

Ana Catarina Martins Gonçalves

**Relação entre a Infecção por *Escherichia coli* Aderente-Invasiva e a
Doença de Crohn**

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2013

Ana Catarina Martins Gonçalves

**Relação entre a Infecção por Escherichia coli Aderente-Invasiva e a
Doença de Crohn**

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2013

Relação entre a Infecção por *Escherichia coli* Aderente-Invasina e a Doença de Crohn

Ana Catarina Martins Gonçalves

“Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.”

Resumo

A Doença de Crohn é uma doença inflamatória crônica que pode afetar qualquer parte do trato gastrointestinal, embora comprometa preferencialmente o íleo. Apesar da incessante investigação a sua etiologia e patogênese permanecem desconhecidas. Até ao momento várias hipóteses têm sido avançadas na compreensão desta doença. Contudo, a teoria atual considera que se trata de uma doença complexa multifatorial que ocorre em indivíduos com predisposição genética, e que determinados fatores ambientais e microbianos são responsáveis pelo desenvolvimento de uma resposta imune inadequada.

O possível envolvimento de um organismo infeccioso, em particular a *Escherichia coli* Aderente-Invasiva (AIEC), tem estado sob investigação. A análise da flora bacteriana associada à mucosa ileal revelou uma anormal colonização da AIEC nos pacientes com Doença de Crohn. Estas bactérias são capazes de aderir e invadir as células epiteliais intestinais, assim como, penetrar e replicar extensivamente no interior dos macrófagos, sem induzir a morte da célula hospedeira. Por outro lado, a permeabilidade intestinal está significativamente aumentada nos indivíduos com Doença de Crohn. A AIEC diminui a resistência elétrica transepitelial e altera a estrutura morfológica das junções celulares, o que pode contribuir para esse aumento de permeabilidade. Pensa-se que as células M poderão constituir um potencial alvo de entrada que permite a interação bacteriana com os macrófagos da lâmina própria. Estudos *in vitro* têm demonstrado que os macrófagos infetados produzem grandes quantidades de fator de necrose tumoral α , e induzem a formação de agregados de células muito semelhantes aos granulomas epitelioides. Estas estruturas representam uma das marcas histológicas características da Doença de Crohn.

Palavras-Chave: Doença de Crohn, etiologia, patogênese, doenças inflamatórias intestinais, epidemiologia, *Escherichia coli* aderente-invasiva, disbiose, microflora intestinal, autofagia, fatores genéticos e ambientais, resposta imunitária, terapia.

Abstract

Crohn's disease is a chronic inflammatory disease that can affect any part of the gastrointestinal tract, although preferably compromise the ileum. Despite ongoing research its etiology and pathogenesis remain unknown. So far several hypotheses have been advanced in the understanding of this disease. However, the current theory considers that it is a complex multifactorial disease that occurs in individuals with a genetic predisposition and certain environmental and microbial factors are responsible for developing a response immune inadequate.

The possible involvement of an infectious organism, in particular adherent-invasive Escherichia coli (AIEC) has been under investigation. The analysis of the bacterial flora associated with ileal mucosa revealed an abnormal AIEC colonization in patients with Crohn's disease. These bacteria are able to adhere to and invade intestinal epithelial cells, as well as penetrate and replicate extensively within macrophages without inducing the death of the host cell. On the other hand, is significantly increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease. The AIEC decreases the transepithelial electrical resistance changes and the morphological structure of cell junctions, which may contribute to this increased permeability. It is believed that M cells might constitute a potential target input which allows the bacterial interaction with macrophages in the lamina propria. In vitro studies have demonstrated that infected macrophages produce large quantities of tumor necrosis factor α , and induce the formation of cell aggregates similar to many epithelioid granulomas. These structures represent one of the marks histological features of Crohn's disease.

Keywords: Crohn's disease, etiology, pathogenesis, epidemiology, adherent-invasive Escherichia coli, dysbiosis, intestinal microflora, autophagy, genetic and environmental factors, innate immune dysfunction, therapeutic.

Agradecimentos

Depois de vários meses de intenso trabalho, gostaria de deixar presente um sincero agradecimento a todos aqueles que me ajudaram e apoiaram nesta conquista, rumo à conclusão da minha licenciatura.

Quero deixar um especial agradecimento à Prof. Doutora Amélia Assunção pela atenção, disponibilidade e pelas, indispensáveis, sugestões que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha família e aos meus amigos, pelas palavras de incentivo, por todo o apoio, motivação, amizade e compreensão durante este árduo percurso.

Por último, e não menos importante, aos meus pais que sempre estiveram presentes nos bons e nos maus momentos e a quem agradeço tudo aquilo que sou hoje.

ÍNDICE

I.	INTRODUÇÃO	1
II.	DESENVOLVIMENTO.....	3
1.	DOENÇA DE CROHN	4
1.1	DEFINIÇÃO	4
1.2	EPIDEMIOLOGIA.....	4
1.2.1	Incidência e Prevalência.....	4
1.2.2	População Afetada.....	6
1.3	ASPETOS HISTOLÓGICOS	7
1.4	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	8
1.5	TRATAMENTO	10
2.	ETIOLOGIA E PATOGÊNESE.....	11
2.1	FATORES AMBIENTAIS.....	12
2.1.1	Tabagismo	12
2.1.2	Dieta	14
2.1.3	Apendicectomia.....	14
2.1.4	Outros Fatores	14
2.2	PREDISPOSIÇÃO E SUSCETIBILIDADE GENÉTICA	15
2.2.1	NOD2/CARD15	16
2.2.2	ATG16L1	18
2.2.3	IRGM	19
2.2.4	IL-23R	20
3.	O PAPEL DOS MICRORGANISMOS NA DOENÇA DE CROHN	22
3.1	MICROFLORA INTESTINAL.....	22
3.2	PATOGÊNIOS ESPECÍFICOS.....	24
3.2.1	<i>Mycobacterium avium paratuberculosis</i>	24
4.	<i>ESCHERICHIA COLI</i> ADERENTE- INVASIVA.....	26
4.1	DO COMENSALISMO À PATOGENICIDADE	26
4.2	MECANISMO DE PATOGENICIDADE	28
4.2.1	Adesão Bacteriana.....	28
4.2.2	Invasão Bacteriana	32
4.2.3	Defeitos na Barreira Epitelial Intestinal	34
4.2.4	Células M como Porta de Entrada Bacteriana.....	35
4.2.5	Sobrevivência e Replicação no Interior dos Macrófagos	37
4.2.6	Formação de Granulomas.....	40
4.3	O PAPEL DA AIEC NA AUTOFAGIA	44
III.	PERSPETIVAS FUTURAS / CONCLUSÃO	45
IV.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

Índice de Figuras

Figura 1: Mapa global da doença inflamatória intestinal.....	3
Figura 2: Interação dos vários fatores responsáveis pela inflamação intestinal crónica..	9
Figura 3: Representação esquemática da proteína NOD2/CARD15.....	14
Figura 4: Ativação do fator NF- κ B após o reconhecimento dos componentes bacterianos pelos TLR e NOD2/CARD15.....	16
Figura 5: Composição e concentração das principais espécies bacterianas distribuídas pelos diferentes segmentos do trato gastrointestinal.....	20
Figura 6: Sobre-expressão do recetor CEACAM 6 nos ratinhos transgênicos infetados com AIEC LF82.....	27
Figura 7: Adesão bacteriana na presença versus ausência do anticorpo anti-CEACAM6.	28
Figura 8: Função dos pili tipo 1 da AIEC LF82 na DC.....	29
Figura 9: Infeção das células Hep-2 pela AIEC LF82 obtida por microscopia de transmissão eletrónica.....	31
Figura 10: Estrutura da barreira epitelial intestinal.....	32
Figura 11: Alteração da estrutura do complexo de junção apical, resultante da infeção por AIEC, responsável pela alteração da permeabilidade intestinal nos indivíduos com Doença de Crohn.....	34
Figura 12: Replicação bacteriana no interior dos macrófagos.....	37
Figura 13: Representação ilustrativa de um granuloma característico na Doença de Crohn.....	39
Figura 14: AIEC induz a agregação das células mononucleares do sangue periférico humano in vitro.....	40
Figura 15: Mecanismo de ação da ECAI nas CEI.....	41

Índice de Tabelas

Tabela 1: Epidemiologia da Doença de Crohn.....	5
Tabela 2: Manifestações extra-intestinais da Doença de Crohn.....	7
Tabela 3: Fármacos utilizados na Doença de Crohn.....	8

Lista de Acrónimos

AIEC – *Escherichia coli* Aderente-invasiva

AINEs – Anti-Inflamatórios Não Esteroides

ATG16L1 - Autophagy-related 16- like1

CARD15 – *Caspase Activation Recruitment Domain family member 15*

CEACAM - Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule

CEI – Células Epiteliais Intestinais

CO – Contraceptivos Orais

CU – Colite Ulcerosa

DC – Doença de Crohn

DII - Doença Inflamatória Intestinal

GP2 – Glicoproteína 2

IFN- γ – Interferão gama

IRGM – *Immunity-related GTPases family M*

LC3-II - Microtubule-associated protein 1 light chain 3-II

LRR – Leucine Rich Repeat

MAP – *Mycobacterium avium paratuberculosis*

MDP – Dipéptido De Muramilo

NF- κ B - Nuclear Factor Kappa B

NLRs – NOD-Like Receptors

NOD2 – *Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein 2*

OmpC - Outer Membrane Protein C

PAMPs - Pathogen-Associated Molecular Patterns

PBS - Phosphate-Buffered Saline

PCR - Polymerase Chain Reaction

PRRs - Pattern-Recognition Receptors

TGI – Trato GastroIntestinal

TLRs – Toll-Like Receptors

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa

ZO-1 - Zonula Occludens-1

I. Introdução

Introdução

Em 1932, Burril B. Crohn, Leon Ginzburg e Gordon D. Oppenheimer descreveram, pela primeira vez, os aspectos clínicos e patológicos da doença inflamatória intestinal que viria a ficar conhecida como Doença de Crohn (DC) (Cotran et al., 1996).

Numa fase inicial, estes médicos americanos admitiam que este distúrbio restringia-se à porção do íleo terminal, pelo que a denominaram de “ileíte terminal”. Porém, o posterior reconhecimento de que poderiam ser afetados segmentos intestinais nitidamente delineados e com áreas intermediárias intactas, deu origem à designação alternativa de “enterite regional”(Rubin, 2005).

Desde então, a frequência do seu diagnóstico, assim como o reconhecimento de que este processo inflamatório poderia atingir outras regiões do intestino foi crescendo gradualmente (Cotran et al., 1994). Em 1960, Lockhart-Mummery e Morson num estudo clínico que envolvia 25 pacientes, descreveram manifestações características desta mesma patologia no colón (Lockhart-Mummery e Morson, 1960).

Muitos outros estudos se seguiram e contribuíram para a constatação de que esta doença poderia instalar-se ao longo do trato gastrointestinal (TGI), pelo que optou-se por denomina-la pelo nome eponímico Doença de Crohn.

A etiologia desta doença ainda não está completamente esclarecida. Contudo, nos últimos anos alguns microrganismos, nomeadamente a *Escherichia coli* aderente-invasiva, têm sido apontados como possíveis agentes na patogénese da Doença de Crohn.

A presente dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas tem como objetivo efetuar uma revisão bibliográfica de modo a discutir as possíveis etiologias da Doença de Crohn, nomeadamente os fatores microbianos, enfatizando de um modo particular a AIEC. Da mesma forma, propõe-se dar a conhecer os grandes avanços que têm sido alcançados, relativamente aos mecanismos de patogenicidade desta bactéria, que poderão estar na génese do desenvolvimento da doença. Por último, destacar perspectivas futuras no que diz respeito à terapêutica e à descoberta de novos dados sobre a etiologia e patogénese da Doença de Crohn. Para isso procedeu-se à pesquisa de artigos científicos através da indispensável ferramenta EndNote, assim como, dos motores de busca Google scholar, Pubmed e Science Direct.

II. Desenvolvimento

1. Doença de Crohn

1.1 Definição

A Doença de Crohn é uma doença inflamatória crônica que pode afetar qualquer parte do trato gastrointestinal, desde a boca até ao ânus, embora comprometa preferencialmente o intestino delgado no seu segmento terminal, denominado íleo (Rubin et al.,2006).

É caracterizada pela presença de uma inflamação transmural, segmentar, podendo intercalar-se áreas inflamadas com áreas saudáveis e, ainda, pelo aparecimento de ulcerações, fistulas, estenoses e granulomas (Rubin et al., 2006).

Esta doença evolui, caracteristicamente, por período de agravamento alternado com períodos de remissão, não sendo possível prever a ocorrência de nenhuma destas fases nem a sua duração. Os períodos em que não estão presentes quaisquer sintomas podem ser consequentes ao tratamento farmacológico, intervenção cirúrgica ou, mais raramente, podem ser espontâneos (Friedman e Blumberg, 2002)

A Doença de Crohn juntamente com a Colite Ulcerosa (CU), em função dos seus aspetos clínicos, patológicos e epidemiológicos, representam as duas principais entidades patológicas da Doença Inflamatória Intestinal (DII) (Qin, 2012).

1.2 Epidemiologia

Nas últimas décadas tem-se assistido a um aumento do número de novos casos de doença inflamatória intestinal. Parte deste aumento deve ser atribuído a um aperfeiçoamento dos métodos de diagnóstico e a um melhor conhecimento da doença. Porém, grande parte desse número parece corresponder a um real crescimento da população afetada (Hovde e Moum, 2012). Atualmente estima-se que existem 1,4 milhões de indivíduos afetados nos EUA e 2,2 milhões na Europa (Lapaquette et al., 2012a). Deste modo, as DII tornaram-se, a seguir à artrite reumatoide, as patologias inflamatórias crônicas mais comuns (Qin, 2012).

1.2.1 Incidência e Prevalência

Vários estudos têm sido realizados sobre a epidemiologia da DII e todos eles relatam a existência de uma variação geográfica (Figura 1), o que poderá sugerir a influência de

fatores ambientais no desenvolvimento da doença. América do Norte, Reino Unido e o norte da Europa, correspondem às áreas de maior incidência. Por sua vez, a Austrália, África do Sul e o centro e sul da Europa apresentam uma incidência moderada, enquanto a Ásia, África e América do Sul são consideradas regiões de baixa incidência (Karlinger et al., 2000; Lakatos, 2006; Economou e Pappas, 2008; Hovde e Moum, 2012).

Embora a incidência e prevalência das DII nestes últimos países mencionados continue a ser mais baixa em comparação com o norte da Europa e América do Norte, dados recentes apontam para um aumento gradual ao longo dos últimos anos. Este facto poderá estar relacionado com adoção de um estilo de vida mais ocidental, nomeadamente, alterações na dieta, hábitos tabágicos e uma maior exposição à poluição e químicos industriais (Lakatos, 2006; Economou e Pappas, 2008; Hovde e Moum, 2012; Prideaux et al., 2012).

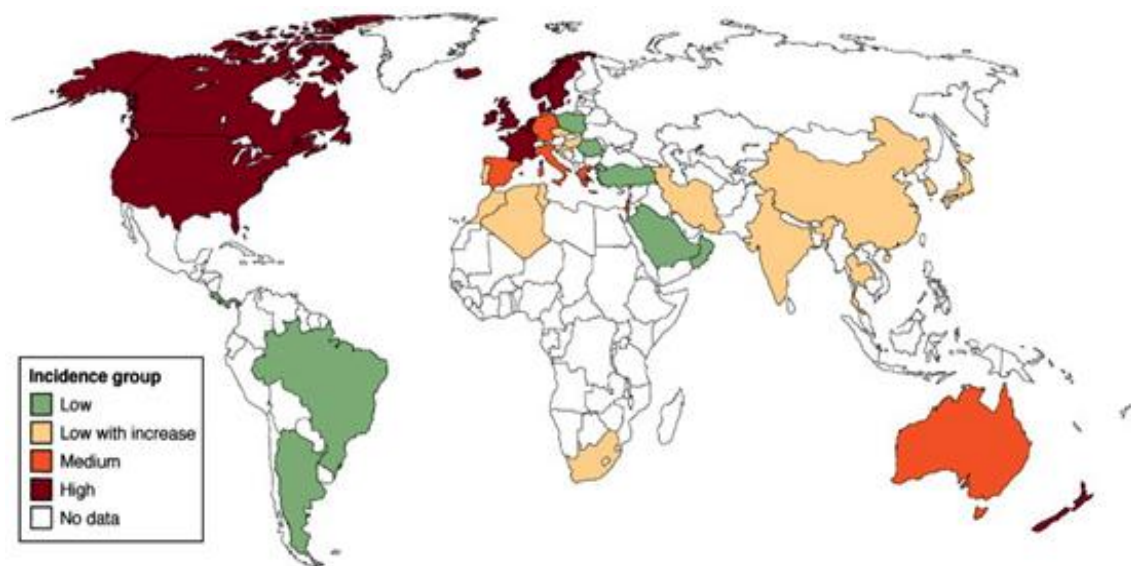


Figura 1: Mapa global da doença inflamatória intestinal. A cor vermelha refere-se a uma incidência anual superior a $10/10^5$, a cor laranja a uma incidência de $5-10/10^5$, a cor verde a uma incidência inferior a $4/10^5$ e a cor bege representa baixa incidência da doença. A ausência de cor indica inexistência de dados (adaptado de Cosnes, J., et al., 2011).

