

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

**ESTUDO DO POLIMORFISMO DO GENE *DEFB1* EM PACIENTES COM DOENÇA  
INFLAMATÓRIA INTESTINAL E CONTROLES NO SUL DO BRASIL**

**TIMOTHY JOHN WILSON**

**PORTO ALEGRE  
OUTUBRO DE 2015**

**ESTUDO DO POLIMORFISMO DO GENE *DEFB1* EM PACIENTES COM DOENÇA  
INFLAMATÓRIA INTESTINAL E CONTROLES NO SUL DO BRASIL**

**TIMOTHY JOHN WILSON**

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Medicina: Ciências  
Médicas, UFRGS, como pré-requisito para  
obtenção do Título de Doutor  
Orientador: Prof Dr Rafael Roessler

**PORTO ALEGRE**

**OUTUBRO DE 2015**

CIP - Catalogação na Publicação

WILSON, TIMOTHY JOHN  
ESTUDO DO POLIMORFISMO DO GENE DEFB1 EM PACIENTES  
COM DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL E CONTROLES NO SUL  
DO BRASIL / TIMOTHY JOHN WILSON. -- 2015.  
151 f.

Orientador: Rafael Roessler.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-  
Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2015.

1. Defensinas. 2. Doença inflamatória intestinal.  
3. Imunidade inata. 4. Microbiota. I. Roessler,  
Rafael , orient. II. Título.

**BANCA EXAMINADORA**

**MARINO MUXFELDT BIANCHIN**

Professor do PPG em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS

**DENIS MARTINEZ**

Professor do PPG em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS

**MELISSA MARKOSKI**

Professora do PPG em Ciências da Saúde: Cardiologia, IC-FUC

**CAROLINE BRUNETTO DE FARIAS**

Professora do PPG em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, UFRGS

***A minha esposa Mariana, pelo incentivo e carinho.  
Aos meus filhos Gabriel e Thomas, minhas maiores alegrias.***

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Rafael Roesler pela acolhida e estímulo na realização deste trabalho.

Aos Profs Luiz Fernando Jobim e Gilberto Schwartzmann, pelo entusiasmo e indispensável colaboração no desenvolvimento do trabalho laboratorial.

A Dr Daniel Damin e Dra Cristina Flores pela oportunidade de trabalhar com seus pacientes.

Aos Drs Sergio Crovella e Ludovica Segat pela possibilidade de trabalho em conjunto.

A Dra Pamela Portela pelo auxílio nas atividades laboratoriais.

A Dra Patrícia Salim pela ajuda com trabalho estatístico.

Ao Ministério da Saúde da Itália (RC40/11) e “Regione Friuli Venezia Giulia (R3A2) pelo apoio.

***“Wisdom is not a product of schooling but of the lifelong attempt to acquire it.”***

***— Albert Einstein***

## RESUMO

Defensinas são peptídeos antimicrobianos produzidos na mucosa intestinal e fazem parte da imunidade inata, agindo sobre vários microrganismos luminiais. Deficiência na expressão de defensinas tem sido relatada em doenças inflamatórias intestinais (DII), no entanto a contribuição de cada tipo de defensina, num cenário de polimorfismo genético, mantém alguma controversa. Beta-defensinas humanas (HBDs) têm atividade antimicrobiana contra uma ampla variedade de fungos, bactérias e vírus e têm também, um papel na ligação entre a imunidade inata e adaptativa atuando como quimiotáticos. O gene *DEFB1* (8p23), codificando a beta-defensina humana 1 (HBD-1), é expresso normalmente por células epiteliais de uma série de tecidos, mas sua expressão pode variar entre indivíduos e pode ser modificada durante processo inflamatório. Produção deficiente de defensinas parece contribuir para a patogênese de DII, e uma diminuição na expressão de HBD-1 tem sido relatada na mucosa de pacientes com doença de Crohn (DC) e retocolite ulcerativa (RCU). Nós avaliamos a possível associação de três polimorfismos do gene *DEFB1* com a suscetibilidade a DII, RCU e DC, em 149 pacientes, 79 com DC e 70 com RCU; e 200 controles saudáveis do sul do Brasil. No nosso estudo não se observou diferença estatisticamente significativa entre a distribuição das frequências alélicas para *DEFB1* SNPs -52G>A, -44C>G e -20G>A entre o total de pacientes com DII e controles. Porém, quando pacientes com DC foram estratificados de acordo com a localização anatômica, o alelo -20G>A foi mais frequente em pacientes com DC colônica do que em controles (65 % VS 44 %,  $p=0,048$ ). De forma similar, o genótipo A/A foi mais frequente em pacientes com DC colônica do que em controles (36 % VS 16 %), mas neste caso, a diferença não foi estatisticamente significativa ( $p=0,07$ ).

