na segurança parcial, embora não total, da administração de probióticos [5, 9, 73, 74].

No entanto, esta segurança é objeto de avaliação contínua, através do estudo dos diferentes tipos/estirpes componentes, da forma farmacêutica utilizada, das condições clínicas dos doentes, e do propósito da sua utilização [73].

Numa revisão sistemática com a chancela do Cochrane Collaboration Group sobre o uso dos probióticos na manutenção da remissão em doentes com CU, o perfil de segurança da messalazina não foi estatisticamente diferente do perfil dos probióticos (4 estudos, com um total de amostra de 147 indivíduos; índice de reações adversas: 26% para o grupo da messalazina e

24% para o grupo dos probióticos, Odds Ratio 1.21; 95% CI = 0.80–1.84) [50]. A recidiva foi relatada em 40,1% dos doentes no grupo de probióticos, em comparação com 34,1% dos doentes no grupo de messalazina (3 estudos; 555 doentes: OR: 1,33, IC de 95%). Não houve diferença estatisticamente significativa na incidência de reações adversas. Vinte e seis por cento dos doentes no grupo de probióticos apresentaram pelo menos uma reação adversa em comparação com 24% dos doentes no grupo de messalazina (2 estudos, 430 doentes, OR:1,21, IC 95%). As reações adversas relatadas nos estudos controlados com messalazina incluíram diarreia, presença de muco e sangue nas fezes, dor abdominal, flatulência e distensão, náuseas, vômitos e dor de cabeça.

Um pequeno estudo controlado com placebo (amostra de 32 doentes), não encontrou nenhuma diferença estatisticamente significativa na eficácia do probiótico. Setenta e cinco por cento dos doentes tratados com probióticos apresentaram recaída no espaço de um ano em comparação com 92% dos doentes tratados com placebo (OR 0,27; IC 95%). As reações adversas relatadas no estudo controlado por placebo incluíram flatulência, distensão abdominal e dor, alterações na consistência fecal, artralgia, sacroileíte, cansaço, incontinência, *stress*, xeroftalmia, cefaleia, tontura, síndrome gripal, gastroenterite, cistite e pneumonia. Dado o número relativamente pequeno de doentes na análise conjunta, o pequeno número de eventos, e o alto risco de viés nos estudos incluídos, os autores concluíram não haver provas suficientes para tirar conclusões sobre a eficácia dos probióticos para a manutenção da remissão na UC [50].

Globalmente, as principais preocupações referentes à segurança prendem-se com o risco de sépsis e de infecção, desregulação e/ou hiperestimulação imunitária, resistência a antibióticos, ou a transferência genética de resistências à flora comensal [74, 75].

Devido a estes riscos potenciais, os probióticos devem ser utilizados com precaução, ou até evitados, em doentes com febres altas, na presença de doença ou compromisso grave do sistema imunitário, quando usados em conjunto com quimioterapia antineoplásica ou fármacos imunossuppressores, na pancreatite aguda, na doença valvular cardíaca, ou em doentes com lesões extensas da barreira epitelial intestinal (como por exemplo na enterite rádica).

Este último ponto levou a comunidade científica a afirmar que, embora os probióticos sejam genericamente considerados fármacos seguros no tratamento da DII, a sua administração em doentes com inflamação intestinal marcada (doença grave ativa), logo com provável lesão da barreira epitelial intestinal, e conseqüente risco aumentado de bacteriemia, deve ser cuidadosamente ponderada [74, 75].

5.2. Solidez da evidência

São necessários ensaios futuros para determinar, para além da eficácia e segurança da terapêutica, quais as estirpes bacterianas mais eficazes, e como os perfis genéticos do paciente e da própria microbiota podem influenciar a resposta ao tratamento [76].

Os prebióticos não estão extensivamente estudados, no entanto poderão apresentar-se como uma solução terapêutica ideal, isoladamente ou em associação com a terapêutica convencional, devido à sua capacidade para aumentar o número de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* [61]. Várias meta-análises apresentam resultados inconclusivos devido ao facto de os probióticos testados serem constitucional e funcionalmente diferentes, o que enviesa a sua análise conjunta [5, 9, 19, 37]. Nos ensaios utilizando misturas probióticas em que o foco foi direccionado apenas a um dos substratos (como no caso dos estudos levados a cabo com VSL#3 ou com a *E. coli* Nissle 1917), os resultados ganharam maior consistência, sendo por isso considerados e referidos nas *guidelines* internacionais. Todavia, são necessários mais

investimentos na área do estudo da ação dos probióticos na DII para que se obtenham resultados mais conclusivos [9].

