



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

PEDRO DANIEL FREIXO RIBEIRO

***Alimentação como modulador do microbioma na doença de
Crohn pediátrica: verdade ou mito?***

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE PEDIATRIA

Trabalho realizado sob a orientação de:

DOUTORA SUSANA ALEXANDRA ROBALO SANTOS ALMEIDA

PROFESSORA DOUTORA GUIOMAR GONÇALVES OLIVEIRA

MARÇO/2018

Índice

Lista de abreviaturas e acrónimos	2
Resumo.....	3
Abstract	4
Introdução.....	5
Materiais e métodos.....	8
Doença de Crohn – a fisiopatologia	9
O Microbioma intestinal.....	11
A Disbiose – que papel na Doença de Crohn?	14
i. Inflamação	17
ii. Metabolismo microbiano.....	18
iii. Genética.....	20
Dieta como agente terapêutico na DII	24
i. Nutrição entérica exclusiva	25
ii. Proteínas	31
iii. Gorduras	31
iv. Hidratos de Carbono.....	31
v. Fibras	32
vi. Vitamina D	32
vii. Dietas de exclusão	33
Discussão e Conclusão	35
Agradecimentos.....	38
Lista de referências bibliográficas.....	39

Lista de Abreviaturas e Acrónimos

16S rRNA – Ácido ribonucleico ribossomal 16S

AIEC – *Escherichia coli* aderente e invasiva

APCs – Células apresentadoras de antígenos

CEACAM6 – Antígeno carcinoembriogénico relacionado com a molécula de adesão 6

CS – Corticoesteróides

CU – Colite ulcerosa

DC – Doença de Crohn

DII – Doença inflamatória intestinal

EEN – Nutrição entérica exclusiva

GFD – Dieta sem glúten

GI – Gastrointestinal

GWAS – Estudos de associação do genoma completo

IECs – Células epiteliais intestinais

IFN- γ – Interferão gama

IgA – Imunoglobulina A

IL – Interleucina

IMC – Índice de massa corporal

PRRs – Recetores de reconhecimento de padrões

SCD – Dieta restritiva de carboidratos

SCFA – Ácidos gordos de cadeia curta

SNG – Sonda nasogástrica

Th – Célula T *helper*

TNF – Fator de necrose tumoral

Treg – Células T reguladoras

TRL – Recetores *Toll-like*

Resumo

A doença de Crohn (DC), uma doença inflamatória intestinal crônica, é uma patologia com prevalência crescente, que em cerca de 25% dos casos se manifesta em idade pediátrica. A fisiopatologia da doença ainda não está completamente esclarecida, mas parece resultar de uma interação de fatores externos (como a dieta ou infecções gastrointestinais), desregulação imune a nível da mucosa intestinal e fatores genéticos. Nestes doentes está descrito uma marcada alteração dos microrganismos comensais intestinais - o microbioma, desconhecendo-se, porém, se estas variações são causa ou consequência da DC.

Neste artigo de revisão procurou-se compilar e sistematizar o papel que a alimentação poderá desempenhar no microbioma e, conseqüentemente, no metabolismo intestinal e inflamação da mucosa.

Atualmente, a nutrição entérica exclusiva (EEN) é a primeira linha no tratamento de doentes pediátricos com DC, com eficácia sobreponível e até superior à terapia convencional com corticoesteróides, mas sem os seus efeitos secundários. A EEN encontra-se largamente instituída dada à eficácia empiricamente comprovada, sobretudo nos doentes com atingimento do delgado e tubo digestivo alto. No entanto, o mecanismo que leva à remissão da doença e em que doentes atinge a sua maior eficácia ainda não são claros.

Embora seja evidente a influência da EEN na modulação do microbioma, esta revisão evidenciou que a caracterização definitiva dos efeitos da EEN no microbioma cólico ainda não foi totalmente conseguida. A compreensão das suas repercussões a nível metabólico (metaboloma) poderá esclarecer quais os mediadores inflamatórios preponderantes na perpetuação da inflamação do intestino delgado, permitindo identificar terapêuticas biológicas individualizadas.

Palavras-chave: Doença de Crohn, pediatria, nutrição entérica, microbioma e dieta.

Abstract

Crohn's disease (CD), a chronic inflammatory bowel disease, is an increasingly prevalent condition, which in about 25% of cases manifests itself in the pediatric age. The pathophysiology of the disease is not yet fully understood but it's likely to result from an interaction of external factors (such as diet or gastrointestinal infections), dysregulation of intestinal mucosa immunity and genetic factors. In these patients, a marked alteration of the commensal intestinal microorganisms - the microbiome - is described, although it is unknown if these variations are causes or consequences of the CD.

In this review, we sought to compile and systematize the role that food may play in the microbiome and in the intestinal metabolism and inflammation of the mucosa.

Currently, exclusive enteral nutrition (EEN) is the first line for treatment of pediatric patients with CD, with efficacy similar or even higher than conventional corticosteroid therapy, but without its side effects. EEN is largely established because of its empirically proven efficacy, especially in patients with compromised small bowel and upper gastrointestinal tract. However, the mechanism leading to remission of the disease and in which patients it has the highest efficacy are still unclear.

Although the influence of EEN on microbial modulation is evident, this review has shown that the definitive characterization of EEN's effects on colonic microbioma has not yet been fully achieved. The understanding of its repercussions at the metabolic level (metabolome) could clarify which inflammatory mediators prevail in the perpetuation of the small intestine's inflammation, allowing individualized biological therapies' identification.

Keywords: Crohn's disease, pediatrics, enteral nutrition, microbiome and diet.

Introdução

A doença inflamatória intestinal (DII) engloba um conjunto de patologias que têm a inflamação crónica do trato gastrointestinal como característica comum, de etiologia ainda por esclarecer. Na sua patogénese parecem intervir fatores genéticos, ambientais, alterações do microbioma intestinal e fatores autoimunes. (1) Compreendem-se dentro desta entidade a doença de Crohn (DC), a colite ulcerosa (CU) e a colite não classificável, quando o quadro clínico não permite classificação específica.

A doença de Crohn é uma patologia com incidência crescente, especialmente no mundo ocidental desenvolvido, com 10 a 30 casos por cada 100.000 pessoas/ano, tendo uma prevalência de 0,5% na população em geral. (2)

Esta doença era tradicionalmente limitada ao mundo ocidental industrializado, com elevada incidência e prevalência na Europa ocidental e América do Norte. Contudo, na última década, tem sido diagnosticada mais frequentemente em países que adotaram um estilo de vida ocidental. (3) Esta tendência verifica-se tanto em adultos como em idade pediátrica, embora a causa deste aumento não esteja ainda esclarecida. (2)

A DC pode afetar qualquer parte do trato gastrointestinal (desde a boca ao ânus), de forma focal, assimétrica e transmural. A presença de granulomas não caseosos ao exame histológico da mucosa intestinal é patognomónica, mas a sua presença não é essencial para o diagnóstico. (4) A natureza transmural da DC acarreta consigo potenciais complicações como estenoses, fístulas e/ou abscessos.

Num quarto dos casos, a DC tem a sua primeira manifestação antes dos 18 anos, especialmente durante o período da puberdade. Em idade pediátrica, a DC manifesta-se mais frequentemente por dor abdominal e perda ponderal e pode conduzir a desnutrição, diminuição da velocidade de crescimento, atraso pubertário e diminuição de massa óssea. (5)

É, pois, fundamental o controlo da doença não só do ponto de vista clínico e laboratorial, mas também histológico, o que se designa por “cicatrização da mucosa”. Este desafio terapêutico, sobretudo em idade pediátrica, consiste em otimizar o tratamento com o mínimo de efeitos secundários, sem comprometer o crescimento.

Em adultos com DC, os corticosteróides (CS) são amplamente utilizados, no entanto, em idade pediátrica, esta terapêutica associa-se a efeitos secundários como atraso de crescimento estatural e a diminuição da massa óssea, particularmente nefastos nesta faixa etária, para além de não serem eficazes na prevenção de complicações a longo prazo. (6)

Como alternativa aos CS, surge então a alimentação entérica exclusiva como primeira linha no tratamento em crianças e adolescentes com DC, com eficácia sobreponível à corticoterapia, mas sem os seus efeitos secundários. (7-9)

O mecanismo de ação pelo qual induz remissão da inflamação da mucosa não é claro, não se compreendendo como e porque funciona e em que doentes será mais eficaz. (10,11)

Muitos autores defendem que esta alimentação poderá influenciar a flora intestinal, tendo a capacidade de reverter as alterações encontradas a nível dos microrganismos comensais, no entanto ainda não se conseguiu esclarecer com precisão se será efetivamente este o seu principal mecanismo de ação.

Para além desta formulação alimentar, outras dietas e restrições alimentares têm sido propostas como agentes terapêuticos ou profiláticos da DC, não tendo, no entanto, a mesma aceitação da alimentação entérica.

Com o progresso das técnicas de biologia molecular, como a sequenciação do ácido ribonucleico 16S dos ribossomas bacterianos (16S rRNA, *ribosomal ribonucleic acid*) e a sequenciação metagenómica do genoma bacteriano, os estudos que procuram compreender a DII e a sua relação com as alterações patológicas do microbioma intestinal têm vindo a

aumentar na última década. (12) Atualmente, postula-se que um determinado fator ambiental e/ou microrganismo poderá despoletar no indivíduo geneticamente suscetível uma resposta imune desadequada, originando inflamação crônica e, conseqüentemente, DII. (13)

O conhecimento dos mecanismos pelos quais estas terapêuticas regulam o microbioma será fulcral no estudo da fisiopatologia da DC e para a descoberta de terapêuticas mais individualizadas. Da contemporaneidade e relevância do tema em questão, surge a pertinência para este artigo de revisão, que visa compilar e sistematizar, através de uma revisão atualizada, as principais propostas e estudos já realizados e identificar novas linhas de investigação. Nesta revisão, depois de um sumário da fisiopatologia da DC, será descrito o microbioma intestinal humano e a sua relação com a DC. Por fim, será abordado o papel das terapêuticas nutricionais como agentes terapêuticos na DC.