A Doença de Crohn é mais comum nos países desenvolvidos e industrializados, apontando a urbanização como um fator de risco potencial (Karlinger et al., 2000; Lakatos, 2006). As áreas urbanas apresentam uma maior prevalência das DII em relação às rurais, assim como, as classes socioeconômicas altas têm uma prevalência superior em comparação com as classes baixas (Karlinger et al., 2000; Hanauer, 2006).

Em Portugal os dados relativos à epidemiologia das DII são escassos. Um estudo baseado num método farmacoepidemiológico permitiu, mediante as estimativas do consumo de fármacos anti-inflamatórios intestinais, que é um grupo terapêutico bastante específico para o tratamento destas doenças, verificar que, entre 2003 e 2007, a prevalência de DII aumentou de 86 para 146 casos por 100.000 pessoas. Com base no mesmo estudo foi possível apurar que, no mesmo período em Portugal, a prevalência da DC aumentou de 43 para 73 casos por 100.000 pessoas (Azevedo et al., 2010).

1.2.2 População Afetada

Esta doença pode ocorrer em qualquer idade, desde a infância até à idade avançada, porém apresenta uma distribuição etária bimodal. O maior número de casos está compreendido entre os 15 e os 30 anos, sendo comum um segundo pico, embora mais pequeno, na sexta e sétima década (Hanauer, 2006; Hovde e Moum, 2012).

Relativamente à influência do sexo sobre a doença, verifica-se uma ligeira predominância das mulheres em relação aos homens, numa proporção de 1,1 a 1,8:1 (Karlinger et al., 2000; Hanauer, 2006; Hovde e Moum, 2012).

Em Portugal, segundo o estudo referido anteriormente, a prevalência foi maior no grupo etário dos 17-39 anos, e o sexo feminino foi ligeiramente mais recorrente do que o masculino (Azevedo et al., 2010).

A influência racial e étnica sobre a prevalência da doença é também fortemente indicada. Os indivíduos de raça negra são menos afetados do que os brancos e a população judaica é considerada de alto risco (Sartor, 2006). Além disso, a prevalência nos judeus asquenazes é maior do que em judeus nascidos em Israel, sefarditas ou orientais. Por outro lado, os latinos e asiáticos são os menos afetados (Karlinger et al., 2000; Hanauer, 2006; Cosnes et al., 2011).

Diversos estudos têm documentado a existência de um padrão de agregação familiar, sugerindo o envolvimento de fatores genéticos na patogénese da doença. Num doente

com DC, o risco de que um parente em primeiro grau seja afetado durante a sua vida é de cerca de 5%. No caso de um paciente judeu esse valor aumenta para 8% (Friedman e Blumberg, 2002). Se ambos os progenitores tiverem DII, cada filho apresenta uma probabilidade de 36% de poder vir a desenvolver a doença (Halme et al., 2006). Estudos com gêmeos revelam uma taxa de concordância para a DC de 20 a 50% nos gêmeos monozigóticos e inferior a 10% para os gêmeos dizigóticos (Halme et al., 2006; Cho, 2008).

Todos estes dados epidemiológicos encontram-se esquematizados na tabela 1.

Tabela 1: Epidemiologia da Doença de Crohn.

Doença de Crohn	
Incidência/Prevalência Elevada	América do Norte, Reino Unido e norte da Europa
Moderada	Austrália, África do Sul, centro e sul da Europa
Baixa	Ásia, África e América do Sul
Idade de manifestação	15-30 e 60-70
Porporção entre sexos: feminino - masculino	1,1 a 1,8:1
Raça	Brancos > negros
Etnia	Judeus > caucasianos não judeus > latinos e asiáticos
Risco familiares 1º grau	5% e entre Judeus 8%
Risco com ambos os pais afetados	36%
Gêmeos monozigóticos	20%-50% de concordância
Gêmeos dizigóticos	<10% de concordância

1.3 Aspetos Histológicos

A Doença de Crohn apresenta-se, geralmente, como um processo inflamatório que compromete toda a espessura da parede intestinal, mas pode afetar qualquer parte do TGI. No momento do diagnóstico, 30 a 40% dos pacientes apresenta doença isolada no intestino delgado, 40 a 55% envolve o intestino delgado e grosso, 15 a 25% apresenta apenas colite, cerca de 3% dos pacientes atinge TGI superior e o reto é frequentemente

poupado (Friedman e Blumberg, 2002). Além disso, dos indivíduos que manifestam a doença no intestino delgado, a porção do íleo terminal é comprometida na maioria dos casos (Louis et al., 2001).

Na fase inicial da doença, o intestino afetado apresenta edema acentuado da mucosa e submucosa, resultando na perda do padrão normal das pregas transversais, e no aparecimento de pequenas áreas de ulceração hemorrágica que, com o tempo, transformam-se em fissuras (Friedman e Blumberg, 2002).

Na fase crônica, a mucosa intestinal apresenta uma aparência semelhante às “pedras da calçada” como resultado da combinação do edema da submucosa com úlceras em forma de fissuras profundas e interligantes. A parede intestinal apresenta-se espessada pelo edema e fibrose, o que conduz à obstrução intestinal. Normalmente ocorre, também a formação de estenoses. As estenoses correspondem ao estreitamento luminal, que pode ocorrer num segmento do intestino delgado ou grosso, e que provocam a ocorrência de uma obstrução parcial ou total de acordo com a intensidade da inflamação (Friedman e Blumberg, 2002; Rubin et al., 2006). Como a doença é descontínua, podem coexistir lesões com tempos e evolução diferentes, sobrepondo-se sinais inflamatórios agudos e crônicos.

1.4 Manifestações Clínicas

A evolução da doença caracteriza-se por três padrões principais: inflamatório, fibroestenótico-obstrutivo e fistuloso-penetrante. Dependendo do padrão, localização e gravidade da doença surgem diferentes manifestações clínicas (Friedman e Blumberg, 2002).

Ileocolite: É o local mais comum da inflamação. Caracteriza-se, principalmente, por dor no quadrante inferior direito, sendo a dor referida do tipo cólica, que precede e é aliviada com a defecação; diarreia, febre de baixo grau, perda de peso (tipicamente 10 a 20% do peso corporal), anorexia, obstrução intestinal, formação de fístulas para o intestino adjacente, pele, vagina e bexiga (Friedman e Blumberg., 2002).

Jejunoleíte: Associada a má absorção que, por sua vez, pode causar hipocalcemia, hipomagnesemia, coagulopatia, hipoalbuminemia; anemia megaloblástica, diarreia,

esteatorreia e fraturas vertebrais por hipocalcémia, deficiência de Vitamina D e utilização prolongada de corticoides (Friedman e Blumberg., 2002).

Colite: O doente apresenta febre de baixo grau, mal-estar, diarreia, cólicas abdominais, hematoquezias, isto é, perda de sangue vivo, misturado ou não com as fezes, através do reto, e ainda estenoses e fístulas (Friedman e Blumberg, 2002).

Doença perianal: Observa-se a formação de estenoses anais, fístulas anorretais, abscessos perirretais e incontinência fecal (Friedman e Blumberg, 2002).

Doença gastroduodenal: Os sinais e sintomas incluem náuseas, vômitos, dor epigástrica, gastrite e formação de fístulas (Friedman e Blumberg, 2002).

A DC está também associada a uma variedade de manifestações extra-intestinais (Tabela 2), sendo as mais frequentes as complicações dermatológicas, reumatológicas, oculares, hepatobiliares e urológicas. Cerca de 25-46% dos pacientes com DC apresentam alguma destas complicações (Hovde e Moum, 2012). No caso dos doentes mais jovens, o atraso de crescimento é um dos problemas comuns neste estrato etário.

Tabela 2: Manifestações extra-intestinais da Doença de Crohn.

Manifestações extraintestinais presentes na Doença de Crohn	
Dermatológicas	Eritema nodoso Pioderma gangrenoso <i>Pioestomatite vegetans</i> Aftas Síndrome Sweet
Reumatológicas	Artrite periférica Sacroileíte Osteoporose / Osteopenia
Oculares	Uveíte Episclerite Conjuntivite
Hepatobiliares	Esteatose hepática Colangite esclerosante primária
Urológicas	Nefrolitíase Uropatia obstrutiva
Outras	Tromboembolismo Amiloidose secundária Pancreatite Doença pulmonar intersticial Miocardite, pleuropericardite

1.5 Tratamento

A Doença de Crohn é uma doença crónica e, portanto, não tem cura. Deste modo, os objetivos do tratamento passam pela indução e manutenção da melhoria dos sintomas e, na melhor das hipóteses, pela indução e manutenção da cicatrização da mucosa (Lichtenstein et al., 2009).

A localização, severidade da doença e os efeitos secundários devem ser tidos em consideração na prescrição dos fármacos, assim como, se o efeito pretendido é induzir a remissão ou se se trata de uma terapêutica de manutenção.

Globalmente os fármacos mais utilizados nesta patologia são os anti-inflamatórios intestinais, corticosteroides sistémicos, imunossuppressores, antibióticos e terapia biológica. No entanto, as opções de tratamento mais eficazes na doença aguda são os corticosteroides e a terapia biológica, enquanto que no tratamento de manutenção a azatioprina, metotrexato e a terapêutica biológica são os eleitos (Hovde e Moum, 2012).

Tabela 3: Fármacos utilizados segundo a gravidade da Doença de Crohn.

Doença de Crohn	Agudização	Manutenção
Ligeira	Budesonido	Messalazina, Sulfassalazina
Moderada	Budesonido, Corticosteróides Sistémicos	Azatioprina, Meotrexato, Infiximab
Grave	Costicosteróides, Infiximab	Azatioprina, Metotrexato

2. Etiologia e Patogénese

Apesar das intensas investigações e dos importantes avanços ocorridos nas últimas décadas, a etiologia da Doença de Crohn continua a ser um enigma, o que dificulta o desenvolvimento de uma estratégia terapêutica específica, bem como a descoberta de uma possível cura.

Até ao momento várias hipóteses têm sido avançadas como é o caso da infecção patogénica persistente, desregulação da resposta imune, defeitos na função da barreira da mucosa intestinal e disbiose (Sartor, 2006). Apesar de todas elas contribuírem para a compreensão da DC a teoria atual considera que se trata de uma doença complexa, multifatorial que ocorre em indivíduos com predisposição genética, e que determinados fatores ambientais e microbianos, induzidos pelo progresso da sociedade, são responsáveis por causar uma resposta imune inadequada (Lapaquette et al., 2012a).

No fundo, o dogma atual envolve quatro componentes fundamentais (Figura 2) que interagem entre si tornando a doença clinicamente evidente.

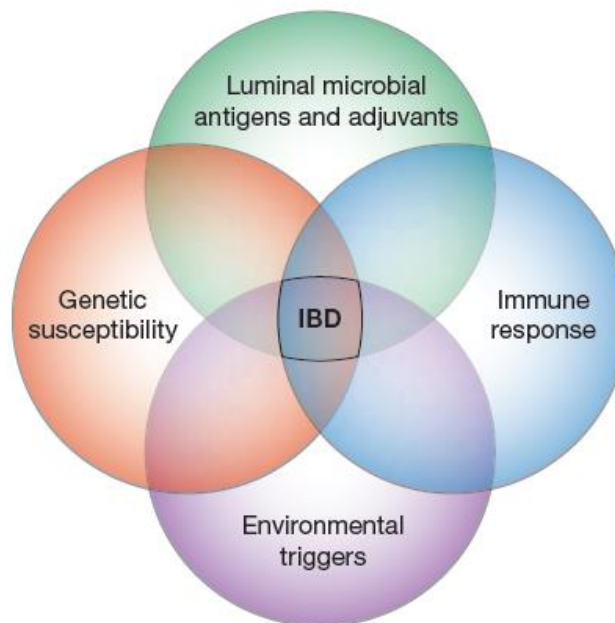


Figura 2: Interação dos vários fatores responsáveis pela inflamação intestinal crónica. Respostas imunológicas inadequadas a um subconjunto de bactérias entéricas desenvolvidas em hospedeiros geneticamente suscetíveis, juntamente com fatores ambientais precipitam o aparecimento ou reativação da Doença de Crohn (adaptado de SARTOR, R. B., 2006).

2.1 Fatores Ambientais

Durante o último século, ocorreram notáveis alterações no tipo de doenças que afetam o Homem. Isto porque, se antigamente as doenças infecciosas eram os grandes responsáveis pela morbidade e mortalidade, atualmente foram ultrapassadas pelas doenças neoplásicas e inflamatórias crônicas, na qual se insere a Doença de Crohn (Danese e Fiocchi, 2006).

Esta mudança tem sido bastante documentada em países ocidentais porém, nos últimos tempos, este fenômeno tem-se estendido a outras partes do mundo o que pode ser explicado pelo progresso social, económico, bem como, pela industrialização e “ocidentalização” (Danese and Fiocchi, 2006).

A “hipótese da higiene”, apresentada por Strachan em 1989, foi apontada como uma possível explicação para esta evolução e, é suportada pela evidência, nas regiões do globo onde DII são emergentes, de uma melhoria ao nível da saúde (com menos doenças infecciosas e parasitárias, desenvolvimento de vacinas, antibióticos), assim como, ao nível da qualidade de vida (com condições sanitárias, água canalizada, higiene e uma melhor alimentação). Consequentemente, a falta de exposição a antígenos e a infecções numa idade precoce afeta negativamente o desenvolvimento do sistema imunitário. E, isto significa que este não está preparado para, mais tarde, responder eficazmente perante agentes patogénicos conduzindo, desta forma, ao desenvolvimento de processos inflamatórios anormais, incluindo a DC, e outras doenças do foro alérgico e auto-imune (Danese e Fiocchi, 2006; Schirbel e Fiocchi, 2010; Qin, 2012).

Muitos outros estudos têm mostrado o envolvimento de diversos fatores ambientais na patogénese da DC. Estes fatores incluem o tabagismo, dieta, anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), contraceptivos orais, stress, infeções, apendicectomia, entre outros. De todos eles, o tabagismo é o fator ambiental mais extensivamente estudado.

2.1.1 Tabagismo

Fumar está associado a um risco aumentado de desenvolvimento da DC. Os indivíduos que fumam têm um risco 2 a 4 vezes superior em relação aos não fumadores (Braunwald et al., 2002). E, além de influenciar negativamente a evolução clínica da DC, o hábito de fumar está também associado a uma maior frequência de recidivas, ao desenvolvimento de fístulas e estenoses, assim como, ao aumento do consumo de

corticosteroides, agentes imunossupressores e da necessidade de intervenções cirúrgicas (Hanauer, 2006; Danese e Fiocchi, 2006; Carbonnel et al., 2009; Schirbel e Fiocchi, 2010; Hovde e Moum, 2012).

Várias razões têm sido sugeridas para o possível efeito do tabaco na DC, nomeadamente, a sua influência na imunidade celular e humoral, alterações nos níveis de citocinas, na composição do muco, diminuição da capacidade de fagocitose dos macrófagos, alteração da microcirculação e potenciação do efeito pró-trombótico. A nicotina apresenta, também, outras consequências sobre o intestino designadamente alteração na permeabilidade, bem como, a alteração da motilidade intestinal devido a uma redução do tónus muscular e contractilidade, modulada pelo óxido nítrico (Lakatos et al., 2007; Schirbel e Fiocchi, 2010).

Segundo Lakatos, P.L. *et al*, os ex-fumadores têm um risco aumentado de desenvolver DC quando comparados com doentes que nunca fumaram, e esse risco diminui apenas 4 anos após a cessação tabágica. Contudo, os benefícios de deixar de fumar são evidentes, pois nos pacientes que continuam com essa dependência a progressão da DC é mais acentuada e com mais complicações, enquanto os ex-fumadores apresentam uma evolução clínica muito semelhante à dos não-fumadores. Esta mesma ideia é defendida por Carbonnel e colaboradores (Carbonnel et al., 2009). De acordo com estas fontes, o tabaco também condiciona a localização da doença. Deste modo, os fumadores apresentam maior prevalência da doença no íleo e menor no colón.