Embora não se achou uma clara e forte associação entre os SNPs 5'-UTR *DEFB1* e suscetibilidade/proteção à doença inflamatória intestinal, nossos resultados sugerem possível envolvimento do gene *DEFB1* nestas enfermidades, especialmente com a localização colônica da doença de Crohn. Estudos com amostras maiores e populações diversas serão úteis para avaliar a tendência observada no nosso grupo.

Palavras-chave: “Defensinas”; “Doença inflamatória intestinal”; “Imunidade inata”; “Microbiota”



## ABSTRACT

Defensins are antimicrobial peptides produced by the intestinal mucosa and are part of the innate immune system, playing a protective role against various intestinal microorganisms. Deficiency in the expression of defensins has been reported in inflammatory bowel diseases (IBD), however there is some controversy over the contribution of each type of defensin, in a setting of great genetic polymorphism. Beta-defensins (HBDs) have an antimicrobial activity against a great variety of fungi, bacteria and viruses, and also have a role in connecting the innate and the adaptive immunity, acting as a chemostatic agent. Deficient production of defensins appears to contribute to the pathogenesis of IBD, and the lower expression of HBD-1 has been reported on the mucosa of Ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) patients. We evaluated a possible association of three polymorphisms of gene *DEFB1* with susceptibility to develop IBD, UC and CD in 149 patients, 79 with CD and 70 with UC; and 200 healthy controls from the south of Brazil. The gene *DEFB1* (8p23), which codifies human beta-defensin 1 (HBD-1), is constitutively expressed by epithelial cells of several tissues, but its expression may vary among different individuals and may be modified by inflammation. In our study we did not find a statistically significant difference between the distribution of the allelic frequencies for *DEFB1* SNPs -52G>A, -44C.G and -20G>A between the total number of patients and controls. However, when patients were stratified according to the anatomic location, the allele -20G>A was more frequent in patients with colonic CD than in controls (65% VS 44%,  $p=0,048$ ). Similarly, the genotype A/A was more frequent in patients with colonic CD than in controls (36% vs 16%), however, in this case, the difference wasn't statistically significant ( $p=0,07$ ).

Although we did not find a clear and strong association between the 5'-UTR *DEFB1* SNP and susceptibility to IBD, our results suggest a possible involvement of the *DEFB1* gene and these diseases, particularly colonic CD. Further studies with larger samples and diverse populations will be useful to evaluate the trend observed by our group.

Keywords: "Defensins"; "Inflammatory Bowel Disease"; "Innate immunity"; "Microbiota"

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Prevalência mundial de doença inflamatória intestinal prevista para 2015	21
Figura 2: Evolução da interação da microbiota com o sistema imune pré e pós-natal .....	32
Figura 3: Interações entre a Microbiota Intestinal e a Mucosa Intestinal em DII	38
Figura 4: Mecanismos de defesa da barreira intestinal normal	39
Figura 5: Panorama do sistema imune na mucosa do Intestino delgado	46
Figura 6: Sistema imune da mucosa do intestino grosso	47
Figura 7: Mecanismo de ação das defensinas	58
Figura 8: Estrutura espacial das beta-defensinas	62
Figura 9: Estrutura do mRNA, incluindo as UTRs	62
Figura 10: Envolvimento intestinal na Retocolite Ulcerativa e na Doença de Crohn	68
Figura 11: Envolvimento do trato digestivo por Doença de Crohn	69
Figura 12: Aspecto endoscópico típico da Doença de Crohn	73
Figura 13: Aspecto endoscópico típico de retocolite	73
Figura 14: Evolução patológica da Doença de Crohn	90
Figura 15: Programa "step-up" e "top- down" para Doença de Crohn	91
Figura 16: Proctocolectomia restauradora com bolsa ileal	92
Figura 17: Defensina sintética	95

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Metanálise avaliando polimorfismo do <i>DEFB1</i> e doenças digestivas.....	66
Tabela 2: Metanálise mostrando associação positiva do SNP RS 179946 G>A com doença de Crohn.....	66
Tabela 3: Características da Doença de Crohn e da Retocolite Ulcerativa .....	72
Tabela 4: Classificação de Vienna e Montreal para doença de Crohn.....	76
Tabela 5: Classificação para extensão da RCU – Montreal .....	76
Tabela 6: Classificação de extensão da Doença de Crohn – Montreal .....	76
Tabela 7: Classificação de Montreal para o grau de atividade da Retocolite Ulcerativa .....	77
Tabela 8: Índice de atividade da doença de Crohn (IADC) .....	78
Tabela 9: Índice de Harvey-Bradshaw para doença de Crohn .....	79
Tabela 10: Definições do Escore Endoscópico Simplificado para Doença de Crohn	81
Tabela 11: Índice de atividade de Truelove e Witts (Oxford).....	82
Tabela 12: Índice de atividade de Mayo.....	83