Materiais e métodos

Para esta revisão foi realizada uma pesquisa bibliográfica entre maio e dezembro de 2017 com recurso à base de dados *PubMed*, *ScienceDirect* e *UpToDate*. Foram utilizados os termos de pesquisa “Crohn’s disease”, “pediatrics”, “enteral nutrition”, “microbiome” e “diet”.

Os artigos foram pesquisados até aos do ano 2012, dando-se maior importância aos mais recentemente publicados. Foram consultados os estudos randomizados, ensaios clínicos, artigos de revisão sistemática e artigos de revisão escritos em inglês, português ou espanhol, publicados em revistas ou livros de especialidade, dando maior relevância aos ensaios clínicos que testaram a segurança e eficácia das terapêuticas nutricionais na doença de Crohn em idade pediátrica, assim como aqueles que demonstravam qual a sua influência nos mecanismos fisiopatológicos da doença. Após a primeira seleção baseada no título e resumo, os artigos foram, numa segunda fase, selecionados de acordo com a qualidade do conteúdo, nomeadamente materiais e métodos, resultados e conclusões.

Doença de Crohn – a fisiopatologia

Como barreira física, o intestino possui a barreira epitelial, que engloba células epiteliais intestinais (IECs, *intestinal epithelial cells*), junções de oclusão e a camada mucosa. (14)

As IECs são responsáveis pela absorção de nutrientes e íons no intestino e pela proteção contra a invasão de microrganismos comensais, que têm o potencial de ativar recetores específicos, os recetores de reconhecimento de padrões (PRRs, *pattern recognition receptors*). (14,15) Uma sinalização diminuída das IECs origina uma síntese de proteínas pro-inflamatórias, tornando-as mais suscetíveis à apoptose, contribuindo para uma diminuição das defesas intestinais. (14)

As junções de oclusão, os desmossomas e as junções aderentes ligam as IECS nas membranas basolaterais e são responsáveis por regular a permeabilidade paracelular. Uma redução nas ocludinas (constituintes das junções de oclusão), a par da diminuição da complexidade estrutural induzida por citocinas pro-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF, *tumor necrosis factor*), contribuem para um aumento da permeabilidade do epitélio e subsequentemente compromisso da sua função. (11)

Quanto ao sistema imune da mucosa, este assume duas funções: deve proteger o hospedeiro de agentes patogénicos entéricos e ao mesmo tempo permanecer tolerante aos microrganismos comensais que sobrepõem a camada intestinal epitelial.

O sistema imune inato é composto por barreiras químicas e físicas, com várias células imunes como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e monócitos. Estas células têm uma ação conjunta como desencadeante inflamatório ao produzirem citocinas, simultaneamente à ativação do sistema imune adquirido. As células dendríticas em particular são células chave em ambos os tipos de imunidade, sendo responsáveis pela ativação de células T e pela indução da resposta imune adquirida. (15)

Toda esta superfície do intestino é protegida por uma camada de mucina, produzida por células caliciformes na camada epitelial. Para além das proteínas de mucina, a camada de muco contém também péptidos antimicrobianos e imunoglobulina A (IgA), que selecionam e limitam o acesso a este espaço, mais próximo das células epiteliais, e protegem contra agentes patogénicos. (16,17) Esta fina camada é formada por Muc2, a principal mucina secretora intestinal. Como descrito noutros tópicos deste trabalho, uma variante no gene Muc2 irá conferir suscetibilidade a DII humana, ilustrando a importância da camada de muco para a homeostase da mucosa, sendo que é possível observar uma depleção de células caliciformes e uma alteração da camada de muco na DC. (16)

Em conclusão, muitos dos componentes da barreira epitelial intestinal estão, de alguma forma, alterados na DII e a disfunção temporária da função da barreira epitelial resultará na invasão de bactérias comensais e no recrutamento e ativação de células imunes pró-inflamatórias, dando início a inflamação intestinal aguda. Contudo, a disfunção permanente da barreira, seja causada por anomalias genéticas ou estimulação comensal contínua, poderá culminar, eventualmente, em inflamação intestinal crónica.

O Microbioma intestinal

O trato gastrointestinal (GI), para além da sua função mais primária - digerir e absorver nutrientes - e das funções do epitélio e mucosa intestinal já relatadas, é desafiado com uma outra difícil e complexa tarefa, a de proporcionar uma coexistência pacífica do hospedeiro com um microbioma diversificado.

A designação “microbioma” compreende toda a comunidade microbiana intestinal, desde bactérias, microrganismos procarióticos, como *Archaea* e microeucarióticos, a fungos e vírus (principalmente bacteriófagos). Esta entidade está intrinsecamente relacionada com a evolução do hospedeiro, sendo essencial em múltiplos processos fisiológicos como o desenvolvimento da barreira epitelial, do sistema imune e na regulação de processos metabólicos. (18,19)

Como agente trófico, o microbioma destaca-se pelo contributo angiogénico do eixo das vilosidades intestinais, modulação da atividade enzimática intestinal, promoção do desenvolvimento de linfócitos epiteliais intestinais, manutenção da homeostasia do sistema imune e influência na proliferação e diferenciação das células intestinais epiteliais. Como funções metabólicas, o microbioma intervém no metabolismo energético, influenciando a extração de energia a partir da dieta e a fermentação de componentes não digeríveis, produz vitamina K e ajuda na absorção de iões. Por último, o microbioma é um importante agente protetor contra microrganismos patogénicos. (20,21)

O microbioma humano compreende, aproximadamente, 1 trilião de células bacterianas. Estima-se que seja local de 800 a 400.000 espécies de microrganismos, o que se traduz em 10^{11} microrganismos por grama de matéria fecal, compostos por mais de 1.000 espécies, a maioria dos quais anaeróbios obrigatórios. (19) A maioria das bactérias colonizadoras do microbioma humano são Gram-positivas (22) e pesam aproximadamente 1,5 kg (23), colonizando

principalmente o cólon e, em menor número, o estômago. (17)

Com o advento das técnicas de sequenciação genética como a análise sequencial de rRNA 16S e a metagenômica, tem sido demonstrado que o microbioma intestinal é mais complexo do que inicialmente pensado e é possível estudar comunidades de microrganismos não identificáveis pelos métodos tradicionais. (24)

Dos dados fornecidos pelos perfis traçados por 16S rRNA, a partir de amostras fecais de crianças saudáveis, concluiu-se que o microbioma comensal do intestino humano (Tabela 1) consistia essencialmente em dois filos *Bacteroidetes* e *Fimicutes*, com marcadas variações entre os dois filos entre indivíduos. Com uma expressão menos significativa, foram ainda encontrados os filos *Actinobacterias*, *Proteobacterias*, *Fusobacteria* e *Verrucomicrobia*. No que diz respeito aos gêneros encontrados, os *Bacteroides* representam cerca de 40% do microbioma de crianças saudáveis. *Faecalibacterium*, *Alistipes*, *Ruminococcus*, *Roseburia* e outros gêneros compõem a restante flora intestinal. (25)

Embora o cólon distal seja a porção intestinal mais estudada, com as características já descritas, é também sabido que na porção jejuno-ileal há uma maior abundância de *Actinobacteria* e *Streptococcaceae*. (16)

Esta composição da microflora intestinal é determinada por diversos fatores, como a idade, fenótipo genético do hospedeiro, sistema imune e a dieta. (26) Embora inicialmente se pensasse que o primeiro contacto que o bebé tinha com microrganismos era no processo de parto, atualmente é sabido que o feto desenvolve um microbioma pré-natal, que é modificado com o tipo de parto e com o processo de aleitamento. (27) Enquanto que recém-nascidos por cesariana apresentam um microbioma semelhante ao encontrado na pele, com *Staphylococcus spp*, os recém-nascidos por parto vaginal são colonizados com diversos gêneros bacterianos como *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Escherichia*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus*

ssp. (28) Esta mutabilidade do microbioma dos indivíduos em idade pediátrica torna-os uma população elegível para estudos de fisiopatologia de DII. (29) A relação de simbiose que se estabelece é mantida ao longo da vida, o microbioma desempenhando funções fisiológicas já relatadas, e o hospedeiro fornecendo nutrientes e um ambiente estável ao desenvolvimento dos microrganismos. (22,30)

Fatores como a dieta, a ocorrência de hospitalizações, a idade gestacional e a utilização de antibióticos são conhecidos modificadores da composição do microbioma. (28)

Tabela 1 - Microbioma intestinal comensal

BACTÉRIAS		FUNGOS	PROTOZOÁRIOS
<i>Filos</i>	<i>Géneros</i>	<i>Géneros</i>	<i>Géneros</i>
Bacteroidetes	Bacterioides	Candida	Blastocystis
Fimicutes	Faecalibacterium	Ascomycetes	
Actinobacteria	Alistipes	Basidiomycetes	
Fusobacteria	Ruminococcus	Galactomyces	
Proteobacteria	Roseburia	Paecilomyces	
Verrucomicrobia			

Adaptada a partir de (20,23,31)

A Disbiose – que papel na Doença de Crohn?

As bactérias intestinais comensais desenvolveram numerosas adaptações para poderem sobreviver num ambiente tão único, adquirindo mecanismos para poderem evitar ou modular as respostas inflamatórias do hospedeiro. Já o hospedeiro reconhece as bactérias e antígenos habituais através dos recetores *Toll-like* (TLR, *Toll-like receptors*), para que o seu sistema imune inato e adaptativo não desenvolva uma reação imune à sua presença habitual. (17)

Esta relação simbiótica que resulta da interação microbioma/hospedeiro pode, por vezes, desequilibrar-se, designando-se por disbiose. Definida como um rácio anormal, qualitativa e quantitativamente, entre espécies bacterianas benéficas e agressivas para o organismo (17), a disbiose é a característica chave das doenças inflamatórias intestinais, embora permaneça incerto se este desequilíbrio é causa ou consequência da inflamação da mucosa. (32)

Os estudos que tentaram determinar o papel do microbioma em pacientes com a doença estabelecida têm usualmente importantes limitações, uma vez que os grupos de estudo existentes são pequenos, o microbioma altera-se ao longo do tempo e há uma possível influência do tratamento em curso no microbioma intestinal dos doentes em estudo, o que não permite extrapolação dos resultados obtidos para a patogénese da doença.