Em relação aos efeitos nos consumidores passivos, os dados disponíveis são ainda bastantes controversos. No entanto segundo o estudo de Mahid, e colaboradores, que compararam um grupo de crianças com exposição tabágica pré-natal, com um grupo controle, foi demonstrado que as crianças expostas ao fumo apresentavam um risco aumentado de desenvolver DC. O mesmo estudo afirmou que, crianças expostas ao fumo do tabaco dos pais e/ou dos restantes membros da família, durante a infância, também apresentavam um risco aumentado em desenvolver DC (Mahid et al., 2007; Lakatos et al., 2007).

Apesar de todos estes dados, o fator tabaco isolado não pode explicar a crescente incidência da DC em todo o mundo uma vez que, o continente africano e asiático que representam regiões fortemente fumadoras apresentam baixa incidência da DC e, em

contrapartida países como o Canadá e a Suécia que consomem menos tabaco apresentam altas incidências (Cosnes et al., 2011; Qin, 2012).

2.1.2 Dieta

As doenças localizadas no TGI facilmente levantam a suspeita de que determinados alimentos podem causar ou contribuir para o processo inflamatório. Deste modo, numerosos estudos procuram vincular a dieta à DC, mas geralmente são inconclusivos (Hanauer, 2006).

Existe alguma evidência de que o consumo excessivo de carboidratos refinados, produtos lácteos, fast-food e gordura, margarina, e alimentos industrializados contendo aditivos alimentares, assim como a baixa ingestão de fibras, contribuem para aumentar o risco para a DC. Todavia nenhum deles foi provado como sendo agente causador (Karlinger et al., 2000; Qin, 2012).

2.1.3 Apendicectomia

A relação entre a apendicectomia e a DC tem sido debatida. Segundo alguns autores, o risco relativo para desenvolver a doença é significativamente elevado no primeiro ano após a cirurgia. Posteriormente este risco desaparece de forma gradual (Carbonnel et al., 2009; Hovde e Moum, 2012).

2.1.4 Outros Fatores

Outros fatores ambientais que têm sido investigados, no sentido de compreender a relação causa-efeito com a DC, são os contraceptivos orais e os AINEs.

No primeiro caso, embora a relação causal direta seja desconhecida, as mulheres que tomam contraceptivos orais apresentam o dobro do risco de poder vir a desenvolver DC do que as que não utilizam este tipo de contraceção (Karlinger et al., 2000; Danese e Fiocchi, 2006; Carbonnel et al., 2009).

Relativamente aos Anti-Inflamatórios Não Esteroides (AINEs) existe uma clara associação com a DC, uma vez que estes fármacos aumentam a probabilidade de ocorrer recidivas nos pacientes em remissão clínica. A teoria proposta para explicar este fenómeno considera que a agregação de neutrófilos e a contração do músculo liso causada pelos AINEs conduz à isquemia focal na parede intestinal, ou seja a uma insuficiência da perfusão sanguínea para suprimir as necessidade metabólicas que, por sua vez pode conduzir à inflamação e ulceração da mucosa, e ao aparecimento de

defeitos na mucosa, nomeadamente ao aumento da permeabilidade a fatores nocivos, tais como, os ácidos biliares e os microrganismos patogénicos luminiais, incluindo as suas toxinas (Karlinger et al., 2000; Danese e Fiocchi, 2006; Sartor, 2006).

Em suma, ainda que a evidência epidemiológica que liga os fatores ambientais à DC seja bastante consistente, acredita-se que nenhum destes agentes, por si só, possa causar diretamente a doença, sendo fundamental a existência de predisposição genética (Danese e Fiocchi, 2006).

2.2 Predisposição e Suscetibilidade Genética

A Doença de Crohn é uma doença poligénica complexa. Deste modo, não existe um único gene responsável pelo aparecimento da doença, mas sim um conjunto de genes que podem aumentar a suscetibilidade do hospedeiro desenvolver a doença. Este aumento de suscetibilidade verifica-se apenas quando o portador interage com fatores ambientais como a alimentação, o tabagismo, a flora bacteriana e eventuais patogéneos (Lakatos et al., 2006; Yamamoto-Furusho, 2007).

A evidência de uma contribuição genética foi suportada, durante um longo período de tempo, por diversos estudos epidemiológicos que indicavam a existência de um padrão de agregação familiar (Hanauer, 2006; Stappenbeck et al., 2011; Tsianos et al., 2012).

Contudo, recentemente, novos estudos têm enfatizado o papel da suscetibilidade do hospedeiro no desenvolvimento da DC, com a identificação de vários loci de risco, a maioria dos quais codificam proteínas envolvidas em importantes funções biológicas como a regulação imunitária, homeostasia intestinal, defesa dos hospedeiros contra microrganismos e manutenção da integridade da barreira epitelial (Lapaquette et al., 2012a; Tsianos et al., 2012).

Dos vários genes relacionados com a DC apenas o gene *NOD2/CARD15* tem sido associado, de uma forma consistente, a um significativo aumento da suscetibilidade dos indivíduos para esta patologia (Vavricka e Rogler, 2009). Mais recentemente, novas descobertas em polimorfismos dos genes *ATG16L*, *IL23R* e *IRGM* levam a suspeitar que poderão estar envolvidos na etiologia da DC (Tsianos et al., 2012; Naser et al., 2012).

2.2.1 NOD2/CARD15

Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein 2 (NOD2), também conhecido por *Caspase Activation Recruitment Domain family member 15 (CARD15)* foi o primeiro gene identificado cujas mutações aumentam a suscetibilidade para a DC. Em 2001 foi descoberta esta associação e, desde então, um vasto número de autores têm confirmado a sua relação (Sartor, 2006; Lewis et al., 2007; Cho, 2008; Vavricka e Rogler, 2009; Tsianos et al., 2011; Biswas et al., 2012; Naser et al., 2012).

O gene *NOD2/CARD15*, localizado no cromossoma 16, é responsável por codificar uma proteína que recebe o mesmo nome, proteína NOD2, expressa nos monócitos, macrófagos, células dendríticas, células de Paneth e células epiteliais intestinais. Da sua constituição fazem parte três domínios principais, representados na figura 3 (Lakatos et al., 2006, Tsianos et al., 2012, Naser et al., 2012).

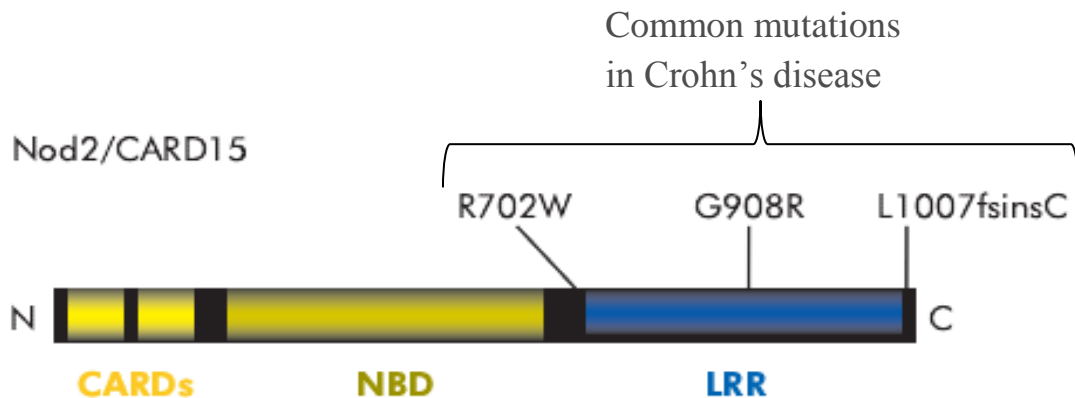


Figura 3: Representação esquemática da proteína NOD2/CARD15, que contém junto à porção N-terminal dois domínios de ativação e recrutamento de caspase (CARD), seguido de um domínio de ligação a nucleótidos (NBD) e, por fim, junto à porção C-terminal uma região rica em repetições de leucina (LRR). Nesta última região foram identificadas três mutações que aumentam a suscetibilidade para a Doença de Crohn (adaptado de: Cario, E., 2005).

A proteína NOD2/CARD15, que desempenha um papel fundamental no sistema imune inato, é membro de uma família de recetores, localizados no citoplasma, conhecidos por recetores “NOD-Like” (NLRs). Juntamente com a família dos recetores “Toll-Like” (TLRs), que se localizam preferencialmente na superfície celular, constituem os recetores de reconhecimento de padrões moleculares (PRRs) (Cario, 2005). Ambas as classes de PRRs (NLRs e TLRs) estão envolvidas na deteção de microrganismos potencialmente nocivos, através do reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos - derivado do inglês Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs)-seguido da iniciação de uma reação de defesa que pode, por vezes, culminar numa resposta inflamatória (Vavricka e Rogler, 2009, Hruz e Eckmann, 2011, Lauriola et al., 2011, Yamamoto e Ma, 2009).

A região na porção C-terminal, rica em repetições de leucina (LRR - derivado do inglês Leucine Rich Repeat) é a responsável pelo reconhecimento intracelular de produtos bacterianos de que é exemplo o dipéptido de muramilo (MDP – derivado do inglês muramyl dipeptide) (Lakatos et al., 2006; Tsianos et al., 2012; Naser et al., 2012).

O reconhecimento do MDP, produto bacteriano derivado do peptidoglicano que é um constituinte da parede celular das bactérias gram-positivas e gram-negativas, vai desencadear uma resposta inflamatória através da ativação do fator de transcrição nuclear Kappa B (NF- κ B), que culminará com a eliminação do invasor microbiano (Sartor, 2006; Yamamoto-Furusho, 2007).

Existem três polimorfismos, a nível do gene *NOD2/CARD15*, associados á Doença de Crohn: Arg702Trp (R702W), Gly908Arg (G908R) e L1007fsinsC (3020insC) (Yazdanyar et al., 2010). Outras mutações mais raras foram também identificadas, porém, num pequeno número de indivíduos com DC (Lewis et al., 2007, Biswas et al., 2012).

Diversos estudos de análises genótipo-fenótipo têm sido realizados com o objetivo de avaliar a possibilidade do impacto destas mutações nas várias características clínicas da Doença de Crohn. Assim sendo, alguns autores revelam uma significativa associação entre os principais polimorfismos do gene *NOD2/CARD15* com a idade precoce de início da doença, localização predominantemente a nível do íleo e com um aumento da incidência do fenótipo fibroestenótico (Abreu et al., 2002; Cario, 2005; Vavricka e Rogler, 2009).

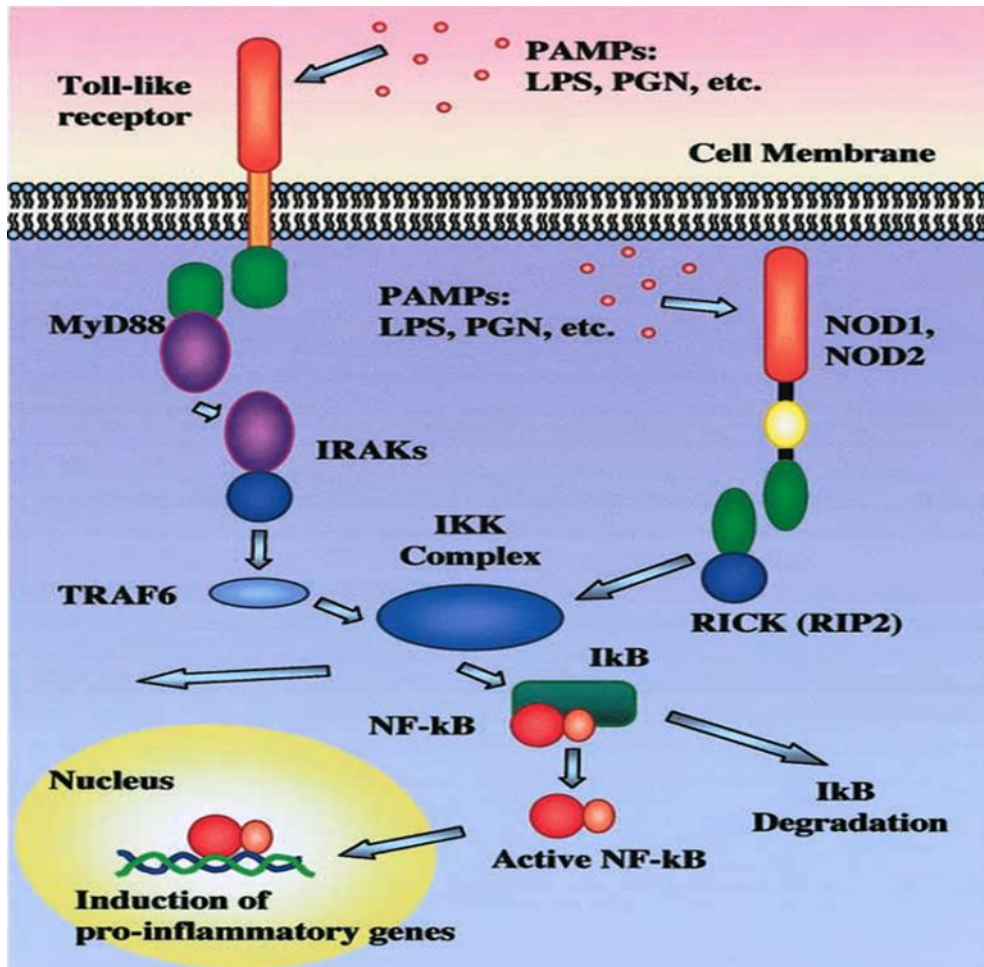


Figura 4: Ativação do fator NF-κB após o reconhecimento dos componentes bacterianos pelos recetores Toll-like e NOD2/CARD15 (adaptado de Bonen, D.K. e Cho, J.H., 2003).

2.2.2 ATG16L1

Durante os últimos anos, avanços na pesquisa genética, permitiram demonstrar a associação existente entre o gene *ATG16L1* (*autofagia relacionado 16-like 1*) e a Doença de Crohn.

O gene *ATG16L1* está localizado no cromossoma 2 e codifica uma importante proteína envolvida na formação dos autofagossomas durante um processo denominado autofagia (Hruz e Eckmann, 2011; Plantinga et al., 2011).

A autofagia é um processo de degradação intracelular em que os componentes citoplasmáticos são sequestrados no interior de vesículas e entregues aos lisossomas, onde se segue a degradação (Lauriola et al., 2011). Este é um mecanismo crítico para a manutenção da homeostasia intracelular na medida em que captura e destrói organelos e proteínas danificadas, assim como, previne a acumulação anormal de agregados de proteínas (Hruz e Eckmann, 2011). Além disso, esta via é ativada perante diferentes formas de stress metabólico e desempenha um importante papel na apoptose. Publicações mais recentes têm destacado o papel da autofagia na imunidade inata pois trata-se de um processo crucial na defesa do hospedeiro contra agentes patogénicos bacterianos, parasitários e virais (Naser et al., 2012; Gersemann et al., 2012).

Vários estudos genómicos de associação mostram que um polimorfismo T300A está associado a um aumento da suscetibilidade para a DC (Ramjeet et al., 2010). Esta mutação, que resulta da substituição do aminoácido treonina pela alanina na posição 300 da proteína, conduz a uma disfunção no processo de autofagia e a um subsequente decréscimo na depuração dos agentes patogénicos, permitindo a sua proliferação. Este fenómeno pode alterar a flora normal e desencadear uma resposta do sistema imunitário desadequada, conduzindo ao quadro inflamatório característico da DC (Cheng et al., 2010; Hruz e Eckmann, 2011).

2.2.3 IRGM

O gene *Immunity-related GTPases family M (IRGM)*, localizado no cromossoma 5q33.1, codifica uma proteína que pertence à família das Guanosina Trifosfatases p 47 (GTPases), responsáveis por desempenhar um papel crucial no sistema imunitário. Estas proteínas estão envolvidas no processo de autofagia que constituiu um dos mais poderosos mecanismos de resistência inata contra os patógenos intracelulares (Brest et al., 2010; Lapis, 2010).

Os seres Humanos são portadores de apenas dois genes *IRG* – *IRGC* e *IRGM* – mas, somente, este último tem um papel relevante na defesa do hospedeiro (Massey e Parkes, 2007; Kabi et al., 2012).

Em células não-infetadas, as IRGM encontram-se no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi. Após a infecção, estas proteínas deslocam-se para a membrana

plasmática e fundem-se com o fagossoma onde permanecem associadas ao agente patogénico fagocitado. De seguida as IRG recrutam maquinaria autofágica para promover a degradação lisossomal e, desta forma, proteger o organismo contra uma eventual infecção (Deretic, 2012; Deretic, 2010; Brest et al., 2010; Lapaquette et al., 2012a).

À semelhança do gene *ATG16L1* mencionado anteriormente, o *IRGM* apresenta alguns polimorfismos que estão altamente correlacionados com o risco de desenvolvimento de DC (Massey e Parkes, 2007; Kabi et al., 2012).

Contudo alguns estudos demonstram que estes SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) não resultaram numa alteração na sequência de aminoácidos mas numa deleção da região promotora das IRGM. Este facto traduz-se numa diminuição da expressão IRGM que compromete o controlo da replicação intracelular das bactérias levando ao desencadeamento do processo inflamatório característico da Doença de Crohn (Lapaquette et al., 2010; Kabi et al., 2012).