As metodologias dos estudos atualmente disponíveis variam significativamente, resultado do largo espectro de probióticos, prebióticos e simbióticos a serem testados em grupos de doentes de características diversas, e com objetivos finais de estudo distintos. Desta forma, conclusões sólidas sobre qualquer tratamento num grupo específico de doentes só poderão ser atingidas através da separação dos resultados dos diferentes objetos de estudo [37, 72].

Não existem dois probióticos exatamente iguais. Desta forma, reforça-se a ideia de que não deveremos esperar resultados sobreponíveis em ensaios clínicos cujo alvo de estudo são estirpes de diferentes famílias, com formulações diversas, assim como doses e administrações que não são sobreponíveis [77].

Atualmente encontramos em comercialização tanto formulações com apenas um probiótico, como misturas probióticas, sendo estas últimas tendencialmente mais eficazes contra um largo espectro de bactérias patogénicas. No entanto, ainda permanece pouco claro se estes resultados se devem a um sinergismo entre as estirpes da mistura ou a uma maior concentração probiótica [78].

Apesar das grandes expectativas, refletidas no número significativo de estudos, revisões e artigos publicados em revistas científicas de renome, os ensaios com desenhos de investigação e amostras adequados são ainda escassos. O espectro variado de microrganismos utilizados para este fim é alargado, e a qualidade da evidência científica é claramente pior nas DII do que noutras entidades, como por exemplo na pouchite. Perante as evidências dos ensaios clínicos, foram incorporadas recentemente nas orientações da ECCO o uso de VSL # 3 tanto para a manutenção da remissão da pouchite induzida por antibióticos como para a sua prevenção.[37, 46, 79, 80].

5.3. Durabilidade do efeito

Apesar da crescente popularidade entre os doentes, as revisões bibliográficas atuais sobre o tema probióticos/prebióticos sugerem que a microbiota adulta é uma estrutura altamente estável e resistente a terapêuticas de curta duração. De facto, a maioria da evidência científica demonstra que os agentes terapêuticos direcionados à microbiota na DII desencadeiam alterações rápidas da composição da mesma, que rapidamente são revertidas para o padrão pré-terapêutico, uma vez terminada a terapia [81].

No entanto, admite-se uma abordagem potencialmente terapêutica através da administração de anti-inflamatórios clássicos, (messalazina e corticosteroides) e/ou terapêutica biológica, seguida da administração de probióticos e/ou prebióticos a longo prazo. Este tipo de abordagem poderá levar a uma indução rápida da remissão clínica e ao restabelecimento da mucosa, mantidos sustentadamente pela administração conjunta de probióticos. Embora já existam estudos nesse sentido, tal premissa carece ainda de maior validação científica [81].

5.4. Aplicabilidade prática

Embora promissores, vários probióticos revelam-se de difícil utilização, por impeditivos fisiológicos (a exposição de algumas estirpes probióticas a agressões tais como o cloreto de sódio, biliar e baixo pH pode prejudicar a sua sobrevivência e viabilidade) ou por dificuldades tecnológicas na sua aplicação terapêutica. Consequentemente, discutem-se atualmente várias estratégias por forma a elaborar formulações probióticas aplicáveis à prática clínica. Tais estratégias poderão passar pela produção de recetores-alvo para toxinas e patógenos específicos por biotecnologia genética, por forma a criar probióticos mais robustos, e pela identificação de novos genes que possam influenciar a resposta dos microrganismos presentes na microbiota [82].

Para além das dificuldades inerentes à fisiologia e própria aplicabilidade terapêutica, encontramos também várias discrepâncias clínicas geográficas dentro da entidade DII. Os vários estudos abordados nesta revisão apresentam este “viés”, quando sujeito a uma análise conjunta: várias populações de vários pontos geográficos do globo não terão, à partida, a mesma base ambiental para que seja possível uma comparação cientificamente válida. Assim, enquanto os estudos alargados de associação genómica forneceram importantes detalhes sobre a patogénese da DII, as investigações sobre a distribuição de variantes genéticas pelas diferentes populações não conseguem explicar as grandes diferenças na prevalência da DII entre diferentes áreas geográficas, não havendo paralelismo entre os estudos genómicos e os estudos de base populacional. [16, 34].