Com vista à obtenção de um resultado com poder estatístico da influência do microbioma na doença e que definisse as alterações chave do microbioma, diferenciando o que é esperado numa superfície mucosa em homeostasia ou em estado de disbiose, foi realizado um estudo multicêntrico (33), o maior realizado até à data (1.742 amostras) num grupo de doentes em idade pediátrica sem nenhum tratamento prévio. Neste estudo foi analisado o perfil microbiano da mucosa a partir de uma técnica metagenómica. Confirmou-se que a inflamação da DII está fortemente associada a uma diminuição da diversidade de espécies encontradas, assim como outras alterações quantitativas da microflora.

Este estudo descreveu um aumento de *Enterobacteriaceae* (*Proteobacteria*), *Fusobacteriaceae* (*Fusobacteria*), *Pasteurellaceae* (*Proteobacteria*) e *Bifidobacteriaceae* (*Actinobacteria*). Especificamente na DC há a destacar um aumento de prevalência de *Escherichia coli* (*Proteobacteria*), *Fusobacterium nucleatum* (*Fusobacteria*), *Haemophilus parainfluenzae* (*Proteobacteria*), *Veillonella párvula* (*Firmicute*), *Eikenella corrodens* (*Proteobacteria*), e *Gemella moribillum* (*Firmicute*). (33,34) Destas, é importante destacar as *Fusobacterium* que já haviam sido previamente sugeridas como marcador de DII, e que parecem promover um microambiente favorável à progressão de carcinoma colorretal, uma das complicações a longo termo da DII. (34,35)

Numa outra perspetiva, por regiões anatómicas do trato GI, foi descrito que a DC ileal cursava com um aumento de *Fusobacteriaceae* e *Escherichia coli* aderente e invasiva (AIEC, *adherent and invasive Escherichia coli*) e com uma diminuição de *Pasteurellaceae*. No reto verificou-se uma diminuição de *Veillonellaceae*, *Faecalibacterum prausnitzii* (*Firmicute*), *Bifidobacterium*, *Roseburia* (*Firmicute*) e *Odoribacter* (*Bacteroidetes*). (34,36)

Quando se procurou estudar fatores exógenos potencialmente disbióticos, foram comparadas amostras de doentes já com tratamento instituído com antibióticos com um pequeno grupo de doentes em idade pediátrica com DC recém-diagnosticada, sem tratamento prévio. (34) Embora tenha sido descrita uma fraca influência na gravidade da doença, foi observado um marcado efeito na composição microbiana dos doentes, sendo que a exposição a antibióticos, de uma maneira geral, agravou a disbiose. Estes achados não fornecem nenhuma explicação etiológica, mas levaram à hipótese de que o uso de antibióticos tem potencial impacto na estrutura geral dos microrganismos comensais, aumentando o risco de disbiose intestinal e apoiam a evidência de que a exposição a um ou mais antibióticos no primeiro ano de vida se correlaciona com maior incidência de DII pediátrica. (37)

Porém, não só de bactérias é constituído o microbioma, e assim como estas, também os

outros domínios são afetados em condições de disbiose. Uma vez que a maioria de estudos efetuados é realizada através de sequenciação do RNA 16S dos ribossomas procarióticos, excluindo de objeto de estudo os microrganismos eucariontes, como os fungos, os dados acerca destes domínios e reinos são mais escassos. (23,35)

Quanto à alteração no perfil dos fungos encontrados na mucosa intestinal, o micoma, foram encontradas quantidades aumentadas de *Basidiomycota* e *Candida albicans* em crianças com DC, e uma diminuição de *Ascomycota* nesse mesmo grupo. (15,38) É amplamente aceite que a diversidade de fungos na mucosa intestinal é inversa à diversidade bacteriana, o que pode ser explicado pela restrição do crescimento fúngico que o microbioma bacteriano acarreta. Assim, de uma maneira geral, na DC há um aumento da diversidade fúngica nas zonas de mucosa intestinal inflamada e nas fezes.

Dados recentes indicam que também a componente viral do microbioma, designada de viroma, pode interagir com genes de risco para DII, contribuindo para o surgimento deste grupo de patologias, nomeadamente mutações na interleucina 10 (IL10) ou no gene *ATG16L1*, como abordado noutra tópico. (39) O viroma, composto maioritariamente por bacteriófagos, de entre os quais *Caudovirales* e *Microviridae* (que se encontram aumentados em doentes pediátricos com DC), infetam bactérias hospedeiras e são capazes de gerar outros vírus com potencial de infetar e matar outras bactérias. (39,40)

Também os Protozoários e helmintas, parasitas intestinais, alteram o equilíbrio entre o microbioma e hospedeiro. Os helmintas parecem desempenhar algum papel na etiopatogenia da DII, sendo inúmeros os relatos de diminuição de citocinas pró-inflamatórias relacionadas com a infestação por helmintas. Desta constatação surgiu a teoria de que estes microrganismos desempenhariam um importante papel na proteção do organismo perante estados inflamatórios, o que é corroborado pelo facto de zonas com maiores taxas de infeções por parasitas terem incidência diminuída de doenças autoimunes. (41)

i. Inflamação

Há evidência crescente que suporta a tese de que a disbiose intestinal contribui para a iniciação e patogénese da DII. Contudo, permanece incerto se essa disbiose se relaciona diretamente com a etiopatogenia ou é apenas uma alteração secundária causada pela inflamação e/ou medicação. (37)

Pensa-se que toda a patogenia da doença se iniciará na perda de integridade da barreira formada pelas células epiteliais da mucosa. (15) Uma vez criadas as alterações da barreira, estão abertas as portas de entrada para os agentes patogénicos do intestino, tornando os doentes mais suscetíveis a translocação bacteriana, despoletando a resposta inflamatória do hospedeiro.

Antígenos provenientes da flora intestinal entram em contacto com células comensais do intestino, como as células apresentadoras de antígenos (APCs, *antigen-presenting cell*) e estimulam continuamente o sistema imune, que, em contrapartida, expande a sua atividade inflamatória local. Como consequências de uma penetração anormal de bactérias comensais do intestino, através de uma quebra na barreira epitelial, há um aumento da apoptose de células do epitélio intestinal, que aliada à inflamação intestinal podem conduzir a hiperativação das células imunes da mucosa, perpetuando a resposta inflamatória. (15)

Durante muito tempo, pensou-se que a DC seria mediada por respostas T *helper* 1 (Th1), que desencadeariam a libertação de fator de necrose tumoral- α (TNF- α , *tumor necrosis factor-alpha*) e interferão- γ (IFN- γ , *interferon-gamma*), e pela infiltração tecidular de Th17. Na CU seriam os Th2 os principais mediadores da doença, em conjunto com a IL13. (15) No entanto, foram surgindo evidências, como a descoberta de quantidades semelhantes de IFN- γ em biopsias do cólon de doentes com DC ou com CU e níveis IL13 sobreponíveis nos doentes com DC, CU ou doentes controlo, sugerindo que o paradigma Th1/Th2 na DC e na CU deveria ser reconsiderado. (42)

A abundância de bactérias comensais benéficas está significativamente diminuída em doentes com DII, ao contrário de outros organismos prejudiciais que se encontram aumentados nestas mucosas. De entre estes últimos é importante destacar a *Escherichia coli*. Esta bactéria possui um grupo patogénico, a AIEC, que tem a capacidade de adesão e invasão de células epiteliais do intestino, para além de conseguir replicar-se nos macrófagos intestinais, sem que estes provoquem a sua destruição. (29,37) Adicionalmente, a AIEC coloniza o trato GI reconhecendo o antígeno carcinoembriogénico relacionado com a molécula de adesão 6 (CEACAM6, *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6*), que se encontra anormalmente expressa no epitélio ileal dos doentes com DC. O aumento de expressão de CEACAM6 potencia a expansão intracelular da AIEC, culminando numa produção massiva de citocinas pró-inflamatórias como as IL6, IL12, IL23, IL17 e TNF- α (37) e uma estimulação da formação de granulomas, contribuindo para a cronicidade da resposta inflamatória. (43)

Contudo, como já referido, ainda não há evidências claras de que a infeção devida a componentes específicos da flora intestinal seja a causadora de DII. Para que essa teoria fosse comprovada, seria necessário que, i) o microrganismo em questão, responsável pela inflamação, estivesse presente em todos os doentes, ii) a doença pudesse ser inoculada, e iii) o agente infeccioso pudesse ser isolado depois da infeção experimental. (44)

Assim, o consenso geral atual é de que, embora exista um número de microrganismos que sustentam fortemente a teoria de que são eles os desencadeantes de DII, falta ainda evidência inequívoca do papel causal do microbioma na doença. (45)

ii. Metabolismo microbiano

A associação da disbiose com DII corresponde não só a alterações na flora intestinal ou na estrutura da barreira preexistente, mas também a importantes variações em muitas funções metabólicas microbianas fundamentais, designadas como metaboloma, com potencial impacto

para o hospedeiro.