2.2.4 IL-23R

O recetor da interleucina-23 é formado por uma subunidade IL-12R β 1, que compartilha com o recetor da IL-12, e por uma subunidade específica. O gene *IL-23R* está localizado no cromossoma 1 e é responsável por codificar uma proteína que recebe o mesmo nome. Esta é altamente expressa na membrana celular das células T de memória, assim como em outras células que fazem parte do sistema imunitário, tais como as NK (Natural Killer), os monócitos, os macrófagos e as células dendríticas. Todas estas células identificam substâncias estranhas e patógenos, protegendo o organismo contra possíveis infeções (McGovern e Powrie, 2007; Stappenbeck et al., 2011; Naser et al., 2012).

O IL-23R interage com a interleucina-23 (IL-23), uma citocina responsável por regular a atividade das células T, e a sua interação desempenha um importante papel na resposta inflamatória contra a infecção por bactérias e vírus (Naser et al., 2012).

A IL-23 compreende a subunidade IL12p40, que é comum com a IL-12, e uma outra subunidade, a IL23p19. Contudo apesar da IL-23 e a IL-12 apresentarem semelhanças estruturais e, até mesmo biológicas, desempenham funções distintas. Enquanto que a IL-

12 está envolvida na diferenciação de células T naïve em linfócitos Th1 e na subsequente produção de interferão gama (IFN- γ – derivado do inglês Interferon gamma), a IL-23 medeia a atividade pró-inflamatória através da ativação dos linfócitos Th17. Tem sido relatado que a IL-23 poderá ser o regulador chave na diferenciação de linfócitos Th17 a partir das células T de memória (Tsianos et al., 2012; Stappenbeck et al., 2011; Naser et al., 2012).

Os linfócitos TH17 são um subconjunto distinto de linfócitos T auxiliares que produzem principalmente IL-17 e, em menor grau, IL-6 e fator de necrose tumoral α (TNF- α - derivado do inglês Tumor Necrosis Factor alpha) (Naser et al., 2012). A IL-17 constitui uma importante citocina durante a inflamação uma vez que estimula a produção de diversos mediadores inflamatórios e quimiocinas, contribuindo, desta forma, para a defesa do hospedeiro contra bactérias, particularmente em superfícies mucosas e favorecendo o recrutamento de neutrófilos ao local da inflamação (McGovern e Powrie, 2007).

De acordo com alguns estudos, indivíduos portadores da Doença de Crohn apresentam níveis aumentados de ambas as citocinas, IL-23 e IL-17, tanto na mucosa intestinal como no soro, devido a uma desregulação do mecanismo inflamatório característico das DII (Fujino et al., 2003; Naser et al., 2012). Nesse sentido, pensa-se que o uso de anticorpos anti-IL-23p40 poderá constituir uma opção terapêutica promissora, para o tratamento destes doentes, pois inibem a produção de IL-23 e IL-17 nas células da lâmina própria (Naser et al., 2012).

Recentemente foi descoberta uma associação entre os polimorfismos no gene IL23R e a DC. De entre os vários polimorfismos identificados, o rs11209026 é aquele que apresenta a associação mais significativa e é responsável por conferir proteção contra a Doença de Crohn (Cho, 2008; Vavricka e Rogler, 2009; Stappenbeck et al., 2011). Esta característica pode ser mesmo, futuramente, explorada no sentido de criar uma abordagem farmacológica que imite o efeito do polimorfismo (Naser et al., 2012).

3. O Papel dos Microrganismos na Doença de Crohn

No momento do nascimento, o intestino humano é estéril. Porém a colonização, por inúmeras espécies, inicia-se imediatamente após o nascimento com o desenvolvimento de uma flora comensal caracterizada por perfis bacterianos únicos e uma alta variação interindividual (Sekirov et al., 2010; Comito e Romano, 2012).

A comunidade microbiana intestinal representa um ecossistema diversificado, complexo e dinâmico que compreende um vasto número de espécies bacterianas diferentes (Comito e Romano, 2012). A sua concentração e complexidade aumentam do estômago para o colón, onde são atingidas as mais elevadas concentrações de microrganismos (Sartor, 2008; Duerkop et al., 2009; Sekirov et al., 2010).

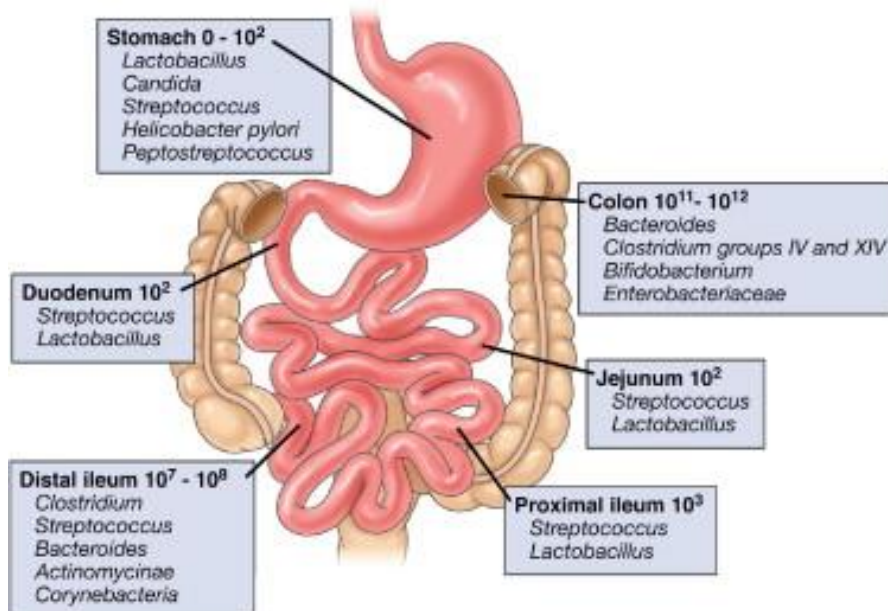


Figura 5: Composição e concentração das principais espécies bacterianas distribuídas pelos diferentes segmentos do trato gastrointestinal (adaptado de Sartor, R.B., 2008).

3.1 Microflora Intestinal

A composição da flora intestinal é dominada por dois filos: Firmicutes e Bacteroidetes. Estes grupos são constituídos pelo *Clostridium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e várias

espécies de Bacteroidetes, incluindo *B. fragilis*, *B. ovatus*, respetivamente (Sartor, 2008; Neuman e Nanau, 2012).

As restantes bactérias intestinais, que representam menos de 10% da população total, pertencem ao género Proteobacteria, da qual faz parte a *Escherichia coli*; Actinobacteria, que inclui a *Bifidobacterium*; Fusobacteria, Verrucomicrobia, e Cianobacteria (Duerkop et al., 2009).

Nos indivíduos saudáveis as bactérias comensais desempenham um papel primordial:

- Na manutenção da integridade do epitélio;
- No adequado desenvolvimento do sistema imunitário;
- Na limitação da infecção por agentes patogénicos.

Relativamente a este último ponto, dois fatores distintos contribuem para esta função protetora. Numa fase inicial, a microbiota pode bloquear o crescimento do patógeno e, portanto, interferir com a infecção logo desde o início, através da supressão de nutrientes e síntese de bacteriocinas. Por outro lado, a microflora comensal pode estimular as defesas imunológicas do hospedeiro, na secreção de péptidos antimicrobianos e prevenir uma eventual infecção (Duerkop et al., 2009; Stecher e Hardt, 2011; Comito e Romano, 2012).

Em troca estes microrganismos beneficiam da relação com o hospedeiro, por habitar num ambiente protegido e rico em nutrientes. Desta forma, estabelece-se uma simbiose mutuamente benéfica entre o hospedeiro e a população microbiana (Duerkop et al., 2009).

Apesar da contribuição crucial para o metabolismo do ser humano, a carga microbiana que se faz sentir no intestino pode constituir um sério desafio para a saúde de um hospedeiro geneticamente predisposto para a DC, num contexto de desregulação imunitária.

O envolvimento microbiano no desenvolvimento da DII é apoiado por um conjunto de evidências, designadamente:

- Os sintomas clínicos da DC melhoram quando os níveis de bactérias luminiais diminuem após lavagens intestinais, ou pela administração de antibióticos de largo espectro de ação (Barnich e Darfeuille-Michaud, 2007; Sartor, 2008).

- A exposição pós-operatória, do íleo terminal, ao conteúdo luminal está associada a um agravamento da inflamação, e o desvio do fluxo fecal está relacionado com a melhoria (Barnich et al., 2010).
- Nos modelos animais germ-free não se observa inflamação intestinal. Após a colonização por bactérias comensais verifica-se imediatamente sinais de patogenicidade (Sartor, 2008).
- Os dois principais locais onde se observam as lesões características da DC, que são o íleo e o cólon, coincidem com as regiões do intestino com maior densidade de microrganismos (Lapaquette et al., 2012a).

Estudos da composição bacteriana luminal de pacientes com DC, revelam um crescente aumento de bactérias nocivas das quais fazem parte determinadas estirpes de *Escherichia coli* e, uma redução no número e na biodiversidade de membros do Firmicutes e Bacterioides. Alguns autores destacam, de um modo particular, a redução do *Faecalibacterium prausnitzii* na mucosa ileal (Sokol et al., 2008; Carvalho et al., 2009; Friswell et al., 2010). Trata-se de uma bactéria com propriedades anti-inflamatórias, cuja diminuição está relacionada com a recorrência pós-operatória em indivíduos com DC. Esta alteração na microflora intestinal é designada por disbiose. Este fenómeno induz a quebra do equilíbrio entre as espécies comensais e as espécies patogénicas, contribuindo para a criação de um ambiente pró-inflamatório, e para o desenvolvimento de inflamação intestinal crónica em indivíduos suscetíveis (Sartor, 2008; Lapaquette et al., 2012a).

3.2 Patogénios Específicos

Além da disbiose, alguns microrganismos têm sido apontados como possíveis agentes na patogénese da Doença de Crohn, nomeadamente *Chlamydia pneumoniae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Yersinia* (Lakatos et al., 2006; Neuman e Nanau, 2012). Todavia, apenas o *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP) e a *Escherichia coli* aderente-invasiva prevalecem no centro das atenções da comunidade científica (Lapaquette et al., 2012a; Comito e Romano, 2012).

3.2.1 *Mycobacterium avium paratuberculosis*

O MAP foi o primeiro agente suspeito de estar envolvido na etiologia da Doença de Crohn, e é aquele que mais tem sido alvo de investigação no sentido de esclarecer a sua

relação com esta doença (Karlinger et al., 2000). Trata-se de uma micobactéria responsável pela Doença de Johne, uma ileíte granulomatosa crónica em ruminantes, que se assemelha estreitamente à DC (Lakatos et al., 2006; Barnich e Darfeuille-Michaud, 2007).

De facto o MAP tem sido detetado com mais frequência nos indivíduos com DC do que no grupo controlo, sendo eles pacientes com CU ou indivíduos saudáveis, recorrendo a técnicas de cultura e a PCR (“Polymerase Chain Reaction”). Este organismo foi igualmente identificado no tecido lesionado, sangue e leite materno de doentes de Crohn (Barnich e Darfeuille-Michaud, 2007).

Em contrapartida, outros estudos questionam o papel do MAP na etiologia da DC, o que gera bastante controvérsia em torno deste microrganismo (Sartor, 2008). Comito e Romano (2012) relatam que a prevalência de MAP nos pacientes com DC, em vários países do mundo, oscila entre os 0% e 100% (Comito e Romano, 2012). Sartor et al (2005) salienta a ausência de respostas terapêuticas aos antibióticos frequentemente utilizados nas infeções por *Mycobacterium*, como é o caso da rifampicina, etambutol e isoniazida (Sartor, 2005). Para evitar possíveis resistências, Selby e seus colaboradores, utilizaram uma combinação terapêutica de claritromicina, rifabutina e clafazimina e os resultados obtidos foram os mesmos, ou seja, ausência de resposta terapêutica (Selby et al., 2007). Num outro estudo, recorrendo á técnica de ELISA, não se detetou qualquer diferença entre o soro de pacientes com DC e do grupo controlo, relativa aos níveis de anticorpos para o MAP (Bernstein et al., 2004).

Alguns fatores que podem condicionar uma possível associação entre MAP e a DC são a presença de uma baixa carga bacteriana (infecção paucibacilar), o crescimento lento e a dificuldade de deteção, uma vez que o MAP pode assumir um fenótipo esferoplástico que não cora pela técnica Ziehl-Neelsen (Rosenfeld e Bressler, 2010). Deste modo, ainda não está completamente esclarecido o papel desta micobactéria na Doença de Crohn.

Outro microrganismo que tem sido investigado como potencial agente etiológico, impulsionado sobretudo pela investigação de Darfeuille-Michaud, é uma estirpe aderente-invasiva de *Escherichia coli*.

4. *Escherichia coli* Aderente- Invasiva

4.1 Do Comensalismo à Patogenicidade

A *Escherichia coli* é uma bactéria, Gram-negativa anaeróbia facultativa, normalmente presente no trato gastrointestinal de um indivíduo saudável, onde desempenha um importante papel na promoção da estabilidade da flora microbiana luminal e na manutenção da homeostasia intestinal (Rolhion e Darfeuille-Michaud, 2007; Friswell et al., 2010).

Sendo uma bactéria comensal, a *E.coli* coexiste em harmonia com o seu hospedeiro e raramente causa doenças, exceto nos imunodeprimidos ou quando as barreiras gastrointestinais são violadas (Rolhion e Darfeuille-Michaud, 2007; Lapaquette et al., 2010).

Contudo, algumas estirpes foram adquirindo fatores de virulência específicos que aumentam a sua capacidade de adaptação a novos nichos, resultando numa ampla variedade de doenças, inclusive do foro gastrointestinal no ser humano (Rolhion e Darfeuille-Michaud, 2007; Lapaquette et al., 2010; Wine et al., 2010). Entre essas estirpes distinguem-se seis grupos que, atualmente, já se encontram bem definidos e caracterizados: *E.coli* enterohemorrágica; *E.coli* enteropatogénica; *E.coli* enterotoxigénica; *E.coli* enteroagregativa; *E.coli* enteroinvasiva e *E.coli* difusamente aderente (Boudeau et al., 1999; Lapaquette et al., 2010).

Todos estes agentes expressam, para além de toxinas bacterianas que afetam os processos eucarióticos, numerosos fatores de colonização e de aptidão que lhes permitem a adesão e invasão das células hospedeiras (Rolhion e Darfeuille-Michaud, 2007).

Diversos estudos, recorrendo a pacientes com DC, identificaram um aumento do número de *E.coli* que não possuíam os fatores de virulência de qualquer uma das bactérias mencionadas anteriormente (Glasser et al., 2001; Krause et al., 2011; Strober, 2011). No entanto, a estirpe identificada era igualmente virulenta e, ainda, capaz de aderir, invadir e replicar dentro das células epiteliais intestinais (CEI), assim como, sobreviver e replicar no interior dos macrófagos (Darfeuille-Michaud et al., 2004; Martin et al., 2004). Tais características conduziram à proposta de uma estirpe

patogénica: *Escherichia coli* Aderente-Invasiva (Sasaki et al., 2007; Friswell et al., 2010).

Estudos posteriores vieram reforçar a associação entre a AIEC e a Doença de Crohn. A análise da flora bacteriana associada à mucosa ileal revelou a presença de AIEC em 36,4% dos doentes, em comparação com os 6% obtidos a partir do grupo controlo (Darfeuille-Michaud et al., 2004; Rolhion e Darfeuille-Michaud, 2007; Wine et al., 2010). Em amostras do colón verificou-se uma diminuição do número de AIEC, com 3,7% nos pacientes com DC frente a 1,9% do grupo controlo (Barnich e Darfeuille-Michaud, 2007; Friswell et al., 2010).

Esta bactéria é, preferencialmente encontrada nas lesões precoces e nas lesões recorrentes após cirurgia indicando, assim, o seu eventual papel na iniciação da inflamação e não apenas como invasor secundário (Darfeuille-Michaud et al., 2004; Rolhion e Darfeuille-Michaud, 2007). A AIEC estirpe LF82 foi originalmente isolada de uma lesão do íleo de um paciente com DC em França, sendo esta estirpe a mais estudada pelos investigadores (Wine et al., 2010).

Seguiram-se outras evidências que sustentam a associação entre a AIEC e DC. Num estudo, recorrendo à técnica de PCR, foi detetado ADN de *E.coli* em 80% dos granulomas isolados de doentes com DC (Meconi et al., 2007).