5.5. Considerações finais

A DII acarreta níveis consideráveis de morbilidade e de impacto na qualidade de vida dos doentes, mas as suas linhas de orientação terapêutica encontram-se bem definidas, tanto no controlo das exacerbações como dos períodos de remissão da doença [9, 11].

Os probióticos e prebióticos podem efetivamente apresentar-se como um adjuvante terapêutico no controlo da DII, complementando a terapêutica clássica. Este novo paradigma terapêutico permanece ainda por comprovar, mas apresenta um potencial que deverá estimular a realização de novos e mais estudos adequadamente desenhados por forma a demonstrar o benefício desta “classe farmacológica”, concomitantemente com uma redução da toxicidade e dos custos.

É igualmente necessário compreender mais extensivamente os mecanismos por detrás da sua ação na microbiota gastrointestinal, por forma a determinar qual o probiótico, prebiótico ou simbiótico que confere mais benefício. Uma seleção apropriada, combinada com a realização

de estudos com maior solidez, podem ser os fatores responsáveis pela definitiva confirmação da eficácia e conseqüente adoção desta terapêutica [22, 25 – 27, 36, 37, 61, 72, 77, 81, 83, 84].

Desta forma, as linhas de orientação clínica (*guidelines*) são extremamente cautelosas na posição assumida quanto ao papel dos probióticos na DII. As últimas orientações da European Crohn's and Colitis Organization (ECCO) não recomendam o uso generalizado de probióticos para atingir a remissão da DII, embora reconheçam de forma prudente o suposto papel da mistura probiótica VSL#3. A mesma organização atribui um grau de recomendação 1 (isto é, existem evidências e/ou consenso geral de que determinado procedimento ou tratamento é benéfico, útil e eficaz) e nível de evidência b (ou seja, a informação foi recolhida a partir de um único ensaio clínico randomizado ou de estudos alargados não aleatórios) à utilização de *E. Coli* Nissle 1917 como um substituto da messalazina na manutenção da remissão da CU [84]. No que diz respeito à DC, e com base na evidência disponível, as últimas linhas orientadoras da ECCO não recomendam a utilização de probióticos na manutenção do estado de remissão da doença [9].

Num breve apontamento, no que diz respeito à população pediátrica, as *guidelines* da European Crohn's and Colitis Organization - European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition (ECCO-ESPGHAN) não recomendam o uso de probióticos para indução ou manutenção da remissão, embora afirmem que existem probióticos, especialmente o VSL#3 e o *E. coli* Nissle 1917 que poderão ser considerados, embora com precaução, em doentes de idade pediátrica, intolerantes à messalazina e com colite ulcerosa ligeira a moderada, ou como adjuvante em doentes com atividade ligeira residual, apesar de sujeitos à terapêutica convencional [86].

É assim possível afirmar a existência de um papel da microbiota na fisiopatologia das DII, sendo este um alvo de investigações futuras, por forma a se compreender totalmente todos

os mecanismos envolvidos nesta fisiopatologia. Podemos estar perante uma solução terapêutica em potência, com benefício categórico para os doentes com este grupo de patologias, sendo sempre este o propósito fundamental da atuação médica.

6. Agradecimentos

À Prof.^a Doutora Anabela Mota Pinto, minha Orientadora, pela infindável paciência e rigor com que acompanhou a elaboração deste artigo de revisão.

Ao Mestre Rui Gradiz, meu Coorientador, pela sua disponibilidade, empenho, dedicação e, sobretudo, pelo seu espírito crítico ao longo de todo o processo de elaboração do presente trabalho.

Ao meu namorado e colega Manuel Pedro Guedes, pelo porto seguro que sempre me proporcionou.

À minha mãe e à minha avó, meus exemplos de vida.

A toda a minha família e amigos pelo apoio nas horas de maior trabalho e pela presença constante.