As bactérias desempenham um papel fundamental na homeostasia intestinal. São responsáveis pela fermentação de hidratos de carbono no cólon proximal, fonte de energia para as comunidades bacterianas, mas também providenciam 10% dos gastos energéticos diários do hospedeiro. (45)

A disponibilidade de carboidratos é mais limitada nas partes mais distais do cólon onde a fermentação de outros substratos, incluindo proteínas e aminoácidos, se torna predominante. (46) Os produtos da fermentação dos carboidratos, como o butirato e o propionato, induzem efeitos imunomoduladores, tolerância oral e supressão da inflamação; enquanto que os produtos da fermentação das proteínas no cólon distal, como a amónia e os fenóis, são potenciais desencadeantes de inflamação, dano de DNA e progressão para cancro colorretal. (45)

O butirato é uma fonte essencial de energia para as células epiteliais do cólon e é essencial para a manutenção da saúde da mucosa. Este produto metabólico é responsável pela indução do desenvolvimento de células T reguladoras (Treg) (47,48).

Bactérias produtoras de butirato através da metabolização de polissacarídeos provenientes da dieta e de outros derivados do hospedeiro, pertencentes ao filo *Firmicutes*, encontram-se diminuídas em doentes com DC, quando comparados a amostras de doentes controlo (37). A *Dialister invisus*, também do filo *Firmicutes*, é capaz de produzir indistintamente acetato e propionato, estando também diminuída nos doentes com DC. (37)

Não será surpreendente, portanto, que os níveis de ácidos gordos de cadeia curta (SCFAs, *short chain fatty acids*), incluindo o acetato e o propionato, se encontrem também eles alterados em doentes com DII, dada a disbiose entérica. Uma integração de resultados metagenómicos e metaproteínómicos indicou que os níveis de butirato e de SCFAs estavam diminuídos em doentes com DC (15), o que vai de encontro à diminuição conhecida de *Firmicutes* produtores

de SCFAs observados nos estudos do perfil taxonómico.

Muito recentemente foi descrito um grupo de bactérias, passíveis de ser estimuladas por uma dieta pobre em fibras, capaz de danificar a mucosa e de expandir essa sua capacidade a outras bactérias. Essa privação de fibras também foi associada a colites agressivas por agente patogénicos entéricos. (49)

iii. Genética

O estudo genético da DII tem sido um importante marco nas últimas décadas e um contributo essencial para a compreensão da patogénese da DII. (15) Estudos de associação do genoma completo (GWAS, *Genome-wide association study*), identificaram até à data mais de 160 *loci* associados à DII, 30 dos quais associados especificamente a DC, 23 à CU e 110 dos *loci* associados a ambas. (50)

Adicionalmente, existe evidência suficiente que refere um risco oito a dez vezes mais elevado para DII em familiares de doentes com CU ou DC. Em estudos efetuados em gémeos, demonstrou-se que quando uma das crianças sofre de DC, o risco do outro irmão ter a mesma patologia está aumentado vinte e seis vezes, e tem nove vezes mais probabilidade de ter CU. (15)

A maioria dos genes que conferem suscetibilidade para a DII – como o *CARD9*, *IL10*, *IL23R*, *JAK2* – estão implicados em funções da barreira mucosa, reconhecimento microbiano, defesas antimicrobianas, produção de muco, regulação imunológica ou reparação de danos da mucosa. (45) Assim, respostas antimicrobianas disfuncionais a microrganismos comensais ou o aparecimento de disbiose com efeitos sobre a mucosa, advêm, muito provavelmente, de defeitos genéticos.

Três teorias principais têm sido propostas para explicar estas respostas anómalas a alterações no microbioma intestinal: i) resposta desadequada a bactérias comensais (como o

NOD2); ii) ineficiente clearance de microrganismos (comensais/patogénicos), que conduzem a uma estimulação crónica do sistema imune (como o *ATG16L1*, *IRGM*), e iii) incapacidade de reverter a resposta inflamatória, dado o seu fenótipo pró-inflamatório (como o *ILR23/ IL12B*). (45)

De entre os inúmeros genes já descritos até à data que propiciam o desenvolvimento de DII, há a destacar alguns (Tabela 2), quer pela sua importante e comprovada relação à DC ileal, como o *NOD2/CARD15* e *ARG16L1*, quer pelo seu papel na fisiopatologia da doença como o *FUT2*.

O *NOD2/CARD15*, primeiro gene descrito de risco para CD, foi associado a um risco aumentado (até vinte vezes mais em portadores homozigóticos de *NOD2*) de desenvolver DII. (45) Em modelos murinos com mutação neste gene verificou-se uma redução significativa da clearance do agente patogénico oportunístico *Helicobacter hepaticus* (*Proteobacteria*), quando comparados com ratos *wild-type*, resultando na disrupção da homeostasia intestinal. Considera-se ainda que o *NOD2* regula negativamente a ativação excessiva de TRLs, ao induzir uma resposta imune apropriada de baixa intensidade. Pelo contrário, variantes de *NOD2* mutadas resultariam em hiperativação de respostas imunes. (45)

Outro polimorfismo que confere suscetibilidade aumentada para a DC é o gene autofágico *ATG16L1*. Defeitos na autofagia têm sido ligados a células de Paneth disfuncionais, tanto em ratos como em humanos. Estas células com funções secretoras de peptídeos antimicrobianos, que permitem a regulação das bactérias luminais, quando disfuncionais resultam num incremento na sinalização de peroxissomas e metabolismo dos lípidos, promovendo inflamação. (45)

Também relacionadas com anomalias nas células de Paneth, localizadas principalmente no íleo, estão as variações no genótipo da *FUT2*, que parecem ter influência na diversidade da

comunidade microbiana intestinal. O gene *FUT2* é responsável pela presença do sistema antigénico ABO nos fluidos corporais, assim como na mucosa gastrointestinal e a sua haploinsuficiência está ligada a suscetibilidade a infeções e doenças, incluindo DC. (14)

Contudo, uma evidência crescente sugere que os fatores genéticos identificados contribuem apenas parcialmente para explicar os diferentes fenótipos da doença. Este facto sugere que fatores epigenéticos, que se assumem como mediadores entre genoma e fatores ambientais, possam assumir um papel significativo na patogénese da DII e influenciar o seu desenvolvimento e progressão. Em muitos doentes com DIII existe hipermetilação em vários genes, como o *CDH1*, *p16* e *MDR1*. (15) Um estudo completo do epigenoma associado à metilação num doente com DII identificou cinquenta e um genes com metilação diferente quando comparados com indivíduos controlo. (51)

Esta hipermetilação está também interligada com o butirato, que é um inibidor da desacetilação das histonas, participando na manutenção da função da barreira da mucosa intestinal e no processo homeostático de redução de produção de IL8 pelas células epiteliais. Para além do butirato poder aumentar a expressão do *NOD2* pela promoção da acetilação das histonas, também o TLR4, um regulador da homeostasia intestinal, parece ser regulado pela desacetilação das histonas. Todos esses achados têm sugerido que a associação entre a acetilação das histonas e a inflamação pode proporcionar um novo alvo terapêutico na DII. (15)

Em conclusão, todos os estudos até ao momento apontam para que a perda substancial de diversidade do microbioma seja o fator predominante na patogénese da DII. Esta redução assenta, essencialmente, na disbiose. A sua relação com a genética requer ainda mais investigação.

Tabela 2 – Genes mutados na DII e associações clínicas

Gene	Alterações associadas à DII	Tradução clínica da mutação	Polimorfismo associado a:
<i>NOD2/CARD15</i>	Anomalias no reconhecimento patogénico	Mutação com maior relação com DC complicada: localização ileal, estenosante e penetrante.	DC
<i>ATG16L1</i>	Anomalia na autofagia	DC estenosante	DC e CU
<i>FUT2</i>	Anomalia na secreção de antígenos ABO e alterações no microbioma entérico		DC
<i>IRGM</i>	Anomalia na autofagia		DC e CU
<i>ILR23/ IL12B</i>	Anomalia na ativação de células T (também associada a condições autoimunes como psoríase e espondilite anquilosante)	DC fistulizante	DC
<i>PTPN22</i>	Anomalia na autofagia nas células epiteliais do intestino		DC E CU
<i>JAK2</i>	Anomalia na ativação de células T (também associada a condições autoimunes como psoríase e espondilite anquilosante)	DC estenosante	
<i>NLRP3</i>	Desregulação da síntese de IL-1 β		DC
<i>ICOSLG</i>	Anomalia na ativação de células T		DC
<i>CCR6</i>	Alterações na migração e ativação leucocitária		DC

DC - Doença de Crohn; CU - Colite ulcerosa; IL – Interleucina
Adaptada de (35,53,69)

Dieta como agente terapêutico na DII

A crescente prevalência da DII verificada em todo o mundo e o ritmo desta variação epidemiológica é de tal forma rápido que dificilmente resultará em exclusivo de alterações genéticas, apontando para um efeito ambiental no risco de doença.

Deste modo, uma grande variedade de fatores ambientais e comportamentais tem sido associada à patogénese da DII, incluindo dieta, tabagismo, stresse, padrões de sono, higiene e uso de antibióticos. (53)

Formula-se a hipótese de que a dieta possa ter um grande impacto na saúde humana, seja por afetar o hospedeiro diretamente ou através do microbioma. A comunidade microbiana no intestino é um sistema complexo e dinâmico que pode ser perturbado por muitos fatores ambientais, incluindo dieta, estilo de vida ou fármacos.