Análises serológicas revelaram a presença de anticorpos específicos contra OmpC (derivado do inglês - “outer membrane protein C”) entre 37% - 55% dos pacientes com DC, sendo que esse valor em indivíduos saudáveis é inferior a 5%. Curiosamente a OmpC desempenha um papel fundamental na adesão bacteriana e na invasão do epitélio intestinal (Rolhion e Darfeuille-Michaud, 2007; Sartor, 2008).

A hipótese do envolvimento de uma bactéria invasora na DC foi reforçada pela recente descoberta de que 30% a 35% dos indivíduos com DC expressam uma variante *NOD2/CARD15* que os torna incapazes de restringir a replicação intracelular bacteriana (Comito e Romano, 2012). O recetor *NOD2/CARD15* mutado não conduz à transcrição de mediadores pró-inflamatórios como resposta à invasão bacteriana, permitindo a acumulação de bactérias. Este facto poderá, estar relacionado com a formação dos granulomas e com a ativação de uma resposta imunológica inadequada (Darfeuille-Michaud et al., 2004; Barnich e Darfeuille-Michaud, 2007).

Por último, foi observado que os pacientes com DC apresentam um aumento significativo do número de *E.coli* associadas à mucosa, formando um biofilme sobre a superfície epitelial intestinal. Esta anormal colonização resulta da forte capacidade de adesão bacteriana às células epiteliais intestinais (Barnich et al., 2010).

4.2 Mecanismo de Patogenicidade

4.2.1 Adesão Bacteriana

A adesão bacteriana constitui o primeiro passo para a patogenicidade dos organismos envolvidos nas DII. É através deste processo que as bactérias colonizam o epitélio intestinal e, simultaneamente, resistem à remoção mecânica provocada pela motilidade intestinal (Rolhion e Darfeuille-Michaud, 2007; Barnich et al., 2010).

A comparação das propriedades de adesão da *E.coli* ileal, isolada de indivíduos com DC e controlos, revelam que na DC aproximadamente 80% das estirpes são aderentes, enquanto o grupo controlo apresenta uma percentagem inferior a 30% (Rolhion e Darfeuille-Michaud, 2007).

Além disso, verificou-se que as *E.coli* associadas à DC são capazes de aderir a várias linhas celulares humanas, nomeadamente Hep-2, Caco-2, HTC-8 e Intestino-407 (Barnich e Darfeuille-Michaud, 2007). Nesta última a AIEC LF82 sobreviveu pelo menos vinte e quatro horas sem afetar a viabilidade e a replicação celular (Boudeau et al., 1999).

Nas células do epitélio intestinal de doentes com DC, a expressão anormal de moléculas que atuam como recetores bacterianos representa um fator primordial no processo de adesão bacteriana (Barnich e Darfeuille-Michaud, 2010). De facto, foi detetado que os pacientes com DC, sobretudo quando envolviam lesões no íleo, apresentavam uma sobre-expressão dos recetores CEACAM 5 e 6 (Barnich et al., 2007; Carvalho et al., 2009).

Posteriormente, estudos em ratinhos transgénicos, que expressavam recetores CEACAM humanos, demonstraram que apenas a molécula CEACAM 6 atua como recetor para a adesão e colonização da AIEC (Figura 7), desempenhando assim um

papel chave no desenvolvimento da inflamação intestinal (Barnich et al., 2010; Barnich e Darfeuille-Michaud, 2010; Strober, 2011).

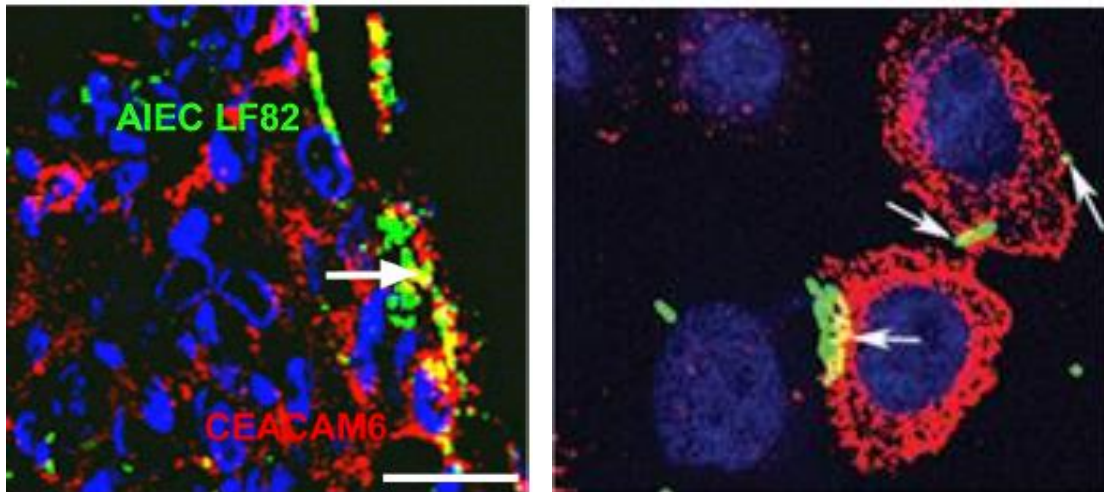


Figura 6: Sobre-expressão do recetor CEACAM 6 nos ratinhos transgênicos infetados com AIEC LF82. A seta aponta para a ligação (zona amarela) entre a bactéria e o recetor. A expressão do CEACAM6 foi detetada utilizando um anticorpo monoclonal anti-CEACAM6 e um anticorpo secundário anti-IgG de rato conjugado Cy3 (vermelho). As bactérias AIEC LF82 foram detetadas através de um anticorpo de coelho anti-O83 e um anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com FITC (verde) (adaptado de Carvalho, F.A., et al., 2009).

Com efeito, o pré-tratamento dos enterócitos isolados de pacientes com DC com um anticorpo monoclonal anti-CEACAM 6 (Figura 8) (Barnich et al., 2007), assim como, a administração intraperitoneal do mesmo anticorpo em ratinhos transgênicos, diminuiu fortemente a colonização da AIEC bem como os sintomas clínicos em cobaias (Carvalho et al., 2009).

Esta sobre-expressão do CEACAM 6 pode ser induzida de duas formas distintas: pela presença da AIEC (como referido anteriormente) ou pela estimulação com citocinas pró-inflamatórias (Barnich et al., 2007; Carvalho et al., 2009). Experiências *in vitro* mostram que os níveis de CEACAM estão aumentados após a estimulação pelo IFN- γ e pelo TNF- α . Este último mediador torna-se especialmente interessante, uma vez que macrófagos infetados com AIEC secretam grandes quantidades de TNF- α o que

contribui para a amplificação do processo inflamatório (Barnich et al., 2007; Barnich et al., 2010).

Assim sendo, as bactérias podem promover diretamente a sua própria colonização pela indução da expressão do recetor CEACAM6 ou, indiretamente pela indução da secreção de mediadores pró-inflamatórios.

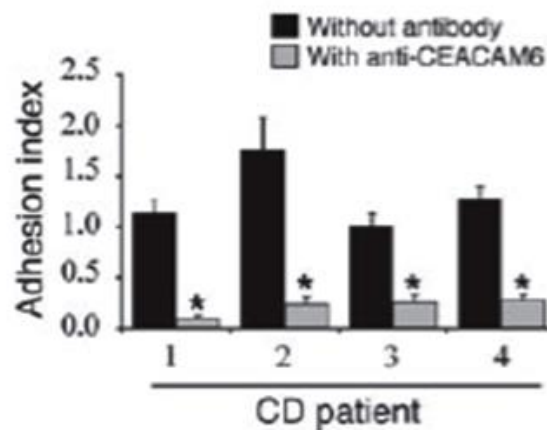


Figura 7: Adesão bacteriana na presença versus ausência do anticorpo anti-CEACAM6 (adaptado de Barnich, N., et al., 2007).

A adesão da AIEC ao CEACAM6 só é possível através da interação destes recetores epiteliais com um tipo de filamento bacteriano, os pili tipo 1, em particular através da subunidade terminal FimH (Dreux et al., 2013).

Os pili tipo 1 são apêndices bacterianos filamentosos, bastante comuns na *E.coli* e em outras bactérias Gram-negativas, que medeiam a adesão bacteriana a vários tipos de células eucarióticas. Este heteropolímero compreende uma subunidade principal FimA e três subunidades menores FimF, FimG e FimH (Boudeau et al., 2001). Este último é responsável pela capacidade de adesão e permite a ligação da bactéria ao ligando terminal de manose localizado nos recetores CEACAM6 da superfície epitelial e das células hospedeiras (Barnich et al., 2007; Dreux et al., 2013).

No sentido de investigar o papel dos pili tipo 1 na colonização bacteriana, Carvalho e a sua equipa, infetaram ratinhos transgênicos que expressavam CEACAM humanos, com uma estirpe mutante de AIEC LF82, que não expressam a subunidade FimH (AIEC LF82- Δ FimH). Decorridos alguns dias após a infeção, verificaram uma diminuição na colonização bacteriana e uma alteração do quadro inflamatório característico da DC. Estes resultados evidenciam o papel essencial dos pili tipo 1 na virulência da AIEC (Carvalho et al., 2009).

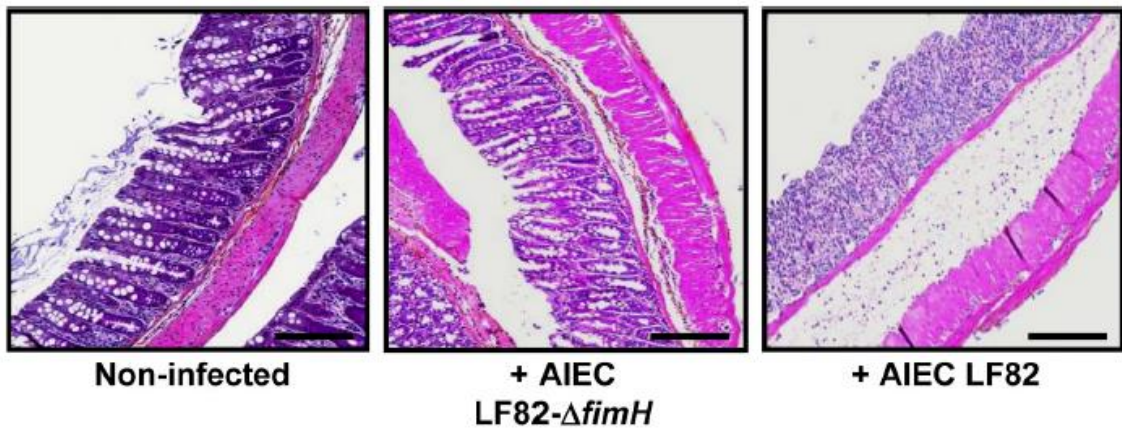


Figura 8: Função dos pili tipo 1 da AIEC LF82 na DC. Estes filamentos bacterianos são essenciais para a colonização intestinal e potenciam o desenvolvimento de danos histológicos, que conduzem a um quadro inflamatório crónico. Imagem obtida através da coloração safranina/eosina/hematoxilina (adaptado de Carvalho, F.A., et al., 2009).

Por outro lado, tem sido demonstrado que a existência de alterações na proteína FimH pode alterar o tropismo da AIEC para as células epiteliais que expressam o recetor CEACAM6. Quatro substituições de aminoácidos foram significativamente associadas com as AIEC isoladas de doentes de DC: FimH V84A, N91S, S99N e V140A. Pensa-se que algumas destas mutações podem facilitar a interação da AIEC com os recetores CEACAM6 (Sepahri et al., 2009).

Dreux e a sua equipa realçam, ainda, que a substituição do FimH da AIEC LF82 pelo FimH de uma estirpe não patogénica (*E. coli* K-12) diminui significativamente a

capacidade de colonização intestinal e, conseqüente, a inflamação (Dreux et al., 2013). É possível que, devido ao prolongamento da doença, a AIEC evolua e se adapte para a colonização da mucosa intestinal através da mutabilidade da proteína FimH (Dreux et al., 2013).

4.2.2 Invasão Bacteriana

Através de microscopia eletrônica, foi possível perceber que o processo de invasão, similar ao processo de macropinocitose é dependente de filamentos de actina e do recrutamento de microtúbulos da célula hospedeira e, caracteriza-se pelo alongamento das extensões membranares que circundam as bactérias (Figura 6) nos locais de contacto que permitam a sua entrada (Boudeau et al., 1999). No interior, a AIEC sobrevive e replica-se no citoplasma após a lise do vacúolo endocítico (Boudeau et al., 1999; Darfeuille-Michaud et al., 2004; Barnich e Darfeuille-Michaud, 2007).

Os principais fatores de virulência que participam neste processo são os flagelos que conferem mobilidade bacteriana (Boudeau et al., 2001; Barnich e Darfeuille-Michaud, 2007); os pili tipo 1 que induzem os prolongamentos membranares (Barnich et al., 2003); e o OmpC que regula a expressão de vários fatores de virulência (Rolhion et al., 2007).

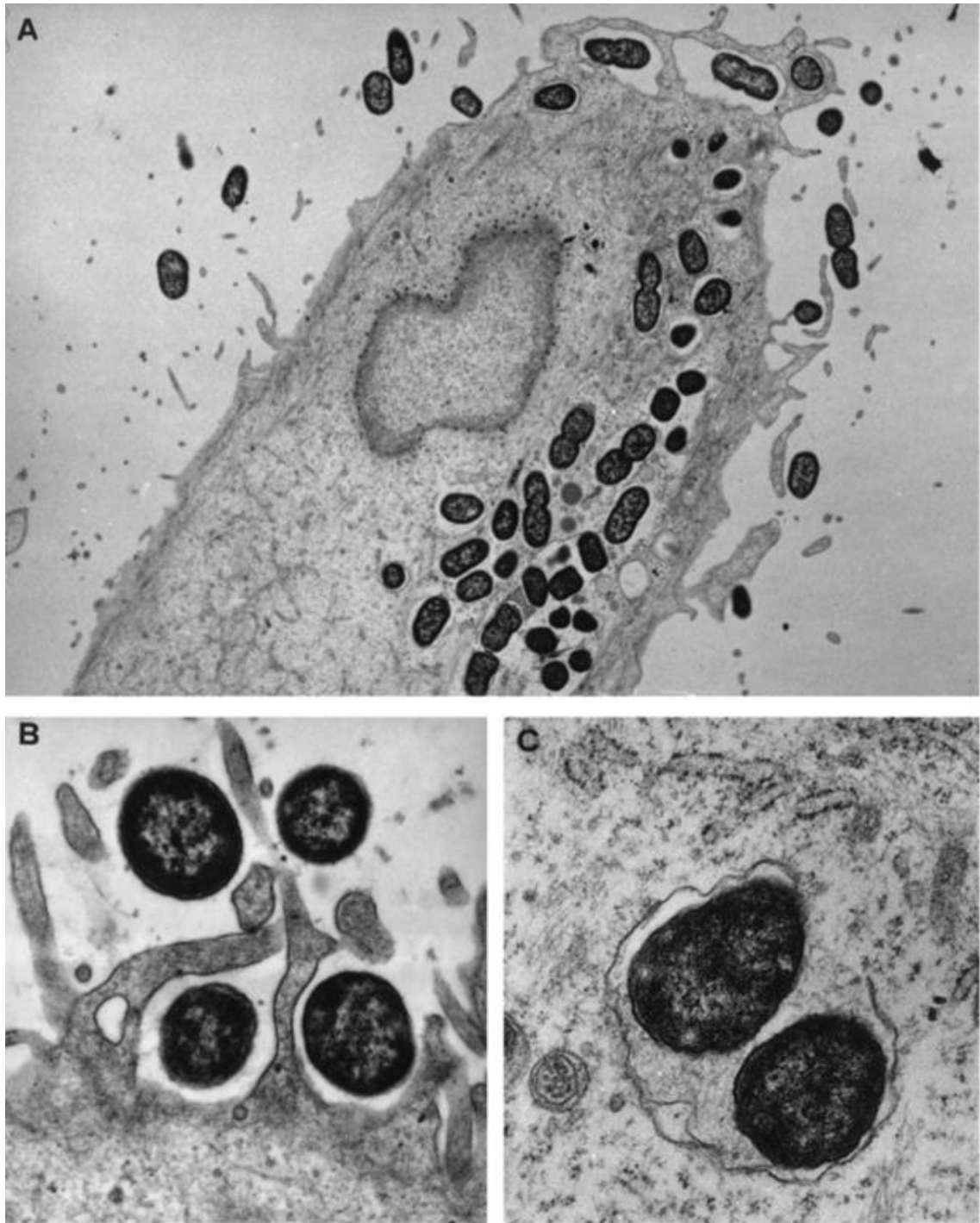


Figura 9: Infecção das células Hep-2 pela AIEC LF82 obtida por microscopia de transmissão eletrônica. Presença de numerosas bactérias após 5h de infecção (A). Internalização da bactéria através de prolongamentos membranares (B). Uma amplificação da imagem permite observar a membrana vacuolar parcialmente lisada indicativo da capacidade da bactéria escapar aos vacúolos de endocitose (adaptado de Boudeau, J., et al., 1999).