7. Bibliografia

1. Quigley EM. Gut microbiota and the role of probiotics in therapy. *Curr Opin Pharmacol.* 2011;11(6):593-603.
2. Quigley EM. Probiotics in gastrointestinal disorders. *Hosp Pract (1995).* 2010;38(4):122-9.
3. Mennigen R, Bruewer M. Effect of probiotics on intestinal barrier function. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1165:183-9.
4. Pueyo B, Mach N. Intestinal dysbiosis in pediatric patients with Crohn's disease. *Nutr Hosp.* 2013;28(6):1820-8.
5. 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.
6. Bernstein CN. Antibiotics, probiotics and prebiotics in IBD. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser.* 2014;79:83-100.
7. Meijer BJ, Dieleman LA. Probiotics in the treatment of human inflammatory bowel diseases: update 2011. *J Clin Gastroenterol.* 2011;45 Suppl:S139-44.
8. Floch MH, Walker WA, Madsen K, Sanders ME, Macfarlane GT, Flint HJ, et al. Recommendations for probiotic use - 2011 update. *J Clin Gastroenterol.* 2011;45 Suppl:S168-71.
9. Dignass A, Van Assche G, Lindsay JO, Lemann M, Soderholm J, Colombel JF, et al. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Current management. *J Crohns Colitis.* 2010;4(1):28-62

10. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut*. 2006;55(6):749-53.
11. Bressler B, Marshall JK, Bernstein CN, Bitton A, Jones J, Leontiadis GI, et al. Clinical practice guidelines for the medical management of nonhospitalized ulcerative colitis: the Toronto consensus. *Gastroenterology*. 2015;148(5):1035-58.e3.
12. Shih DQ, Targan SR. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2008;14(3):390-400
13. Pandolfi F, Cianci R, Pagliari D, Landolfi R, Cammarota G. Cellular mediators of inflammation: tregs and TH17 cells in gastrointestinal diseases. *Mediators Inflamm*. 2009;2009:132028.
14. 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
15. Sommer F, Backhed F. The gut microbiota-masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(4):227-38.
16. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011;473(7346):174-80.
17. Greer RL, Morgun A, Shulzhenko N. Bridging immunity and lipid metabolism by gut microbiota. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(2):253-62; quiz 63.
18. Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2008;134(2):577-94.
19. Banerjee A, Gerondakis S. Coordinating TLR-activated signaling pathways in cells of the immune system. *Immunol Cell Biol*. 2007;85(6):420-4.

20. Hvas CL, Kelsen J, Agnholt J, Hollsberg P, Tvede M, Moller JK, et al. Crohn's disease intestinal CD4+ T cells have impaired interleukin-10 production which is not restored by probiotic bacteria. *Scand J Gastroenterol.* 2007;42(5):592-601.
21. Tremaroli V, Backhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature.* 2012;489(7415):242-9.
22. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(5):313-23.
23. Hooper LV, Macpherson AJ. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(3):159-69.
24. Hill DA, Siracusa MC, Abt MC, Kim BS, Kobuley D, Kubo M, et al. Commensal bacteria-derived signals regulate basophil hematopoiesis and allergic inflammation. *Nat Med.* 2012;18(4):538-46.
25. Bai AP, Ouyang Q. Probiotics and inflammatory bowel diseases. *Postgrad Med J.* 2006;82(968):376-82.
26. Prantera C, Scribano ML. Antibiotics and probiotics in inflammatory bowel disease: why, when, and how. *Curr Opin Gastroenterol.* 2009;25(4):329-33.
27. Sanders ME, Guarner F, Guerrant R, Holt PR, Quigley EM, Sartor RB, et al. An update on the use and investigation of probiotics in health and disease. *Gut.* 2013;62(5):787-96.
28. Lapaquette P, Bringer MA, Darfeuille-Michaud A. Defects in autophagy favour adherent-invasive *Escherichia coli* persistence within macrophages leading to increased pro-inflammatory response. *Cell Microbiol.* 2012;14(6):791-807
29. Ianiro G, Gasbarrini A, Cammarota G. Letter: Faecal microbiota transplantation--not a one-size-fits-all approach. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014;40(1):119