Como resposta a modificações na dieta, ocorrem alterações na composição do microbioma intestinal. Especialmente durante os eventos do início da vida, como o desmame e a introdução de alimentos sólidos, a dinâmica da colonização é criticamente modulada. (50)

Existe um grande interesse na associação entre dieta, microbioma intestinal e DII, uma vez que a dieta desempenha um importante papel nas funções do microbioma intestinal e na atividade imune do organismo, o que acaba por modificar a estrutura da comunidade microbiana entérica e influenciar a sua função. Por esta razão, tanto a dieta como o microbioma são considerados como possíveis alvos para intervenção terapêutica na DII. (54) Uma vez que a dieta é a principal componente modificável pelos doentes, estes procuram saber o que devem comer para poderem melhorar a sua condição, mas, habitualmente, enfrentam um processo frustrante de tentativa e erro na identificação de alimentos que desencadeiem ou reduzam os sintomas. (55)

Embora a dieta venha sendo considerada um fator chave na patogénese da DII, os dados publicados até à data não conseguem estabelecer uma associação entre a ingesta de alimentos

específicos e a ocorrência de DC e/ou CU. (52) Estudos de migrantes evidenciaram que aqueles que contactaram com sociedades ocidentais e a sua alimentação - rica em gorduras e proteínas e pobre em vegetais e fruta - tinham maior risco de desenvolver DII quando regressavam aos países de origem. Estes achados apoiam a importância dos fatores de risco ambientais no desenvolvimento da doença. (54)

Componentes dietéticos como ácidos gordos ómega-6, ácidos gordos de cadeia longa, proteínas e carboidratos digeríveis, podem contribuir para a patogénese da DII através da diminuição da diversidade do microbioma intestinal, do aumento de agentes patogénicos oportunistas, do aumento da permeabilidade intestinal e da promoção da inflamação, resultando numa diminuição da frequência de bactérias protetoras de barreira intestinal específicas. Por outro lado, os ácidos gordos ómega-3, os triglicédeos em cadeia e os carboidratos não digeríveis demonstraram uma melhoria desses parâmetros e da saúde intestinal. (50,56)

Em suma, a dieta desempenha um papel fundamental na patogénese da DII, e existe a hipótese de que a interação entre a dieta e o microbioma em pessoas geneticamente suscetíveis contribua significativamente para o início da doença. (33)

i. Nutrição entérica exclusiva

Recentemente, tem havido um crescente interesse nas terapias nutricionais, incluindo suplementos como probióticos, pré-bióticos e simbióticos, dietas pobres em carboidratos, ácidos gordos polinsaturados ómega-3 e a dieta entérica exclusiva.

A nutrição entérica exclusiva (EEN, *exclusive enteral nutrition*) tem sido amplamente utilizada como terapia de indução e manutenção na abordagem da DC pediátrica. (57) Em casos de doença ativa ligeira a moderada não complicada existe evidência robusta de eficácia (58), sem necessidade de recorrer a tratamentos farmacológicos associados. (59)

A EEN refere-se à administração de fórmulas líquidas especializadas que podem ser

poliméricas, semi-elementares ou elementares como única fonte de nutrição. (52) As fórmulas elementares são constituídas exclusivamente por aminoácidos. Esta dieta elementar tem baixa palatibilidade e muitas vezes requer a sua administração através de sonda nasogástrica (SNG). As fórmulas semi-elementares contêm péptidos, açúcares simples (polímeros de glicose ou amido) e gordura, principalmente triglicerídeos de cadeia média. Mesmo estas são mal aceites por mais de metade dos doentes. As fórmulas poliméricas contêm proteínas intactas, carboidratos complexos - sem lactose ou glúten - e gorduras, tornando-se mais agradáveis e não requerem administração por SNG. (54,57) Para além dessas vantagens, que já por si aumentam a adesão dos doentes ao tratamento, esta fórmula tem menor custo monetário. (60) A eficácia parece não se relacionar com a constituição da dieta entérica, não tendo ficado demonstradas diferenças entre EEN elementar ou polimérica. (11,54,55)

Existem ainda diferenças na duração do tratamento com EEN (4 a 6 semanas *versus* 6 a 8 semanas) e no método de administração. As práticas atuais que visam a indução de remissão em DC pediátrica utilizam uma formulação polimérica ou elementar por um período de 6 a 8 semanas, administradas via oral ou através de SNG. De entre estas alternativas, a fórmula polimérica é, largamente, a mais utilizada (90%) pelas razões já referidas. Porém, a fórmula utilizada é escolhida também pela experiência do médico, pela disponibilidade económica e das fórmulas. As diferenças entre métodos através do qual a alimentação é administrada ao doente, oral ou por SNG não mostrou diferenças significativas, com 75% de remissões em doentes alimentados oralmente contra 85% naqueles que foram alimentados através de SNG. (54)

Durante este período de EEN são permitidas pequenas quantidades de água. No final do período de 6 a 8 semanas, a alimentação normal é introduzida gradualmente. (60) Num inquérito realizado a unidades de tratamento, 52% delas prefere reintroduzir a alimentação com alimentos com o mais baixo teor em fibras possível enquanto se diminui a quantidade de fórmula. Outros centros preferem introduzir uma refeição completa apenas a cada 3 a 4 dias. (61)

Metanálises comparativas do efeito da EEN com outras terapêuticas da DC, em populações pediátricas, demonstraram que EEN tem uma eficácia sobreponível aos CS (62-64), provavelmente será superior na indução de cicatrização da mucosa, levará ao aumento de peso, aumento dos níveis de vitamina D e melhoria da qualidade de vida. (55) Há ainda a possibilidade de que induções de remissão pela EEN possam ser mais duradoras do que as obtidas com CS, mas este resultado apenas foi demonstrado por um dos estudos. (64) A EEN torna-se, assim, o tratamento de primeira linha em doentes pediátricos com DC. (52)

Os objetivos da terapia em DC pediátrico eram, tradicionalmente o alívio dos sintomas, otimização do crescimento e melhoria da qualidade de vida, minimizando a toxicidade da terapêutica. Porém, a noção de que alcançar a cicatrização da mucosa pode potencialmente mudar a história natural da doença e diminuir a necessidade de cirurgia, colocou a remissão histológica no centro dos objetivos terapêuticos.

Um estudo que procurava identificar a consistência da cicatrização da mucosa no final do tratamento com EEN, observou que 26 dos 37 pacientes do grupo tratados com EEN atingiu a cicatrização da mucosa, quando apenas 4 dos 10 no grupo de CS alcançou resultados igualmente satisfatórios. (65) O mesmo resultado foi encontrado noutro estudo em que 14 de 19 dos doentes induzidos com EEN obtiveram cicatrização mucosa, enquanto que apenas 6 dos 18 pacientes tratados com CS alcançaram o mesmo resultado. (64) Em geral, os pacientes que receberam EEN foram 4,5 vezes mais propensos a demonstrar cicatrização da mucosa em comparação com aqueles que receberam CS. (64)

Recomendações recentes da *European Crohn's and Colitis Organisation* (ECCO) e na *European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition* (ESPGHAN) acerca da orientação médica da DC pediátrica, demonstraram taxas de remissão até 85%, com cicatrização mucosa em 19% a 75% dos pacientes. (52) A eficácia da EEN parece ser maior

para DC do íleo ou íleo-cólicas, ao contrário de em colite pura. (55) Foi também demonstrada que a EEN não é útil em doentes com CU. (66)

Adicionalmente, outro estudo prospetivo analisou a resposta de 114 crianças tratadas com EEN durante 8 semanas (51,2% alimentadas oralmente e 48,8% por SNG). Alcançaram a remissão clínica 80% das crianças, com reduções significativas na velocidade de sedimentação e nos níveis de proteína C reativa. Aqueles que alcançaram a remissão obtiveram também uma melhoria significativa do peso e do índice de massa corporal (IMC). (60)

Já a terapia de manutenção após a indução de remissão bem-sucedida com a EEN não é consensual. Há evidências crescentes de que a nutrição parcial entérica (fornecendo 30 a 50% das necessidades calóricas do paciente) parece ter eficácia na prevenção da recidiva, mas muitos dos estudos realizados envolviam o uso da alimentação nasogástrica, geralmente com auto-intubação, o que traz problemas logísticos consideráveis. (55)

No entanto, apesar da eficácia clínica estar bem definida, o mecanismo de ação pelo qual induz remissão da inflamação da mucosa não é ainda claro. Embora a EEN tenha efeitos consideráveis sobre a estrutura e a atividade metabólica do microbioma intestinal em pacientes pediátricos, (67) estas mudanças não são suficientes para explicar a eficácia verificada. (55) Por exemplo, os aspetos potencialmente adversos da disbiose associada à DC - como a redução da diversidade bacteriana e da abundância relativa de *Faecalibacterium prausnitzii* - são exacerbados em vez de corrigidos. (67)

Do que já é conhecido até à data, a EEN tem significativos efeitos anti-inflamatórios (local e sistemicamente) e de restauro da barreira epitelial. (52) Esta terapêutica mostrou alterar a produção de SCFA (68) e, em particular, um aumento do butirato. (62) Para além desta alteração lipídica que se revela anti-inflamatória, estas fórmulas reduziram ainda a carga alérgica. (66) Recentemente, postulou-se que a EEN possa influenciar a resposta imune aos

microrganismos intestinais e atuar especificamente no microbioma intestinal, corrigindo a disbiose. (66,69,70) Um outro estudo revelou que, após as 6 semanas de EEN, o padrão inicialmente pro-inflamatório resultante dos SCFA estava normalizado, observando-se remissão clínica. (68) O efeito positivo foi observado apenas em crianças com DC ativa no intestino delgado e/ou no cólon, enquanto não foram detetadas mudanças naqueles com DC perianal ativa. (68)

Os estudos que investigam o impacto da terapia EEN no microbioma são limitados. Desde que a EEN é usada de forma mais consistente no tratamento da DC pediátrica, a maioria dos estudos existentes foi realizada em crianças, e geralmente, as amostras são de tamanho reduzido. (58) Interpretar mudanças detalhadas de microbioma em diferentes estudos também é complicado pela heterogeneidade de coortes de estudo, alta variação interindividual, diferenças no local da amostra (ou seja, fezes *versus* biópsia mucosa) e diferenças metodológicas como o tipo e a exclusividade da fórmula.

Dos estudos efetuados, os mais robustos encontraram mudanças benéficas no microbioma durante e depois de EEN. (69,70) (Tabela 3). Adicionalmente, outro estudo demonstrou que o perfil do microbioma era significativamente diferente em pacientes com remissão induzida por EEN *versus* pacientes com remissão induzida por esteroides. (71)

Em 2015, *Kaakoush et al* (62) descreveram uma significativa diminuição do número de seis famílias dentro dos *Firmicutes* ao iniciar EEN, o que correspondia a uma remissão da DC. A recidiva da DC foi associada a um aumento destas unidades.