4.2.3 Defeitos na Barreira Epitelial Intestinal

A barreira epitelial intestinal representa a principal estrutura física contra a invasão bacteriana (Figura 9). Trata-se de uma monocamada de epitélio colunar simples que se encontra num estado de renovação permanente. Esta estrutura é formada pelo complexo de junção apical (Figura 9), que inclui as junções apertadas e as junções aderentes, responsáveis pela manutenção da integridade do epitélio (Wine et al., 2010).

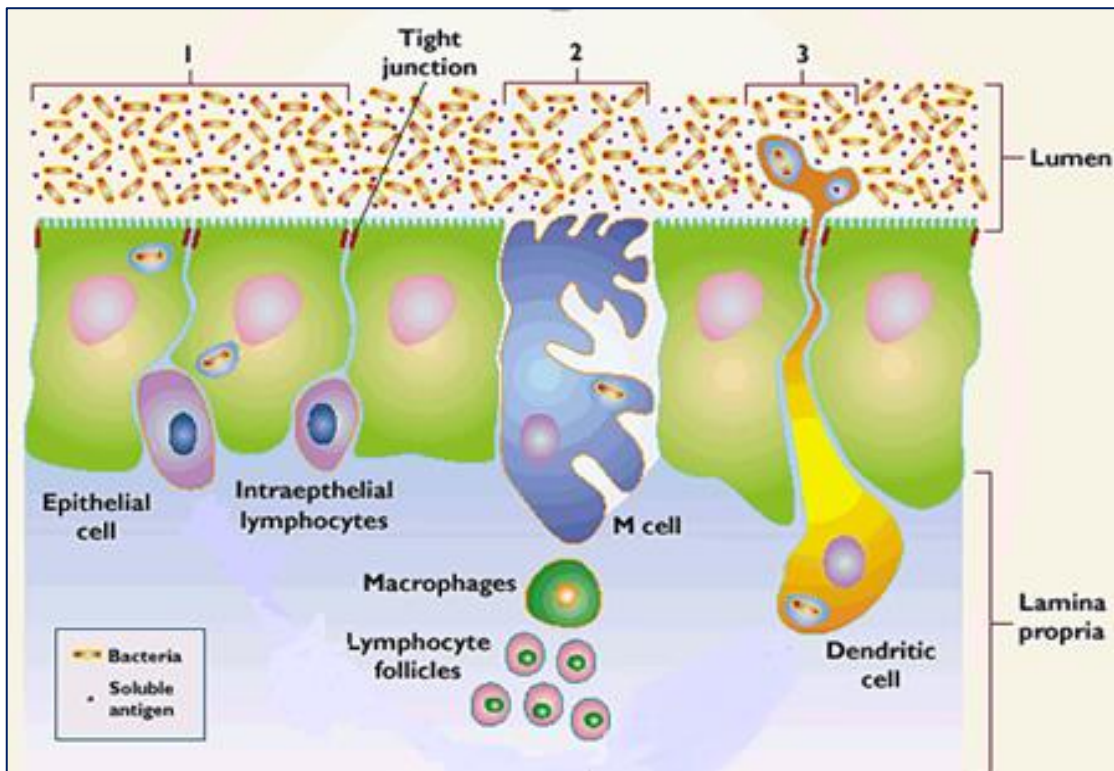


Figura 10: Estrutura da barreira epitelial intestinal. Fonte: “Tight junctions” in the intestinal epithelium. [Em Linha]. Disponível em <<http://www.precisionnutrition.com/research-review-gut-health>>. [Consultado em 30/08/2013].

As barreiras epiteliais são alvos comuns do ataque bacteriano e, portanto, qualquer defeito irá permitir que os antígenos microbianos e luminiais penetrem na mucosa o que poderia, por sua vez, estimular uma resposta pró-inflamatória e conduzir a um cenário de inflamação intestinal (Wine et al., 2010).

A permeabilidade intestinal está significativamente aumentada nos indivíduos com Doença de Crohn (Benjamin et al., 2008). A ruptura da monocamada epitelial é

demonstrada pela diminuição da resistência elétrica transepitelial, pelo aumento da permeabilidade de macromoléculas e pelos defeitos na estrutura morfológica dos complexos de junção apical (Sasaki et al., 2007; Wine et al., 2009).

De modo a caracterizar a capacidade a AIEC perturbar a barreira epitelial intestinal foi utilizado um modelo *in vitro* com dois tipos de células distintas: as células T84 e as células MDCK-1. Quando polarizadas, estas células formam complexos de junção apical, entre elas, conferindo uma elevada resistência elétrica. Este facto torna-as extremamente úteis para os estudos de permeabilidade da barreira às bactérias (Wine et al., 2010).

Após 16h de infecção pela AIEC LF82, verificou-se uma redução, entre 50% a 60%, da resistência transepitelial em ambas as linhas celulares. Além disso foi possível identificar ligeiras alterações morfológicas nas monocamadas de células infetadas com AIEC (Wine et al., 2010).

Zonula occludens-1 (ZO-1) é uma proteína intracelular responsável pela ligação das proteínas das junções apertadas, como por exemplo as ocludinas e claudinas, ao citoesqueleto celular (Wine et al., 2010). A infecção da monocamada celular de MDCK-1 pela AIEC, levou a uma profunda perturbação de ZO-1 e, conseqüentemente, á formação de lacunas na parede epitelial (Figura 11). No entanto as células permaneceram viáveis (Wine et al., 2009).

4.2.4 Células M como Porta de Entrada Bacteriana

Vários agentes infecciosos, em particular as bactérias invasivas como a Shigella, a Salmonella e a Yersinia, atravessam a barreira epitelial através das células Microfold (Células M). Neste sentido, parece altamente provável que a AIEC também recorra a esta via (Friswell et al., 2010; Chassaing et al., 2011).

As células M são células especializadas, localizadas sobre as placas de Peyer, que internalizam macromoléculas e microrganismos e entregando-os ao tecido linfoide subjacente (Srikanth e McCormick, 2008). Estas células diferem das restantes células do epitélio intestinal pelo facto de apresentarem uma borda em escova apical mal organizada, microvilosidades curtas ou inexistentes, invaginações na membrana basolateral onde se alojam linfócitos e macrófagos, e muito pouco glicocálice. Esta

última característica garante o acesso privilegiado aos antígenos luminais e, dessa forma, capta as bactérias presentes na superfície epitelial e transporta-as para o lado basal do epitélio onde é rapidamente montada uma resposta imunitária (Friswell et al., 2010).

Foi recentemente demonstrado que os organismos que expressam pili tipo 1, tais como a *E.coli*, ligam-se às células M através da interação entre a subunidade terminal FimH e a glicoproteína 2 (GP2) presente na membrana plasmática das células M (Chassaing et al., 2011).

A GP2 atua como um recetor bacteriano e a utilização de anticorpos anti-GP2 impede a ligação entre a AIEC e as células M (Chassaing et al., 2011). Estes dados sugerem que a interação FimH-GP2 é crucial para a entrada da AIEC e, conseqüente interação com os macrófagos da lâmina própria (Friswell et al., 2010; Ohno e Hase, 2010). Neste sentido, o bloqueio desta entrada bacteriana poderá representar um potencial alvo para o desenvolvimento de terapias para a DC. Contudo mais pesquisas serão necessárias para elucidar os mecanismos moleculares envolvidos nesta interação (Friswell et al., 2010).

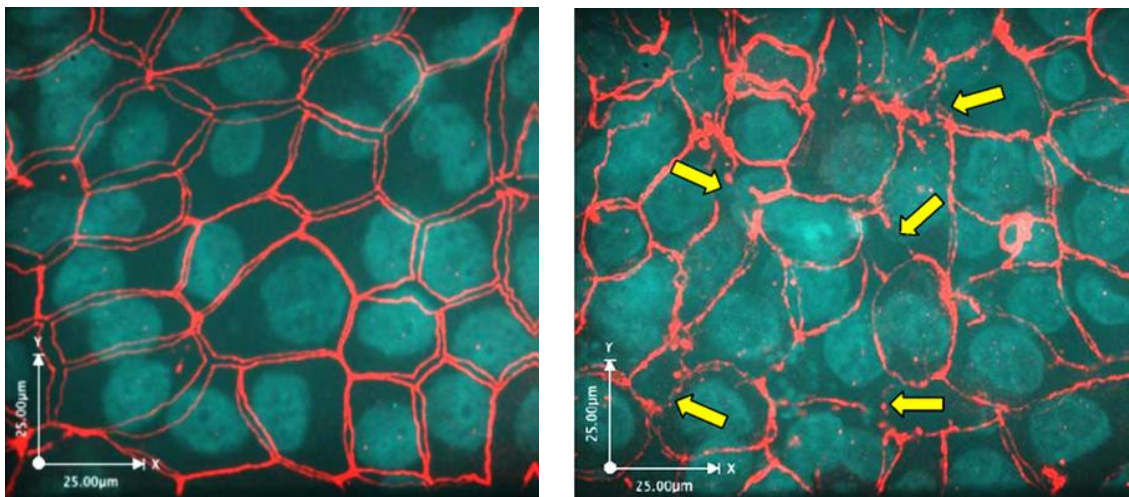


Figura 11: Alteração da estrutura do complexo de junção apical, resultante da infecção por AIEC, responsável pela alteração da permeabilidade intestinal nos indivíduos com Doença de Crohn. As monocamadas foram lavadas com PBS, fixadas e incubadas com o anti-ZO1 (a vermelho), e 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para marcação do núcleo. A infecção AIEC resultou numa alteração da ZO-1, com conseqüente formação de lacunas entre as células (setas) (adaptado de Wine, E., et al., 2009).

4.2.5 Sobrevivência e Replicação no Interior dos Macrófagos

A pesquisa de agentes infecciosos capazes de causar a DC tem-se focado, principalmente, sobre os agentes patogénicos que evoluíram para resistir à fagocitose ou persistir dentro dos macrófagos, e que podem estar envolvidos na estimulação antigénica crónica, que conduz à ativação das células T e dos macrófagos (Rolhion e Darfeuille-Michaud, 2007; Barnich e Darfeuille-Michaud, 2007).

No TGI, os neutrófilos constituem a primeira linha de defesa inata contra as bactérias patogénicas. Após a internalização dos microrganismos invasores e sua destruição pela via fagocítica clássica, os neutrófilos são sinalizados para entrar em apoptose de modo a não provocar danos tecidulares (Chargui et al., 2012).

A autofagia desempenha um papel igualmente importante na proteção das células hospedeiras, pelo que vários agentes patogénicos desenvolveram estratégias para contornar ou até mesmo explorar esta via, como é o caso da AIEC. Os neutrófilos infetados ativam os mecanismos autofágicos para combater a infecção e, ao mesmo tempo, limitar a produção de citocinas pró-inflamatórias (Chargui et al., 2012).

Chargui e os seus colaboradores verificaram que a AIEC é capaz de sobreviver e replicar no interior dos neutrófilos do sangue periférico humano, assim como no interior dos neutrófilos diferenciados de uma linhagem celular mieloide humana (PBL-985), atingindo o número máximo de bactérias intracelulares 5h e 3h após a infecção, respetivamente. No entanto, decorridas 8h após a infecção, este número regressou aos níveis basais. A rápida erradicação bacteriana levantou a questão se este fenómeno resulta da eficaz morte intracelular bacteriana e/ou morte celular dos neutrófilos (Chargui et al., 2012).

A ativação da autofagia foi examinada pela presença de um marcador sensível e específico da autofagia, o LC3-II (derivado do inglês - “microtubule-associated protein 1 light chain 3-II”), importante para a formação do autofagossoma. Após a infecção pela AIEC LF82, verificou-se que a formação de LC3-II foi fortemente induzida nos neutrófilos humanos. Este facto torna evidente que a AIEC induz a autofagia neste tipo de células (Chargui et al., 2012). Após a formação do autofagossoma nas células infetadas ocorre a maturação autofágica, isto é a fusão dos autofagossomas com os lisossomas. Contudo, os autofagolisossomas onde se encontra a AIEC não sofrem degradação lisossomal, o que sugere que estas bactérias são capazes de retardar ou

prevenir a maturação completa dos autofagolisossomas. A acumulação de vesículas autofágicas no citoplasma de ambas as linhas celulares neutrofílicas estudadas (neutrófilos do sangue periférico e linha PBL-985) induziu a morte dos neutrófilos. Isto significa que a AIEC consegue subverter a autofagia e, portanto, os neutrófilos em vez de controlar a infecção sofrem morte celular autofágica induzida pela AIEC (Chargui et al., 2012).

Quando os neutrófilos não conseguem eliminar eficazmente os organismos invasores são chamados ao local os macrófagos para auxiliar nessa tarefa (Barnich e Darfeuille-Michaud, 2007; Smith et al., 2009).

A presença de bactérias no interior dos macrófagos apresenta duas vantagens para este microrganismo. Em primeiro lugar, se os organismos invasores não forem mortos e conseguirem permanecer e replicar no interior destas células, não são detetados pelo sistema imunitário. Em segundo lugar, quando internalizadas as bactérias tornam-se inacessíveis aos neutrófilos (Barnich e Darfeuille-Michaud, 2007). Um exemplo deste tipo de invasores é a AIEC.

De facto, vários estudos, nomeadamente de microscopia eletrónica, têm descrito a capacidade desta bactéria sobreviver e replicar no interior dos macrófagos (Glasser et al., 2001; Bringer et al., 2006; Barnich e Darfeuille-Michaud, 2007).

Glasser, e os seus colaboradores (Glasser et al., 2001), analisaram o comportamento da AIEC LF82 isolada de pacientes com DC após infecção de macrófagos da linha celular murina J774-A1. Nesse estudo, Glasser e a sua equipa observaram a presença de bactérias em pequenos vacúolos, no interior dos macrófagos J774-A1, uma hora após a infecção com a AIEC (Figura 11 A). Depois de oito horas, as células infetadas exibiam fagossomas maiores, alguns dos quais em plena fusão (Figura 11 B). Às vinte e quatro horas, os macrófagos apresentavam um vacúolo proeminente contendo inúmeras bactérias (Figura 11 C). Esta estrutura ocupava a maior parte do compartimento citoplasmático e não alterou a morfologia do núcleo nem da membrana plasmática. Após quarenta e oito horas de infecção, o número de bactérias intracelulares aumentou até 74 vezes, quando comparado com a infecção inicial. E, apesar deste avultado número de bactérias intracelulares, os macrófagos permaneceram viáveis (Glasser et al., 2001).

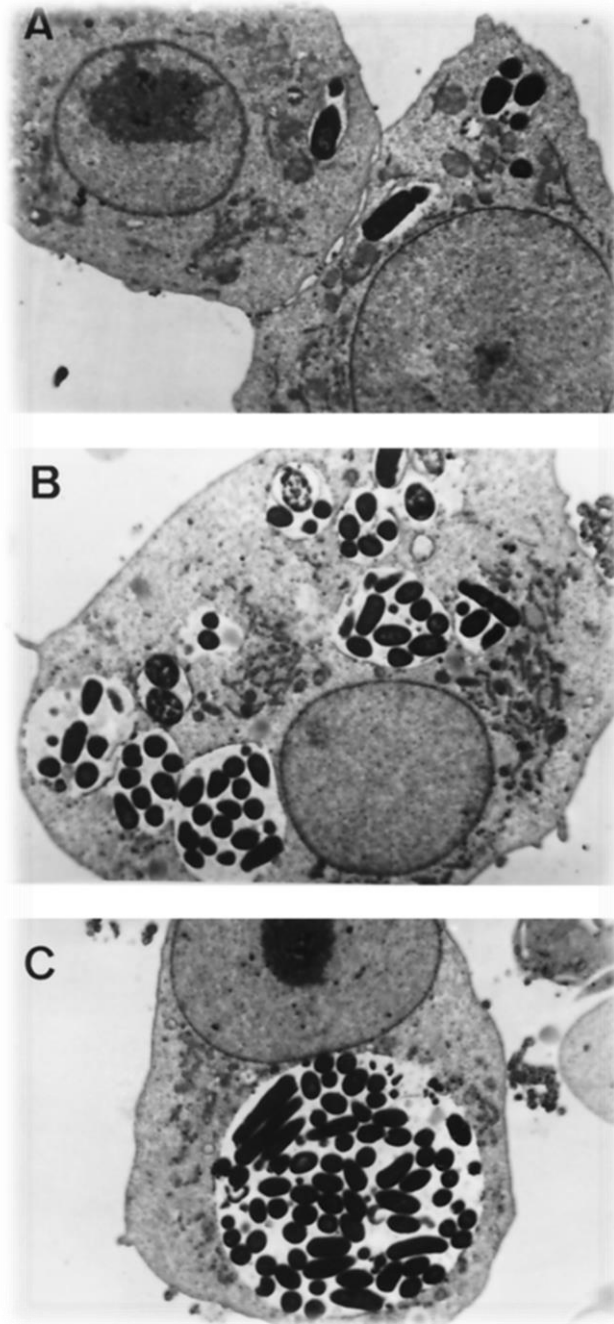


Figura 12: Replicação bacteriana no interior dos macrófagos. (A) Presença da AIEC em pequenos vacúolos uma hora após a infecção. (B) Depois de oito horas visualiza-se o aumento desses mesmos vacúolos (C) Às 244h após a infecção, os macrófagos apresentavam um vacúolo proeminente, resultante da fusão entre eles, contendo inúmeras bactérias (adaptado de Boudeau, J., Barnich, N. e Darfeuille-Michaud, A., 2001).