30. Macfarlane S, Furrie E, Kennedy A, Cummings JH, Macfarlane GT. Mucosal bacteria in ulcerative colitis. *Br J Nutr.* 2005;93 Suppl 1:S67-72.
31. Kreisel W. Pathogenesis of chronic inflammatory bowel diseases. *Praxis (Bern 1994).* 2006;95(50):1965-73.
32. Franke A, McGovern DP, Barrett JC, Wang K, Radford-Smith GL, Ahmad T, et al. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet.* 2010;42(12):1118-25.
33. Barrett JC, Lee JC, Lees CW, Prescott NJ, Anderson CA, Phillips A, et al. Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region. *Nat Genet.* 2009;41(12):1330-4.
34. Bringiotti R, Ierardi E, Lovero R, Losurdo G, Di Leo A, Principi M. Intestinal microbiota: The explosive mixture at the origin of inflammatory bowel disease? *World J Gastrointest Pathophysiol.* 2014;5(4):550-9.
35. Sung MK, Park MY. Nutritional modulators of ulcerative colitis: clinical efficacies and mechanistic view. *World J Gastroenterol.* 2013;19(7):994-1004.
36. Sanders ME, Guarner F, Guerrant R, Holt PR, Quigley EM, Sartor RB, et al. An update on the use and investigation of probiotics in health and disease. *Gut.* 2013;62(5):787-96.
37. Lemann M. [Treatment of chronic inflammatory bowel diseases]. *Bull Acad Natl Med.* 2007;191(6):1125-41; discussion 41.
38. Henker J, Muller S, Laass MW, Schreiner A, Schulze J. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) for successful remission maintenance of ulcerative colitis in children and adolescents: an open-label pilot study. *Z Gastroenterol.* 2008;46(9):874-5.

39. Grabig A, Paclik D, Guzy C, Dankof A, Baumgart DC, Erckenbrecht J, et al. Escherichia coli strain Nissle 1917 ameliorates experimental colitis via toll-like receptor 2- and toll-like receptor 4-dependent pathways. *Infect Immun*. 2006;74(7):4075-82.
40. Oliva S, Di Nardo G, Ferrari F, Mallardo S, Rossi P, Patrizi G, et al. Randomised clinical trial: the effectiveness of Lactobacillus reuteri ATCC 55730 rectal enema in children with active distal ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012;35(3):327-34.
41. Plaza-Diaz J, Gomez-Llorente C, Fontana L, Gil A. Modulation of immunity and inflammatory gene expression in the gut, in inflammatory diseases of the gut and in the liver by probiotics. *World J Gastroenterol*. 2014;20(42):15632-49
42. Bibiloni R, Fedorak RN, Tannock GW, Madsen KL, Gionchetti P, Campieri M, et al. VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*. 2005;100(7):1539-46
43. Guandalini S. Update on the role of probiotics in the therapy of pediatric inflammatory bowel disease. *Expert Rev Clin Immunol*. 2010;6(1):47-54
44. Miele E, Pascarella F, Giannetti E, Quaglietta L, Baldassano RN, Staiano A. Effect of a probiotic preparation (VSL#3) on induction and maintenance of remission in children with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*. 2009;104(2):437-43.
45. Mardini HE, Grigorian AY. Probiotic mix VSL#3 is effective adjunctive therapy for mild to moderately active ulcerative colitis: a meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis*. 2014;20(9):1562-7.
46. Gionchetti P. et al. The role of antibiotics and probiotics in pouchitis. *Annals of Gastroenterology*. 2012;25:100-105.