Esta redução com EEN pode ser uma consequência do menor consumo de fungos nos alimentos, ou devido a uma mudança no ambiente microbiano no intestino com EEN, paralelamente à mudança ocorrida nas bactérias. A importância destes achados para a patogênese é ainda desconhecida, embora observemos que os anticorpos anti-*Saccharomyces*

são usados como biomarcadores na DII.(11)

Como questões finais colocam-se se esta dieta necessita realmente de ser exclusiva e se é o conteúdo da fórmula em si que é benéfico, ou se é a não-exposição à dieta normal que leva à remissão da doença ativa.

Tabela 3 – Efeitos da EEN no microbioma

Referência	Amostragem	Tipo de Amostra	Método de sequenciação	Achados major associados a EEN
Gerasimidis et al. (2014)	15 DC 21 C	Fecais	qPCR 16S rRNA	Diminuição da diversidade e <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> diminuída
Kaakoush et al. (2015)	5 DC 5 C	Fecais	16S rRNA e sequenciação metagenómica NGS	Diminuição da diversidade: 6 famílias de <i>Firmicutes</i> (<i>Erysipelotrichaceae</i> , <i>Ruminococcaceae</i> , <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Streptococcaceae</i> , <i>Veillonellaceae</i> e <i>Peptostreptococcaceae</i>)
Quince et al. (2015)	23 DC 21 C	Fecais	16S rRNA, e Sequenciação metagenómica NGS	Diminuição da diversidade (principalmente <i>Bifidobacterium</i> , <i>Ruminococcus</i> e <i>Faecalibacterium</i>) e aumento de <i>Lactococcus</i>
Lewis et al. (2015)	22 DC	Fecais	Sequenciação metagenómica NGS	Diminuição de <i>Dialister</i> , <i>Dorea</i> , <i>Gordonibacter</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Streptococcus</i> . Aumento de <i>Alistipes</i>
Schwerd et al. (2016)	8 DC	Fecais	16S rRNA, e Sequenciação metagenómica NGS	Diminuição da abundância do filo <i>Bacteroidetes</i> ; aumento da abundância do filo <i>Firmicutes</i> .
Dunn et al. (2016)	10 DC 5 C	Fecais	16s rRNA, NGS	Em pacientes que alcançaram remissão após EEN, houve redução da diversidade <i>Bacteroides</i> (incluindo <i>B. fragilis</i> e <i>B. ovatus</i>) e <i>Ruminococcaceae</i> . Em pacientes que não conseguiram atingir/manter remissão, a EEN aumentou a diversidade de organismos, sendo associado a <i>Bacteroides</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> e <i>Prevotella</i>

DC - doença de Crohn; C - controlos saudáveis; NGS - next generation sequencing; PCR - polymerase chain reaction; 16S rRNA – Ácido ribonucleico ribossomal 16S; EEN - nutrição entérica exclusiva. Adaptada de (58)

ii. Proteínas

A ingestão aumentada de proteína animal foi associada ao risco de DII. Os estudos epidemiológicos demonstraram que uma dieta rica em proteína animal está associada a um risco significativamente mais elevado de desenvolver DC. Em particular, um alto consumo de carne e de peixe, mas não de ovos ou produtos lácteos, foi associado ao risco de desenvolver a doença. (69) No entanto, o consumo de proteínas animais geralmente está associado ao consumo de gordura animal, por isso não está claro se este componente pode ser adequadamente avaliado de um modo isolado, ou se se deverá ao efeito das gorduras no organismo, como explicado de seguida.

iii. Gorduras

Em geral, a literatura existente sugere que dietas com alto teor de gordura estão associadas a um maior risco de DII. Vários estudos incluídos na revisão sistemática demonstraram um risco aumentado de DC associada a elevada ingestão de gordura total, principalmente a ingestão total de ácidos gordos saturados e um aumento do rácio ómega-6/ómega-3. (10) No entanto, o benefício clínico do ómega 3 como anti-inflamatório é controverso e não foi encontrada evidência da sua eficácia. (72)

De todos os componentes da dieta humana, as gorduras são as mais associadas ao agravamento dos sintomas na DII. (50)

iv. Hidratos de Carbono

A ingestão de carboidratos foi estudada em pacientes com DC, traduzindo-se numa demonstração consistente de que uma elevada ingestão de monossacarídeos e dissacarídeos foi associada com maior risco de DC. (10,59)

A DII está associada a níveis mais baixos de bactérias produtoras de butirato, como os *Firmicutes*, uma vez que a sua a degradação é inversamente proporcional à abundância de

destes microrganismos na DC ativa. (50) Baixos níveis de butirato provenientes da dieta poderiam estar envolvidos na iniciação/perpetuação da inflamação da DC. (52)

v. Fibras

As fibras podem ser divididas em dois grupos: fermentável e não fermentável. As fibras fermentáveis são fermentadas pela flora no intestino e os SCFAs são produzidos como produto final, um metabolito anti-inflamatório que reduz a permeabilidade intestinal. As fibras da dieta provêm da parte indigestível dos alimentos vegetais e contribuem substancialmente para as concentrações fecais de SCFA (*Short-chain fatty acids*), nomeadamente ácido acético, ácido propiónico e ácido butírico. (50)

Em estudos que investigaram o efeito de um elevado consumo de fruta, houve um risco diminuído de DC. Doentes que consumiram fruta mais do que uma vez por dia, comparados com aqueles que consumiram menos do que essa quantidade, demonstraram diferenças estatisticamente significativas. Um alto consumo de vegetais foi também associado a um risco diminuído de DC, mas não foram encontradas diferenças estatísticas significativas. (10) O principal problema prende-se com o facto dos doentes reduzirem o consumo de fibras após a primeira remissão. (59)

Há ainda evidências epidemiológicas a partir de estudos observacionais que indicam que o aporte apropriado de alimentos ricos em fibras podem ajudar a proteger contra a DII. (60)

vi. Vitamina D

A vitamina D é abundantemente expressa nas células intestinais e em todas as células imunes, havendo vários estudos que implicam a deficiência de vitamina D, ou subregulação da vitamina, na patogénese e gravidade da DII. É reconhecido a ação da vitamina D na manutenção da integridade epitelial e ao seu efeito na composição do microbioma intestinal. (50) No entanto, embora o défice de vitamina D tenha sido implicado como causa de inflamação na DC, desconhecem-se ainda quais os níveis ideais. (55)

As formas bioativas da vitamina D são também conhecidas por aumentar de forma robusta a expressão de alguns genes de suscetibilidade associados a DC (por exemplo, *NOD2*), sugerindo que a sua atividade imunomoduladora seja muito vasta e de natureza heterogênea. (50)

vii. Dietas de exclusão

A dieta de exclusão mais estudada, e mais antiga, a dieta restritiva de carboidratos (SCD, *specific carbohydrate diet*) foi sugerida pela primeira vez pelo Dr. Sidney Haas em 1924 como um método para tratar a doença celíaca. A teoria subjacente da SCD é que os carboidratos de di- e polissacarídeos são mal absorvidos no trato GI humano, resultando num crescimento excessivo de bactérias e leveduras e subsequente sobreprodução de muco. Estes efeitos podem resultar em lesão do intestino delgado, perpetuando o ciclo de má absorção de carboidratos e lesão intestinal. (73) Esta dieta restringe os carboidratos complexos (di- e polissacarídeos) e elimina açúcares refinados para conseguir corrigir o desequilíbrio causado pela utilização destes hidratos de carbono pelas bactérias e leveduras. (57)

Um estudo retrospectivo avaliou 26 crianças em regime de SCD parcial: 20 com DC e 6 com CU. (74) A duração da terapia dietética variou de 3 a 48 meses e foi associada a outros fármacos, selecionados individualmente para cada doente. Em pacientes com DC ativa, tanto o índice de atividade de DC pediátrico, quanto o índice pediátrico de atividade da CU diminuíram. Este estudo fornece evidências de que o SCD pode melhorar os sintomas clínicos em pacientes pediátricos com CD, bem como CU. Serão necessários mais estudos para corroborar a eficácia da SCD, atendendo ao viés apresentados nestes estudos (uso concomitante de fármacos).

Sigall-Boneh et al (75) desenvolveram uma outra dieta de exclusão especial, a dieta sem glúten (GFD, *gluten free diet*), eliminando componentes potencialmente influenciadores do microbioma ou da permeabilidade intestinal (glúten, produtos lácteos, gorduras animais, carnes

processadas, produtos que contenham emulsionantes, produtos enlatados e todos os produtos embalados com prazo de validade). Frutas e vegetais frescos são permitidos nesta dieta, bem como algumas leguminosas (lentilhas, ervilhas) porém outras, como o grão-de-bico e a soja, não o são. Crianças e jovens adultos com DC ativo receberam esta dieta e até 50% de calorias alimentares a partir de uma fórmula polimérica para indução de remissão. Após 6 semanas, a resposta e a remissão foram obtidas em 78,7% e 70,2% dos pacientes, respectivamente. Esses resultados precisam ser confirmados em ensaios mais alargados, incluindo análises do microbioma e randomizando doentes com e sem suplemento de fórmula polimérica.

Discussão e Conclusão

A DC é uma DII com uma patologia complexa e heterogénea, que em 25% dos casos tem a sua primeira manifestação antes dos 18 anos, especialmente durante a puberdade. Esta elevada prevalência da DC assume uma especial importância no controlo eficaz da doença, uma vez que conduz a uma diminuição da velocidade de crescimento, atraso pubertário, diminuição de massa óssea e perda ponderal. (5)

O conhecimento da etiopatogenia da DC beneficiou de vários e importantes avanços nas últimas décadas, mas a sua etiologia mantém-se desconhecida, embora se reconheça uma grande variedade de fatores desencadeantes envolvidos (genéticos, imunológicos, dietéticos e o microbioma). A caracterização e a interação de cada um dos fatores poderá levar à descoberta de novos alvos terapêuticos.