Desta forma, concluíram que a AIEC pode persistir dentro das células fagocíticas durante um longo período de tempo sem, aparentemente, induzir a morte celular ou qualquer outro dano nos macrófagos infetados (Glasser et al., 2001; Bringer et al., 2006). Os resultados obtidos foram concordantes com outros autores (Darfeuille-Michaud et al., 2004; Rolhion e Darfeuille-Michaud, 2007; Bringer et al., 2006).

Em contraste com a maioria das bactérias invasivas, a AIEC consegue também escapar à via endocítica clássica (Bringer et al., 2006). De facto, para sobreviver num ambiente tão hostil, como é o interior dos fagossomas onde impera o pH ácido e a presença de enzimas hibrolíticas, a AIEC desenvolveu mecanismos de adaptação para os quais a acidez constitui um fator fundamental, ativando a expressão de genes de fatores de virulência (Rolhion e Darfeuille-Michaud, 2007). Os principais fatores de virulência envolvidos na sobrevivência são: o gene *htrA*, que codifica a proteína Stress *HtrA*, essencial para a replicação intracelular; e o gene *dsbA* que codifica a oxiredutase Dsb, essencial para a sobrevivência dentro do fagossoma (Bringer et al., 2006; Barnich e Darfeuille-Michaud, 2007).

Os macrófagos permanecem ativos mesmo ocorrendo a replicação bacteriana, como se pode constatar através da secreção de grandes quantidades do TNF- α . A ativação contínua destas células e, a consequente libertação de TNF- α , podem estar envolvidas na formação de granulomas (Glasser et al., 2001; Rolhion e Darfeuille-Michaud, 2007; Barnich et al., 2010).

4.2.6 Formação de Granulomas

Um dos aspetos histológicos que caracteriza a Doença de Crohn é a presença de estruturas granulomatosas, geralmente encontradas na parede do intestino e nos nódulos linfáticos (Freeman, 2007).

Pensa-se que a AIEC induz a formação de células gigantes multinucleadas, através da agregação e fusão dos macrófagos infetados e subsequente recrutamento de linfócitos circundantes (Figura 12). Estes agregados celulares são bastante idênticos aos granulomas epitelioides (Rolhion e Darfeuille-Michaud, 2007; Meconi et al., 2007).

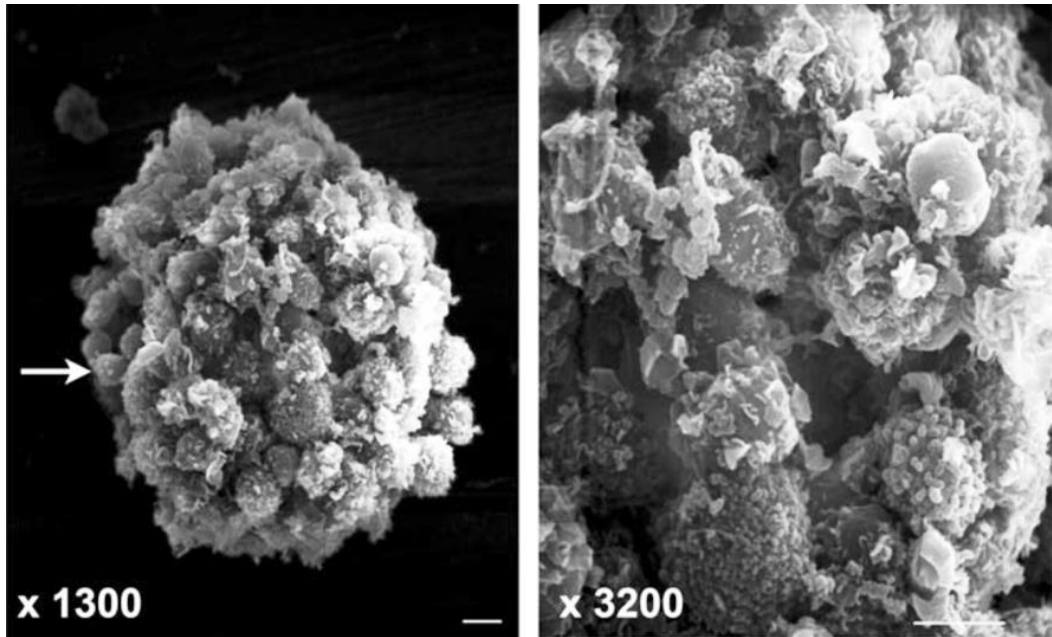


Figura 13: Representação ilustrativa de um granuloma característico na Doença de Crohn. Esta estrutura é composta principalmente por macrófagos, com alguns linfócitos (seta) na periferia (adaptado de Meconi, S., et al., 2007).

Existem várias evidências que sugerem o envolvimento de AIEC na formação destas estruturas:

- Presença de antígenos da AIEC nos granulomas isolados de indivíduos com DC (Rolhion e Darfeuille-Michaud, 2007);
- Detecção de DNA da AIEC em 80% dos granulomas removidos de pacientes com DC (Smith et al., 2009);
- Relatos de doenças em animais que envolvem respostas granulomatosas na presença de *E.coli*. São exemplos a colite granulomatosa no cão de raça boxer ou a Doença de Hjarre nos frangos e perus (Rolhion e Darfeuille-Michaud, 2007).

Meconi e os seus colaboradores investigaram o desenvolvimento de granulomas, *in vitro*, induzido pela AIEC. Para isso utilizaram uma estirpe não patogénica e uma patogénica, a *E.coli* K-12 DH5 α e a *E.coli* LF82, respetivamente. Após sete dias de

incubação de *E.coli* LF82 nas células mononucleares de sangue periférico humano, foi observada a presença de múltiplos agregados celulares (Figura 13). Verificaram ainda que estas estruturas eram maioritariamente compostas por macrófagos e alguns linfócitos (Meconi et al., 2007).

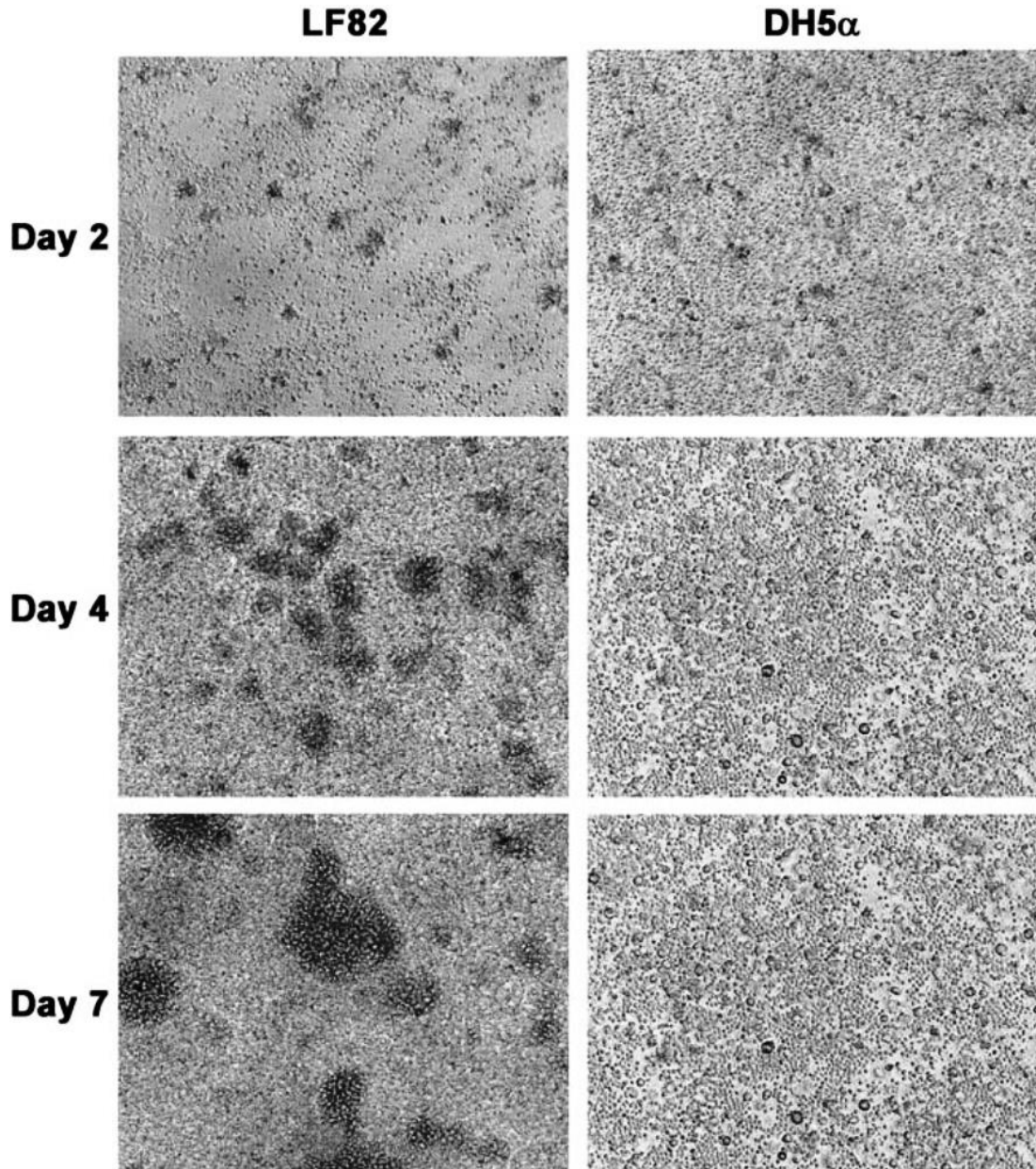


Figura 14: AIEC induz a agregação das células mononucleares do sangue periférico humano *in vitro*. Consegue-se visualizar a presença de estruturas multicelulares no quarto e sétimo dia de estimulação bacteriana. No sétimo dia estas estruturas apresentam grandes dimensões (adaptado de Meconi, S., et al., 2007).

Estes resultados permitiram concluir que a AIEC possui provavelmente fatores de virulência, ainda não identificados, capazes de iniciar um processo inflamatório nos seres humanos através da formação de estruturas granulomatosas (Meconi et al., 2007).

Em suma, o papel da AIEC na iniciação e perpetuação da DC ainda não está totalmente esclarecido, pois apesar dos dados experimentais indicarem um papel na patogênese, ainda não se pode afirmar que a AIEC tenha um papel causal na DC. Sabe-se, no entanto, que estas bactérias são capazes de aderir e invadir as células epiteliais intestinais (Figura 14), assim como penetrar e sobreviver dentro dos macrófagos sem induzir a morte da célula hospedeira (Darfeuille-Michaud et al., 2004). Paralelamente, o aumento da permeabilidade membranar resultante da alteração das junções apicais, poderá potenciar a translocação bacteriana (Wine et al., 2010). Estas propriedades poderão permitir que estes microrganismos atravessem a barreira intestinal e se desloquem para tecidos mais profundos, onde ativam continuamente os macrófagos e induzem a formação de granulomas (Glasser et al., 2001; Barnich e Darfeuille-Michaud, 2007).

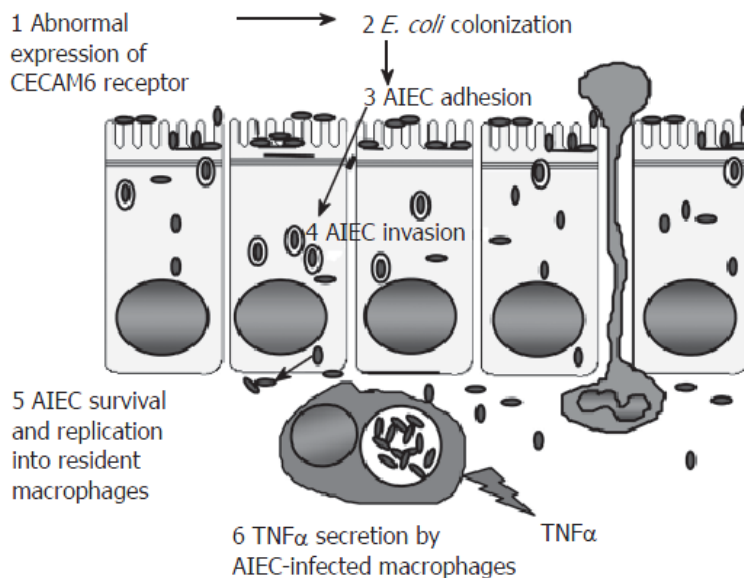


Figura 15: Mecanismo de ação da AIEC nas CEI. A expressão anormalmente aumentada do recetor CEACAM 6 (1) juntamente com alteração da permeabilidade membranar induz a colonização (2), adesão (3) e invasão (4) da AIEC, que desta forma consegue atravessar a barreira epitelial intestinal. Esta bactéria consegue replicar-se e sobreviver dentro dos macrófagos (5) onde induz a secreção do TNF- α (6) (adaptado de Barnich, N. e Darfeuille-Michaud, A., 2007).

4.3 O Papel da AIEC na Autofagia

Para além do estudo realizado em neutrófilos descrito acima, um estudo recente investigou o papel da autofagia na sobrevivência e replicação da AIEC nas células epiteliais. Mais especificamente, os autores investigaram o impacto que os polimorfismos nos genes *ATG16L1* e *IRGM*, presentes em indivíduos com DC, poderiam ter na capacidade de sobrevivência e replicação bacteriana (Lapaquette et al., 2010).

Através deste estudo foi demonstrado que as células que expressam estes polimorfismos apresentam uma capacidade diminuída para eliminar AIEC, não afetando outras estirpes de *E.coli* (Lapaquette et al., 2010).

Num estudo subsequente, o mesmo grupo investigou se os defeitos na autofagia influenciavam o comportamento da AIEC no interior dos macrófagos (Lapaquette et al., 2012b).

Os macrófagos THP-1 foram infetados pela AIEC e a ativação da autofagia foi monitorizada através da deteção da conversão do LC3-I livre o citosol em LC3-II associado ao autofagolisossoma, por Western Blot, utilizando um anticorpo contra LC3-II. Após 30 minutos de infeção, a quantidade de LC3-II estava bastante elevada sugerindo a indução da autofagia pela AIEC. O valor de LC3-II atingiu o pico 1 hora após a infeção seguido por uma diminuição. Paralelamente, verificou-se uma redução no número de bactérias, reflexo da ação dos autofagolisossomas (Lapaquette et al., 2012b).

Contudo, os polimorfismos relacionados com o *ATG16L1* e *IRGM*, que alteram o processo autofágico, ou as variantes no gene *NOD2/CARD15*, que prejudica ao reconhecimento bacteriano e a indução da autofagia, conduzem a um defeito comum: replicação não controlada da AIEC dentro dos macrófagos e a um aumento a secreção de citocinas pró-inflamatórias (Lapaquette et al., 2012b).

III. Perspetivas Futuras / Conclusão

5. Perspetivas Futuras

O aprofundamento do conhecimento sobre as interações específicas entre a AIEC e as células epiteliais intestinais poderão auxiliar na identificação de alvos, subjacentes ao processo infeccioso, que permitam prevenir o desenvolvimento e/ou a progressão da DC. Estudos recentes têm apontado para três áreas promissoras.

Tendo em conta que a DC pode estar associada a um desequilíbrio da microflora intestinal, o uso de probióticos poderá constituir uma nova abordagem terapêutica (Carvalho et al., 2009). Os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, exercem efeitos benéficos na saúde humana. Nesta patologia em concreto, os probióticos poderiam restaurar a microflora indígena desequilibrada e proteger as células dos efeitos adversos dos agentes patogénicos, contrariando o processo inflamatório. Tem sido investigada a eficácia de vários probióticos na DC, como é o caso da *E.coli* Nissle 1917, do *Bifidobacterium*, e do *Lactobacillus* (Ingrassia et al., 2005; Sanders et al., 2013). Em relação a este último, verificou-se que o *Lactobacillus Casei* estirpe DN-114 001 exerce efeitos inibidores na adesão e invasão da AIEC LF82 às células epiteliais intestinais (Ingrassia et al., 2005). Neste sentido, a utilização de probióticos poderá representar uma eficaz terapia preventiva e evita uso de antibióticos que são muitas vezes associados a efeitos gastrointestinais e de resistência bacteriana, o que pode contribuir para o insucesso do tratamento.