47. Hegazy SK, El-Bedewy MM. Effect of probiotics on pro-inflammatory cytokines and NF-kappaB activation in ulcerative colitis. *World J Gastroenterol.* 2010;16(33):4145-51.
48. Wildt S, Nordgaard I, Hansen U, Brockmann E, Rumessen JJ. A randomised double-blind placebo-controlled trial with *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 for maintenance of remission in ulcerative colitis. *J Crohns Colitis.* 2011;5(2):115-21.
49. Tsuda Y, Yoshimatsu Y, Aoki H, Nakamura K, Irie M, Fukuda K, et al. Clinical effectiveness of probiotics therapy (BIO-THREE) in patients with ulcerative colitis refractory to conventional therapy. *Scand J Gastroenterol.* 2007;42(11):1306-11.
50. Naidoo K, Gordon M, Fagbemi AO, Thomas AG, Akobeng AK. Probiotics for maintenance of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011(12):Cd007443.
51. Jonkers D, Penders J, Masclee A, Pierik M. Probiotics in the management of inflammatory bowel disease: a systematic review of intervention studies in adult patients. *Drugs.* 2012;72(6):803-23.
52. Shen J, Ran HZ, Yin MH, Zhou TX, Xiao DS. Meta-analysis: the effect and adverse events of *Lactobacilli* versus placebo in maintenance therapy for Crohn disease. *Intern Med J.* 2009;39(2):103-9.
53. Resta-Lenert SC, Barrett KE. Modulation of intestinal barrier properties by probiotics: role in reversing colitis. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1165:175-82
54. Lorea Baroja M, Kirjavainen PV, Hekmat S, Reid G. Anti-inflammatory effects of probiotic yogurt in inflammatory bowel disease patients. *Clin Exp Immunol.* 2007;149(3):470-9.

55. Ingrassia I, Leplingard A, Darfeuille-Michaud A. Lactobacillus casei DN-114 001 inhibits the ability of adherent-invasive Escherichia coli isolated from Crohn's disease patients to adhere to and to invade intestinal epithelial cells. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(6):2880-7.
56. Matsumoto S, Hara T, Hori T, Mitsuyama K, Nagaoka M, Tomiyasu N, et al. Probiotic Lactobacillus-induced improvement in murine chronic inflammatory bowel disease is associated with the down-regulation of pro-inflammatory cytokines in lamina propria mononuclear cells. *Clin Exp Immunol.* 2005;140(3):417-26.
57. Marteau P, Lemann M, Seksik P, Laharie D, Colombel JF, Bouhnik Y, et al. Ineffectiveness of Lactobacillus johnsonii LA1 for prophylaxis of postoperative recurrence in Crohn's disease: a randomised, double blind, placebo controlled GETAID trial. *Gut.* 2006;55(6):842-7.
58. Van Gossum A, Dewit O, Louis E, de Hertogh G, Baert F, Fontaine F, et al. Multicenter randomized-controlled clinical trial of probiotics (Lactobacillus johnsonii, LA1) on early endoscopic recurrence of Crohn's disease after ileo-caecal resection. *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13(2):135-42.
59. Matsumoto S, Hara T, Nagaoka M, Mike A, Mitsuyama K, Sako T, et al. A component of polysaccharide peptidoglycan complex on Lactobacillus induced an improvement of murine model of inflammatory bowel disease and colitis-associated cancer. *Immunology.* 2009;128(1 Suppl):e170-80.
60. Bourreille A, Cadiot G, Le Dreau G, Laharie D, Beaugerie L, Dupas JL, et al. Saccharomyces boulardii does not prevent relapse of Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2013;11(8):982-7.

61. Geier MS, Butler RN, Howarth GS. Inflammatory bowel disease: current insights into pathogenesis and new therapeutic options; probiotics, prebiotics and synbiotics. *Int J Food Microbiol.* 2007;115(1):1-11.
62. Hanai H, Kanauchi O, Mitsuyama K, Andoh A, Takeuchi K, Takayuki I, et al. Germinated barley foodstuff prolongs remission in patients with ulcerative colitis. *Int J Mol Med.* 2004;13(5):643-7.
63. Suzuki A, Mitsuyama K, Koga H, Tomiyasu N, Masuda J, Takaki K, et al. Bifidogenic growth stimulator for the treatment of active ulcerative colitis: a pilot study. *Nutrition.* 2006;22(1):76-81.
64. Furrie E, Macfarlane S, Kennedy A, Cummings JH, Walsh SV, O'Neil D A, et al. Synbiotic therapy (*Bifidobacterium longum*/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial. *Gut.* 2005;54(2):242-9.
65. Fujimori S, Gudis K, Mitsui K, Seo T, Yonezawa M, Tanaka S, et al. A randomized controlled trial on the efficacy of symbiotic versus probiotic or prebiotic treatment to improve the quality of life in patients with ulcerative colitis. *Nutrition.* 2009;25(5):520-5.
66. Ishikawa H, Matsumoto S, Ohashi Y, Imaoka A, Setoyama H, Umesaki Y, et al. Beneficial effects of probiotic *bifidobacterium* and galacto-oligosaccharide in patients with ulcerative colitis: a randomized controlled study. *Digestion.* 2011;84(2):128-33.
67. Lindsay JO, Whelan K, Stagg AJ, Gobin P, Al-Hassi HO, Rayment N, et al. Clinical, microbiological, and immunological effects of fructo-oligosaccharide in patients with Crohn's disease. *Gut.* 2006;55(3):348-55.