É expectável que uma associação de suscetibilidade genética individual, fatores ambientais, microbioma intestinal e uma componente autoimune façam parte da fisiopatologia da DII. (1) Em doentes com DC, foi descrita uma disbiose com diminuição das bactérias protetoras e de helmintas um aumento de certas bactérias patogénicas, vírus (essencialmente bacteriófagos) e fungos. Em resumo, no que diz respeito ao microbioma bacteriano, é descrito um aumento do filo *Proteobacteria* e uma diminuição de *Firmicutes* na DC.

Tradicionalmente, os objetivos da terapia focam-se no alívio de sintomas, otimização do crescimento e em melhorar a qualidade de vida dos doentes, minimizando os efeitos colaterais dos fármacos. Como alternativa à terapia convencional com CS, surge a alimentação entérica polimérica, que se configura como a primeira linha no tratamento em crianças e adolescentes com DC do íleo, com eficácia sobreponível à corticoterapia, mas sem os seus efeitos secundários como o atraso de crescimento, de desenvolvimento e redução da massa óssea - efeitos particularmente nefastos em doentes em idade pediátrica. (7-9)

Embora esta terapêutica se encontre largamente instituída dada à sua eficácia empiricamente comprovada, o mecanismo pelo qual é conseguida a remissão da inflamação da mucosa está longe de ser claro. Existem efeitos anti-inflamatórios diretos no epitélio intestinal, moldando favoravelmente o rácio entre citocinas pró- e anti-inflamatórias e modificando o microbioma intestinal, mas ainda não é claro porque funciona e em que doentes atinge a sua maior eficácia. (10,11)

Quanto às dietas já propostas, aquela que, indubitavelmente, se mostra mais eficaz é a EEN. Todas as outras carecem de rigor em predizer alimentos proibidos e permitidos, e será difícil saber, com certeza, qual a exatidão com que o doente seguiu essa dieta na sua vida fora do hospital.

Apesar dos resultados díspares, é já conhecido o efeito nocivo das gorduras e carboidratos para o intestino e a proteção contra estados inflamatórios conferida pelas fibras.

A identificação de componentes alimentares com um componente anti-inflamatório poderá ajudar no controlo da DII e servir como conceito base de indução de remissões noutras doenças imunomediadas. Tendo em conta que cada doente terá uma resposta imunológica e do microbioma diferente aos mesmos componentes alimentares, abordagens dietéticas individuais serão essenciais para otimizar a terapêutica. Será difícil, porém, determinar que alimentos ingeridos pelos doentes terão mais relação com a inflamação intestinal, porque para além da variabilidade genética e do microbioma interindividuais, há grande variedade de macro e micronutrientes ingeridos pelos doentes ao longo do dia. Estes fatores de confusão acabam por se repercutir nas deduções feitas nos vários estudos que tentam identificar alimentos específicos benéficos ou de risco. No sentido de eliminar estes fatores confusionais, é impreterível uniformizar os métodos utilizados e estratificar as amostras em grupos homogêneos (quanto às suas características biológicas e quanto às suas exposições ambientais).

Relativamente aos efeitos da EEN sobre o microbioma, atendendo aos estudos analisados, não foi possível concluir se a disbiose é um fator causal ou se será uma mera consequência da inflamação na DII. Os dados conhecidos até agora apontam para que a resposta imunológica local desregulada face ao microbioma intestinal seja um mecanismo crucial envolvido na patogénese da DII. Esse fator, somado aos numerosos *loci* de suscetibilidade genética identificados, favorecem a inflamação intestinal crónica. No entanto, serão necessários estudos com vista a uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares e celulares envolvidos para que seja possível desenvolver futuras abordagens terapêuticas que permitam ultrapassar as limitações atuais como a inexistência de remissão a longo prazo.

As futuras linhas de investigação deverão procurar identificar em que medida a EEN modula realmente o microbioma e o metaboloma.

A constatação de que a dieta entérica exclusiva é muito mais eficaz nos doentes com atingimento do tubo digestivo alto e intestino delgado e menos eficaz quando a doença é exclusivamente cólica, leva-nos a especular sobre a existência de diferentes vias inflamatórias alteradas segundo o fenótipo da doença. A caracterização definitiva dos efeitos da EEN no microbioma cólico, nomeadamente a nível metabólico (metaboloma) poderá permitir esclarecer quais os mediadores inflamatórios preponderantes na perpetuação da inflamação do intestino delgado, permitindo identificar terapêuticas biológicas individualizadas.

Como questões finais, colocam-se se esta dieta necessita realmente de ser exclusiva e se é o conteúdo da fórmula em si que é benéfico, ou se é a não-exposição à dieta normal que leva à remissão da doença ativa.

Agradecimentos

À Doutora Susana Almeida pela disponibilidade manifestada durante a realização deste trabalho e por me incentivar a fazer sempre algo melhor. A leitura, sugestões e correções que fez a versões provisórias deste trabalho foram essenciais para o seu resultado final.

Agradeço também à minha coorientadora, Professora Doutora Guiomar Oliveira, por me aceitar como orientando, pelas suas correções e sugestões.

À minha família, em especial aos meus pais a quem devo muito e sempre me apoiaram. Aos meus amigos por toda a ajuda e apoio incondicional.

Lista de referências bibliográficas

1. Zhang YZ, Li YY. Inflammatory bowel disease: Pathogenesis. *World J Gastroenterol*. 2014;20(1):91–9.
2. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. 2012;142(1):46–54.e42.
3. Chan D, Kumar D, Mendall M. What is known about the mechanisms of dietary influences in Crohn’s disease. 2015;31(10):1195–203.
4. Conrad MA, Rosh JR. Pediatric Inflammatory Bowel Disease. *Pediatr Clin North Am*. 2017;64(3):577–91.
5. Corica D, Romano C. Biological Therapy in Pediatric Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review. *J Clin Gastroenterol*. 2016;51(2):100–10.
6. Ó Cuív P, Begun J, Keely S, Lewindon PJ, Morrison M. Towards an integrated understanding of the therapeutic utility of exclusive enteral nutrition in the treatment of Crohn’s disease. 2016;7(4):1741–51.
7. Soo J, Malik BA, Turner JM, Persad R, Wine E, Siminoski K, et al. Use of exclusive enteral nutrition is just as effective as corticosteroids in newly diagnosed pediatric Crohn’s disease. *Dig Dis Sci*. 2013;58(12):3584–91.
8. Day AS, Lopez RN. Exclusive enteral nutrition in children with crohn’s disease. *World J Gastroenterol*. 2015;21(22):6809–16.
9. Navas-López VM, Blasco-Alonso J, Lacasa Maseri S, Girón Fernández-Crehuet F, Serrano Nieto MJ, Vicioso Recio MI, et al. Exclusive enteral nutrition continues to be first line therapy for pediatric Crohn’s disease in the era of biologics. *An Pediatría (English Ed)* . 2015;83(1):47–54.
10. Shivashankar R, Lewis JD. The Role of Diet in Inflammatory Bowel Disease. *Curr*

- Gastroenterol Rep. 2017;19(5):1–7.
11. Lewis JD, Chen EZ, Baldassano RN, Otley AR, Griffiths AM, Lee D, et al. Inflammation, Antibiotics, and Diet as Environmental Stressors of the Gut Microbiome in Pediatric Crohn’s Disease. *Cell Host Microbe*. 2015;18(4):489–500.
 12. Hold GL, Smith M, Grange C, Watt ER, El-Omar EM, Mukhopadhy I. Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: What have we learnt in the past 10 years? *World J Gastroenterol*. 2014;20(5):1192–210.
 13. Lee D, Albenberg L, Compher C, Baldassano R, Piccoli D, Lewis JD, et al. Diet in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2015;148(6):1087–106.
 14. Basso PJ, Fonseca MTC, Bonfá G, Alves VBF, Sales-Campos H, Nardini V, et al. Association among genetic predisposition, gut microbiota, and host immune response in the etiopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Brazilian J Med Biol Res*. 2014;47(9):727–37.
 15. Zhou M, He J, Shen Y, Zhang C, Wang J, Chen Y. New Frontiers in Genetics, Gut Microbiota, and Immunity: A Rosetta Stone for the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Biomed Res Int*. 2017;2017:1–17.
 16. Jeffery IB, O’Toole PW. Diet-microbiota interactions and their implications for healthy living. *Nutrients*. 2013;5(1):234–52.
 17. Comito D, Cascio A, Romano C. Microbiota biodiversity in inflammatory bowel disease. *Ital J Pediatr*. 2014;40(1):32.
 18. Kamada N, Chen GY, Inohara N, Núñez G. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat Immunol*. 2013;14(7):685–90.
 19. Wu GD, Bushmanc FD, Lewis JD. Diet, the human gut microbiota, and IBD. *Anaerobe*. 2013;24:117–20.

20. Yu CG, Huang Q. Recent progress on the role of gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *J Dig Dis.* 2013;14(10):513–7.
21. Morgan X, Tickle T, Sokol H, Gevers D, Devaney K, Ward D. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol.* 2012;13(R79).
22. Martín R, Miquel S, Ulmer J, Kechaou N, Langella P, Bermúdez-Humarán LG. Role of commensal and probiotic bacteria in human health: a focus on inflammatory bowel disease. *Microb Cell Fact.* 2013;12(1):71.
23. Cammarota G, Ianiro G, Cianci R, Bibbò S, Gasbarrini A, Currò D. The involvement of gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: Potential for therapy. *Pharmacol Ther.* 2015;149:191–212.
24. Wang WL, Xu SY, Ren ZG, Tao L, Jiang JW, Zheng S Sen. Application of metagenomics in the human gut microbiome. *World J Gastroenterol.* 2015;21(3):803–14.
25. Hollister EB, Riehle K, Luna RA, Weidler EM, Rubio-Gonzales M, Mistretta T-A, et al. Structure and function of the healthy pre-adolescent pediatric gut microbiome. *Microbiome.* 2015;3(1):36.
26. O’Toole A, Korzenik J. Environmental Triggers for IBD. *Curr Gastroenterol Rep.* 2014;16(7).
27. Funkhouser LJ, Bordenstein SR. Mom Knows Best: The Universality of Maternal Microbial Transmission. *PLoS Biol.* 2013;11(8):1–10.
28. Johnson CL, Versalovic J. The Human Microbiome and Its Potential Importance to Pediatrics. *Pediatrics.* 2012;129(5):950–60.
29. Scribano ML, Prantera C. Antibiotics and inflammatory bowel diseases. *Dig Dis.* 2013;31(3–4):379–84.