Outra estratégia que tem vindo a ser investigada consiste em inibir a adesão da AIEC às células epiteliais intestinais. Foram recentemente desenvolvidos um conjunto de manosídeos sintéticos que se ligam à adesina FimH, impedindo a colonização bacteriana e, todo o processo inflamatório subjacente (Brument et al., 2013). A capacidade destas estruturas para impedir a adesão da AIEC LF82 foi avaliada *in vitro*, nas células intestinais humana T84, e *in vivo*, nos ratinhos transgénicos. Ambos os estudos confirmaram o potencial que estes inibidores FimH poderiam ter no tratamento da DC (Brument et al., 2013).

Por último sabe-se que os polimorfismos relacionados com a autofagia, expressos em indivíduos com DC, resultam em anomalias neste processo e, conseqüentemente, na erradicação bacteriana. Deste modo, a pesquisa de agentes capazes de restituir a autofagia poderiam constituir poderosas ferramentas terapêuticas (Caprilli et al., 2010).

Um estudo recente relata que a indução forçada da autofagia, pela rapamicina, permite aos macrófagos restringir o número de bactérias intracelulares e, dessa forma, atenuar a intensidade da resposta inflamatória (Lapaquette et al., 2012).

Apesar dos grandes avanços que têm sido alcançados nos últimos anos, ainda há uma grande necessidade de conhecimento nesta área, e muitas questões permanecem ainda por esclarecer. Contudo se consideramos o caminho percorrido até agora, assim como próprio desenvolvimento científico e tecnológico, é bem provável que num futuro próximo se consiga desenvolver uma estratégia terapêutica eficaz, de modo a alterar o curso clínico da doença, bem como resolver muitos dos “enigmas” que caracterizam a Doença de Crohn.

IV. Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

- Abreu, M.T., *et al.* (2002). Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*, 123, 679-88.
- Azevedo, L.F., *et al.* (2010). Estimating the prevalence of inflammatory bowel disease in Portugal using a pharmaco-epidemiological approach. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 19, 499-510.
- Barnich, N., *et al.* (2007). CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive E. coli, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J Clin Invest*, 117, 1566-74.
- Barnich, N. e Darfeuille-Michaud, A. (2007). Role of bacteria in the etiopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 13, 5571-6.
- Barnich, N. e Darfeuille-Michaud, A. (2010). Abnormal CEACAM6 expression in Crohn disease patients favors gut colonization and inflammation by adherent-invasive E. coli. *Virulence*, 1, 281-2.
- Barnich, N., Denizot, J. e Darfeuille-Michaud, A. (2010). E. coli-mediated gut inflammation in genetically predisposed Crohn's disease patients. *Pathol Biol (Paris)*.
- Benjamin, J., *et al.* (2008). Intestinal permeability and its association with the patient and disease characteristics in Crohn's disease. *World J Gastroenterol*, 14, 1399-405.
- Bernstein, C.N., *et al.* (2004). Population-based case control study of seroprevalence of Mycobacterium paratuberculosis in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *J Clin Microbiol*, 42, 1129-35.
- Biswas, A., Petnicki-Ocwieja, T. e Kobayashi, K.S. (2012). Nod2: a key regulator linking microbiota to intestinal mucosal immunity. *J Mol Med (Berl)*, 90, 15-24.
- Boudeau, J., Barnich, N. e Darfeuille-Michaud, A. (2001). Type 1 pili-mediated adherence of Escherichia coli strain LF82 isolated from Crohn's disease is involved in bacterial invasion of intestinal epithelial cells. *Mol Microbiol*, 39, 1272-84.
- Boudeau, J., *et al.* (1999). Invasive ability of an Escherichia coli strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect Immun*, 67, 4499-509.
- Brest, P., *et al.* (2010). Autophagy and Crohn's disease: at the crossroads of infection, inflammation, immunity, and cancer. *Curr Mol Med*, 10, 486-502.

- Bringer, M.A., *et al.* (2006). The Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 replicates in mature phagolysosomes within J774 macrophages. *Cell Microbiol*, 8, 471-84.
- Brument, S., *et al.* (2013). Thiazolylaminomannosides As Potent Antiadhesives of Type 1 Piliated *Escherichia coli* Isolated from Crohn's Disease Patients. *J Med Chem*.
- Caprilli, R., Lapaquette, P. e Darfeuille-Michaud, A. (2010). Eating the enemy in Crohn's disease: an old theory revisited. *J Crohns Colitis*, 4, 377-83.
- Carbonnel, F., *et al.* (2009). Environmental risk factors in Crohn's disease and ulcerative colitis: an update. *Gastroenterol Clin Biol*, 33 Suppl 3, S145-57.
- Cario, E. (2005). Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut*, 54, 1182-93.
- Carvalho, F.A., *et al.* (2009). Crohn's disease adherent-invasive *Escherichia coli* colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. *J Exp Med*, 206, 2179-89.
- Chargui, A., *et al.* (2012). Subversion of autophagy in adherent invasive *Escherichia coli*-infected neutrophils induces inflammation and cell death. *PLoS One*, 7, e51727.
- Chassaing, B., *et al.* (2011). Crohn disease--associated adherent-invasive *E. coli* bacteria target mouse and human Peyer's patches via long polar fimbriae. *J Clin Invest*, 121, 966-75.
- Cheng, J.F., *et al.* (2010). T300A polymorphism of ATG16L1 and susceptibility to inflammatory bowel diseases: a meta-analysis. *World J Gastroenterol*, 16, 1258-66.
- Cho, J.H. (2008). Inflammatory bowel disease: genetic and epidemiologic considerations. *World J Gastroenterol*, 14, 338-47.
- Comito, D. e Romano, C. (2012). Dysbiosis in the pathogenesis of pediatric inflammatory bowel diseases. *Int J Inflam*, 2012, 687143.
- Cotran, R. (1996). *Robbins Patologia estrutural e funcional*. 5º ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, pp. 716-718.
- Cosnes, J., *et al.* (2011). Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 140, 1785-94.
- Danese, S. e Fiocchi, C. (2006). Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*, 12, 4807-12.

- Darfeuille-Michaud, A., *et al.* (2004). High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*, 127, 412-21.
- Deretic, V. (2010). Autophagy in infection. *Curr Opin Cell Biol*, 22, 252-62.
- Deretic, V. (2012). Autophagy as an innate immunity paradigm: expanding the scope and repertoire of pattern recognition receptors. *Curr Opin Immunol*, 24, 21-31.
- Dreux, N., *et al.* (2013). Point mutations in FimH adhesin of Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* enhance intestinal inflammatory response. *PLoS Pathog*, 9, e1003141.
- Duerkop, B.A., Vaishnava, S. e Hooper, L.V. (2009). Immune responses to the microbiota at the intestinal mucosal surface. *Immunity*, 31, 368-76.
- Economou, M. e Pappas, G. (2008). New global map of Crohn's disease: Genetic, environmental, and socioeconomic correlations. *Inflamm Bowel Dis*, 14, 709-20.
- Freeman, H.J. (2007). Granuloma-positive Crohn's disease. *Can J Gastroenterol*, 21, 583-7.
- Friedman, S. e Blumberg, R. (2002). Doença inflamatória intestinal. In: Braunwald *et al* (Ed.) Harrison Medicina Interna. 15º ed. Rio de Janeiro, McGraw-Hill, pp. 1779-1971.
- Friswell, M., Campbell, B. e Rhodes, J. (2010). The role of bacteria in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Gut Liver*, 4, 295-306.
- Fujino, S., *et al.* (2003). Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut*, 52, 65-70.
- Gersemann, M., Wehkamp, J. e Stange, E.F. (2012). Innate immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *J Intern Med*, 271, 421-8.
- Glasser, A.L., *et al.* (2001). Adherent invasive *Escherichia coli* strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death. *Infect Immun*, 69, 5529-37.
- Halme, L., *et al.* (2006). Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 12, 3668-72.
- Hanauer, S.B. (2006). Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm Bowel Dis*, 12 Suppl 1, S3-9.
- Hovde, O. e Moum, B.A. (2012). Epidemiology and clinical course of Crohn's disease: results from observational studies. *World J Gastroenterol*, 18, 1723-31.

- Hruz, P. e Eckmann, L. (2011). Innate immune defence: NOD2 and autophagy in the pathogenesis of Crohn's disease. *Swiss Med Wkly*, 140, w13135.
- Ingrassia, I., Leplingard, A. e Darfeuille-Michaud, A. (2005). 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*, 71, 2880-7.
- Kabi, A., et al. (2012). Digesting the genetics of inflammatory bowel disease: insights from studies of autophagy risk genes. *Inflamm Bowel Dis*, 18, 782-92.
- Karlinger, K., et al. (2000). The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Eur J Radiol*, 35, 154-67.
- Krause, D.O., et al. (2011). Complete genome sequence of adherent invasive *Escherichia coli* UM146 isolated from Ileal Crohn's disease biopsy tissue. *J Bacteriol*, 193, 583.
- Lakatos, P.L. (2006). Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: up or down? *World J Gastroenterol*, 12, 6102-8.
- Lakatos, P.L., et al. (2006). Current concept on the pathogenesis of inflammatory bowel disease-crosstalk between genetic and microbial factors: pathogenic bacteria and altered bacterial sensing or changes in mucosal integrity take "toll" ? *World J Gastroenterol*, 12, 1829-41.
- Lakatos, P.L., Szamosi, T. e Lakatos, L. (2007). Smoking in inflammatory bowel diseases: good, bad or ugly? *World J Gastroenterol*, 13, 6134-9.
- Lapaquette, P., et al. (2012a). Etiology of Crohn's disease: many roads lead to autophagy. *J Mol Med (Berl)*, 90, 987-96.
- Lapaquette, P., Bringer, M.A. e Darfeuille-Michaud, A. (2012b). Defects in autophagy favour adherent-invasive *Escherichia coli* persistence within macrophages leading to increased pro-inflammatory response. *Cell Microbiol*, 14, 791-807.
- Lapaquette, P., et al. (2010). Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly. *Cell Microbiol*, 12, 99-113.
- Lapis, K. (2010). [Barrier- and autophagic functions of the intestinal epithelia: role of disturbances in the pathogenesis of Crohn's disease]. *Orv Hetil*, 151, 1645-55.
- Lauriola, M., et al. (2011). IL23R, NOD2/CARD15, ATG16L1 and PHOX2B polymorphisms in a group of patients with Crohn's disease and correlation with sub-phenotypes. *Int J Mol Med*, 27, 469-77.

- Lewis, C.M., *et al.* (2007). Estimating risks of common complex diseases across genetic and environmental factors: the example of Crohn disease. *J Med Genet*, 44, 689-94.
- Lichtenstein, G.R., Hanauer, S.B. e Sandborn, W.J. (2009). Management of Crohn's disease in adults. *Am J Gastroenterol*, 104, 465-83; quiz 464, 484.
- Lockhart-Mummery, H.E. e Morson, B.C. (1960). Crohn's disease (regional enteritis) of the large intestine and its distinction from ulcerative colitis. *Gut*, 1, 87-105.
- Louis, E., *et al.* (2001). Behaviour of Crohn's disease according to the Vienna classification: changing pattern over the course of the disease. *Gut*, 49, 777-82.
- Mahid, S.S., *et al.* (2007). Active and passive smoking in childhood is related to the development of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 13, 431-8.
- Martin, H.M., *et al.* (2004). Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology*, 127, 80-93.
- Massey, D.C. e Parkes, M. (2007). Genome-wide association scanning highlights two autophagy genes, ATG16L1 and IRGM, as being significantly associated with Crohn's disease. *Autophagy*, 3, 649-51.
- McGovern, D. e Powrie, F. (2007). The IL23 axis plays a key role in the pathogenesis of IBD. *Gut*, 56, 1333-6.
- Meconi, S., *et al.* (2007). Adherent-invasive *Escherichia coli* isolated from Crohn's disease patients induce granulomas in vitro. *Cell Microbiol*, 9, 1252-61.
- Naser, S.A., *et al.* (2012). Role of ATG16L, NOD2 and IL23R in Crohn's disease pathogenesis. *World J Gastroenterol*, 18, 412-24.
- Neuman, M.G. e Nanau, R.M. (2012). Inflammatory bowel disease: role of diet, microbiota, life style. *Transl Res*, 160, 29-44.
- Ohno, H. e Hase, K. (2010). Glycoprotein 2 (GP2): grabbing the FimH bacteria into M cells for mucosal immunity. *Gut Microbes*, 1, 407-10.
- Plantinga, T.S., Joosten, L.A. e Netea, M.G. (2011). ATG16L1 polymorphisms are associated with NOD2-induced hyperinflammation. *Autophagy*, 7, 1074-5.
- Prideaux, L., *et al.* (2012). Inflammatory bowel disease in Asia: a systematic review. *J Gastroenterol Hepatol*, 27, 1266-80.
- Qin, X. (2012). Etiology of inflammatory bowel disease: a unified hypothesis. *World J Gastroenterol*, 18, 1708-22.
- Ramjeet, M., *et al.* (2010). 'Nodophagy': New crossroads in Crohn disease pathogenesis. *Gut Microbes*, 1, 307-315.

- Rolhion, N. e Darfeuille-Michaud, A. (2007). Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 13, 1277-83.
- Rosenfeld, G. e Bressler, B. (2010). *Mycobacterium avium* paratuberculosis and the etiology of Crohn's disease: a review of the controversy from the clinician's perspective. *Can J Gastroenterol*, 24, 619-24.
- Rubin, E., *et al.* (2005). *Rubin Patologia bases clinicopatológicas de medicina*. 4ªed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, pp. 727-730.
- Sanders, M.E., *et al.* (2013). An update on the use and investigation of probiotics in health and disease. *Gut*, 62, 787-96.
- Sartor, R.B. (2005). Does *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis cause Crohn's disease? *Gut*, 54, 896-8.
- Sartor, R.B. (2006). Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, 3, 390-407.
- Sartor, R.B. (2008). Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 134, 577-94.
- Sasaki, M., *et al.* (2007). Invasive *Escherichia coli* are a feature of Crohn's disease. *Lab Invest*, 87, 1042-54.
- Schirbel, A. e Fiocchi, C. (2010). Inflammatory bowel disease: Established and evolving considerations on its etiopathogenesis and therapy. *J Dig Dis*, 11, 266-76.
- Sekirov, I., *et al.* (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev*, 90, 859-904.
- Selby, W., *et al.* (2007). Two-year combination antibiotic therapy with clarithromycin, rifabutin, and clofazimine for Crohn's disease. *Gastroenterology*, 132, 2313-9.
- Sepehri, S., *et al.* (2009). Phylogenetic analysis of inflammatory bowel disease associated *Escherichia coli* and the fimH virulence determinant. *Inflamm Bowel Dis*, 15, 1737-45.
- Smith, A.M., *et al.* (2009). Disordered macrophage cytokine secretion underlies impaired acute inflammation and bacterial clearance in Crohn's disease. *J Exp Med*, 206, 1883-97.
- Sokol, H., *et al.* (2008). *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 16731-6.

- Srikanth, C.V. e McCormick, B.A. (2008). Interactions of the intestinal epithelium with the pathogen and the indigenous microbiota: a three-way crosstalk. *Interdiscip Perspect Infect Dis*, 2008, 626827.
- Stappenbeck, T.S., *et al.* (2011). Crohn disease: a current perspective on genetics, autophagy and immunity. *Autophagy*, 7, 355-74.
- Stecher, B. e Hardt, W.D. (2011). Mechanisms controlling pathogen colonization of the gut. *Curr Opin Microbiol*, 14, 82-91.
- Strober, W. (2011). Adherent-invasive E. coli in Crohn disease: bacterial "agent provocateur". *J Clin Invest*, 121, 841-4.
- Tsianos, E.V., Katsanos, K.H. e Tsianos, V.E. (2011). Role of genetics in the diagnosis and prognosis of Crohn's disease. *World J Gastroenterol*, 17, 5246-59.
- Tsianos, E.V., Katsanos, K.H. e Tsianos, V.E. (2012). Role of genetics in the diagnosis and prognosis of Crohn's disease. *World J Gastroenterol*, 18, 105-18.
- Vavricka, S.R. e Rogler, G. (2009). New insights into the pathogenesis of Crohn's disease: are they relevant for therapeutic options? *Swiss Med Wkly*, 139, 527-34.
- Wine, E., *et al.* (2009). Adherent-invasive *Escherichia coli*, strain LF82 disrupts apical junctional complexes in polarized epithelia. *BMC Microbiol*, 9, 180.
- Wine, E., *et al.* (2010). Adherent-invasive *Escherichia coli* target the epithelial barrier. *Gut Microbes*, 1, 80-84.
- Yamamoto-Furusho, J.K. (2007). Genetic factors associated with the development of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 13, 5594-7.