68. Benjamin JL, Hedin CR, Koutsoumpas A, Ng SC, McCarthy NE, Hart AL, et al. Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of fructo-oligosaccharides in active Crohn's disease. *Gut*. 2011;60(7):923-9.
69. Joossens M, De Preter V, Ballet V, Verbeke K, Rutgeerts P, Vermeire S. Effect of oligofructose-enriched inulin (OF-IN) on bacterial composition and disease activity of patients with Crohn's disease: results from a double-blinded randomised controlled trial. *Gut*. 61. England2012. p. 958.
70. Hafer A, Kramer S, Duncker S, Kruger M, Manns MP, Bischoff SC. Effect of oral lactulose on clinical and immunohistochemical parameters in patients with inflammatory bowel disease: a pilot study. *BMC Gastroenterol*. 2007;7:36.
71. Steed H, Macfarlane GT, Blackett KL, Bahrami B, Reynolds N, Walsh SV, et al. Clinical trial: the microbiological and immunological effects of synbiotic consumption - a randomized double-blind placebo-controlled study in active Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2010;32(7):872-83.
72. Hedin C, Whelan K, Lindsay JO. Evidence for the use of probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease: a review of clinical trials. *Proc Nutr Soc*. 2007;66(3):307-15.
73. Sanders ME, Akkermans LM, Haller D, Hammerman C, Heimbach J, Hormannspurger G, et al. Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes*. 2010;1(3):164-85
74. Boyle RJ, Robins-Browne RM, Tang ML. Probiotic use in clinical practice: what are the risks? *Am J Clin Nutr*. 2006;83(6):1256-64; quiz 446-7
75. Santosa S, Farnworth E, Jones PJ. Probiotics and their potential health claims. *Nutr Rev*. 2006;64(6):265-74.

76. Rowland I, Capurso L, Collins K, Cummings J, Delzenne N, Goulet O, et al. Current level of consensus on probiotic science--report of an expert meeting--London, 23 November 2009. *Gut Microbes*. 2010;1(6):436-9.
77. Minocha A. Probiotics for preventive health. *Nutr Clin Pract*. 2009;24(2):227-41.
78. Chapman CM, Gibson GR, Rowland I. Health benefits of probiotics: are mixtures more effective than single strains? *Eur J Nutr*. 2011;50(1):1-17
79. Sans M. Probiotics for inflammatory bowel disease: a critical appraisal. *Dig Dis*. 2009;27 Suppl 1:111-4.
80. Mizock BA. Probiotics. *Disease a Month*. 2015;61:259–290.
81. Berg D, Clemente JC, Colombel JF. Can inflammatory bowel disease be permanently treated with short-term interventions on the microbiome? *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;9(6):781-95.
82. Culligan EP, Hill C, Sleator RD. Probiotics and gastrointestinal disease: successes, problems and future prospects. *Gut Pathog*. 2009;1(1):19
83. Pastorelli L, Pizarro TT, Cominelli F, Vecchi M. Emerging drugs for the treatment of ulcerative colitis. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2009;14(3):505-21
84. Cain AM, Karpa KD. Clinical utility of probiotics in inflammatory bowel disease. *Altern Ther Health Med*. 2011;17(1):72-9
85. Dignass A, Lindsay JO, Sturm A, Windsor A, Colombel JF, Allez M et al. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis Part 2:Current management. *Journal of Crohn's and Colitis* (2012) 6, 991–1030.

86. Turner D, Levine A, Escher JC, Griffiths AM, Russell RK, Dignass A et al. Management of Pediatric Ulcerative Colitis: Joint ECCO and ESPGHAN Evidence-based Consensus Guidelines *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2012;55: 340–361.