30. Chen WX, Ren LH, Shi RH. Enteric microbiota leads to new therapeutic strategies for ulcerative colitis. *World J Gastroenterol.* 2014;20(42):15657–63.
31. Neuman MG, Nanau RM. Inflammatory bowel disease: Role of diet, microbiota, life style. *Transl Res.* 2012;160(1):29–44.
32. Sartor RB, Mazmanian SK. Intestinal Microbes in Inflammatory Bowel Diseases. *Am J Gastroenterol Suppl.* 2012;1(1):15–21.
33. Sheehan D, Moran C, Shanahan F. The microbiota in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol.* 2015;50(5):495–507.
34. Gevers D. The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn ’ s disease. 2015;15(3):382–92.
35. Kostic AD, Gevers D, Pedamallu CS, Kostic AD, Gevers D, Pedamallu CS, et al. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genomic analysis identifies association of Fusobacterium with colorectal carcinoma.* 2012;292–8.
36. Bretin A, Carrière J, Dalmasso G, Bergognoux A, B’chir W, Maurin AC, et al. Activation of the EIF2AK4-EIF2A/eIF2 α -ATF4 pathway triggers autophagy response to Crohn disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* infection. *Autophagy.* 2016;12(5):770–83.
37. Nagao-Kitamoto H, Kamada N. Host-microbial Cross-talk in Inflammatory Bowel Disease. *Immune Netw.* 2017;17(1):1–12.
38. Mukhopadhyay I, Hansen R, Meharg C, Thomson JM, Russell RK, Berry SH, et al. The fungal microbiota of de-novo paediatric inflammatory bowel disease. *Microbes Infect.* 2015;17(4):304–10.
39. Norman JM, Handley SA, Baldridge MT, Droit L, Liu CY, Keller BC, et al. Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell.*

- 2015;160(3):447–60.
40. Wagner J, Maksimovic J, Farries G, Sim WH, Bishop RF, Cameron DJ, et al. Bacteriophages in gut samples from pediatric Crohn's disease patients: Metagenomic analysis using 454 pyrosequencing. *Inflamm Bowel Dis.* 2013;19(8):1598–608.
 41. Burgess SL, Gilchrist CA, Lynn TC, Petri WA. Parasitic protozoa and interactions with the host intestinal microbiota. *Infect Immun.* 2017;85(8):1–12.
 42. Zanello G, Kevans D, Goethel A, Silverberg M, Tyler A, Croitoru K. Genetics and innate and adaptive immunity in IBD. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser.* 2014;79:41–55.
 43. Cleynen I, Vazeille E, Artieda M, Verspaget HW, Szczypiorska M, Bringer MA, et al. Genetic and microbial factors modulating the ubiquitin proteasome system in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2014;63(8):1265–74.
 44. Becker C, Neurath MF, Wirtz S. The intestinal microbiota in inflammatory bowel disease. *ILAR J.* 2015;56(2):192–204.
 45. Chiriac MT, Mahapatro M, Neurath MF, Becker C. The microbiome in visceral medicine: Inflammatory bowel disease, obesity and beyond. *Visc Med.* 2017;33(2):153–62.
 46. Marchesi JR, Adams DH, Fava F, Hermes GDA, Hirschfield GM, Hold G, et al. The gut microbiota and host health: A new clinical frontier. *Gut.* 2016;65(2):330–9.
 47. Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Ann C, Bohlooly-y M, et al. NIH Public Access. 2013;341(6145).
 48. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature.* 2013;504(7480):446–50.
 49. Narayan K, Sylvia KE, Malhotra N, Yin CC, Vallerskog T, Kornfeld H, et al. A dietary fiber-deprived gut microbiota degrades the colonic mucus barrier and enhances pathogen

- susceptibility. 2012;13(5):511–8.
50. Statovci D, Aguilera M, MacSharry J, Melgar S. The impact of western diet and nutrients on the microbiota and immune response at mucosal interfaces. *Front Immunol.* 2017;8(JUL).
 51. Nimmo ER, Prendergast JG, Aldhous MC, Kennedy NA, Henderson P, Drummond HE, et al. Genome-wide methylation profiling in Crohn’s disease identifies altered epigenetic regulation of key host defense mechanisms including the Th17 pathway. *Inflamm Bowel Dis.* 2012;18(5):889–99.
 52. Serban DE. Microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis and therapy: Is it all about diet? *Nutr Clin Pract.* 2015;30(6):760–79.
 53. Ye Y, Pang Z, Chen W, Ju S, Zhou C. The epidemiology and risk factors of inflammatory bowel disease. 2015;8(12):22529–42.
 54. Dolan KT, Chang EB. Diet, gut microbes, and the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Mol Nutr Food Res.* 2017;61(1):1600129.
 55. Halmos EP, Gibson PR. Dietary management of IBD-insights and advice. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2015;12(3):133–46.
 56. Laura J. Dixon, PhD, Amrita Kabi, PhD, Kourtney P. Nickerson, PhD and C, McDonald P. Combinatorial Effects of Diet and Genetics on Inflammatory Bowel Disease Pathogenesis. 2016;21(4):912–22.
 57. Yamamoto T, Shimoyama T, Kuriyama M. Dietary and enteral interventions for Crohn’s disease. *Curr Opin Biotechnol.* 2017;44:69–73.
 58. MacLellan A, Connors J, Grant S, Cahill L, Langille MGI, Van Limbergen J. The impact of exclusive enteral nutrition (EEN) on the gut microbiome in Crohn’s disease: A review. *Nutrients.* 2017;9(5):1–14.
 59. Pfeffer-Gik T, Levine A. Dietary clues to the pathogenesis of crohn’s disease. *Dig Dis.*

- 2014;32(4):389–94.
60. Kansal S, Wagner J, Kirkwood CD. Enteral Nutrition in Crohn ' s Disease : An Underused Therapy. 2013;2013.
 61. Whitten KE, Rogers P, Ooi CKY, Day AS. International survey of enteral nutrition protocols used in children with Crohn's disease. *J Dig Dis*. 2012;13(2):107–12.
 62. Kaakoush NO, Day AS, Leach ST, Lemberg DA, Nielsen S, Mitchell HM. Effect of exclusive enteral nutrition on the microbiota of children with newly diagnosed Crohn's disease. *Clin Transl Gastroenterol*. 2015;6(1):e71-11.
 63. F.M. R, G. V, K.L. K, A. G, A. L, J.C. E, et al. Consensus guidelines of ECCO/ESPGHAN on the medical management of pediatric Crohn's disease. *J Crohn's Colitis*. 2014;8(10):1179–207.
 64. Swaminath A, Feathers A, Ananthakrishnan AN, Falzon L, Li Ferry S. Systematic review with meta-analysis: enteral nutrition therapy for the induction of remission in paediatric Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2017;46(7):645–56.
 65. Dave M, Loftus E V. Mucosal healing in inflammatory bowel disease - A true paradigm of success? *Gastroenterol Hepatol*. 2012;8(1):29–38.
 66. Ruemmele FM, Pigneur B, Garnier-Lengliné H. Enteral nutrition as treatment option for Crohn's disease: In kids only? *Nestle Nutr Inst Workshop Ser*. 2014;79:115–23.
 67. Gerasimidis K, Bertz M, Hanske L, Junick J, Biskou O, Aguilera M, et al. Decline in presumptively protective gut bacterial species and metabolites are paradoxically associated with disease improvement in pediatric Crohn's disease during enteral nutrition. *Inflamm Bowel Dis*. 2014;20(5):861–71.
 68. Tjellström B, Högberg L, Stenhammar L, Magnusson KE, Midtvedt T, Norin E, et al. Effect of exclusive enteral nutrition on gut microflora function in children with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol*. 2012;47(12):1454–9.

69. Levine A, Wine E. Effects of enteral nutrition on Crohn's Disease: Clues to the impact of diet on disease pathogenesis. *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19(6):1322–9.
70. Bernstein CN. Treatment of IBD: Where we are and where we are going. *Am J Gastroenterol*. 2015;110(1):114–26.
71. Gong D, Yu X, Wang L, Kong L, Gong X, Dong Q. Exclusive Enteral Nutrition Induces Remission in Pediatric Crohn's Disease via Modulation of the Gut Microbiota. *Biomed Res Int*. 2017;2017:1–6.
72. Barbalho SM, Goulart R de A, Quesada K, Bechara MD, de Carvalho A de CA. Inflammatory bowel disease: can omega-3 fatty acids really help? *Ann Gastroenterol Q Publ Hell Soc Gastroenterol*. 2016;29(1):37–43.
73. Hou JK, Lee D, Lewis J. Diet and Inflammatory Bowel Disease: Review of Patient-Targeted Recommendations. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014;12(10):1592–600.
74. Obih C, Wahbeh G, Lee D, Braly K, Giefer M, Shaffer ML, et al. Specific carbohydrate diet for pediatric inflammatory bowel disease in clinical practice within an academic IBD center. *Nutrition*. 2016;32(4):418–25.
75. Sigall-Boneh R, Pfeffer-Gik T, Segal I, Zangen T, Boaz M, Levine A. Partial enteral nutrition with a Crohn's disease exclusion diet is effective for induction of remission in children and young adults with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2014;20(8):1353–60.