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AMP</b>	Peptídeos antimicrobianos
<b>Arg</b>	Arginina
<b>ATG16L1</b>	Autophagy-related 16-like 1
<b>CARD</b>	Capsase recruitment domain Family
<b>CCR</b>	Receptor quimiotático
<b>CDH1-</b>	Cadherin 1, type 1
<b>Células M</b>	Células com micropregas
<b>Células Treg</b>	Células T reguladoras
<b>Cys</b>	Cisteína
<b>DC</b>	Doença de Crohn
<b>DEFB1</b>	Defensina humana beta 1
<b>DII</b>	Doença Inflamatória Intestinal
<b>ECM1</b>	Extracellular matrix protein 1
<b>ER</b>	Retículo endoplasmático
<b>ERAD</b>	Endoplasmatic reticulum associated protein degradation
<b>FT</b>	Fator de transcrição
<b>GWAS</b>	Genome-wide association Studies
<b>HBD</b>	Human beta-defensins
<b>HNF4a</b>	Hepatonuclear fator 4 alpha
<b>HNP</b>	Human neutrophile peptide
<b>IBD</b>	Inflammatory bowel Disease
<b>IFN</b>	Interferon
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>ILR</b>	Receptor de interleucina
<b>IMC</b>	Índice de massa corporal
<b>IRGM</b>	Immunity-related GTPase Family, M
<b>LAMB1</b>	Laminin beta 1
<b>MDP</b>	Muramyn dipeptídeos
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensageiro
<b>MUC</b>	Mucina
<b>NF-kB</b>	Fator nuclear kappa-beta
<b>NIH</b>	National Institute for health
<b>NK</b>	Natural Killer
<b>NLR</b>	Nod-like receptors
<b>NLRP3</b>	Nod like- receptor Pyrin domain containing 3
<b>NOD</b>	Nucleotide oligomerization domain
<b>PAMP</b>	Padrões moleculares associados a patógenos
<b>PRR</b>	Pattern recognition receptors
<b>RAP</b>	Receptor accessory protein
<b>RCU</b>	Retocolite ulcerativa
<b>REG III-</b>	Regenerating islet-derived III gama

<b>gama</b>	
<b>SCFA</b>	Acidos graxos de cadeia curta
<b>SNP</b>	Single nucleotide polymorphism – Polimorfismo de nucleotídeo único
<b>SOCS</b>	Supressor of cytokine signalling
<b>TCF-4</b>	Fator de transcrição específico para células T
<b>TGF</b>	Fator de crescimento transformador
<b>Th</b>	Célula T helper
<b>TLR</b>	Toll-like receptors
<b>TNF-alfa-</b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>UPR</b>	Unfolded protein response – resposta não resolvida a proteínas mal-enoveladas
<b>UTR</b>	Untranslated region- Região não-traduzida
<b>Wnt</b>	Wingless-related integration site
<b>XBP1</b>	X-box binding protein 1

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>166</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>188</b>
<b>2.1. ESTRATEGIA PARA BUSCA E SELEÇÃO DA INFORMAÇÃO .....</b>	188
<b>2.2. DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL.....</b>	20
2.2.1. DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA.....	20
2.2.2. FISIOPATOLOGIA .....	222
<b>2.2.2.1. FATORES GENÉTICOS .....</b>	222
<b>2.2.2.2. FATORES AMBIENTAIS.....</b>	255
<b>2.2.2.3. FATORES MICROBIOLÓGICOS.....</b>	299
<b>2.2.2.4. FATORES DA BARREIRA INTESTINAL .....</b>	388
<b>2.2.2.5. FATORES LIGADOS AO SISTEMA IMUNE.....</b>	477
2.2.3. DEFENSINAS .....	544
<b>2.2.3.1. ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS DEFENSINAS .....</b>	566
<b>2.2.3.2. DEFENSINAS E IMUNIDADE INATA .....</b>	599
<b>2.2.3.3. DEFENSINAS E IMUNIDADE ADAPTATIVA.....</b>	599
<b>2.2.3.4. DEFENSINAS EM DII .....</b>	60
<b>2.2.3.5. ALFA-DEFENSINAS EM DII.....</b>	60
<b>2.2.3.6. BETA-DEFENSINAS EM DII.....</b>	622
2.2.4. QUADRO CLÍNICO E MANEJO.....	677
<b>2.2.4.1. QUADRO CLÍNICO.....</b>	677
<b>2.2.4.2. DIAGNÓSTICO.....</b>	70
<b>2.2.4.3. CLASSIFICAÇÃO .....</b>	755
<b>2.2.4.3.1 DOENÇA DE</b>	
<b>CROHN.....</b>	<b>777</b>
<b>2.2.4.3.2 RETOCOLITE ULCERATIVA.....</b>	<b>81</b>
2.2.5. TRATAMENTO .....	844
<b>2.2.6.1. TRATAMENTO CLÍNICO .....</b>	844
<b>2.2.6.1.1. DERIVADOS SALICÍLICOS .....</b>	844
<b>2.2.6.1.2. CORTICÓIDES .....</b>	866
<b>2.2.6.1.3. IMUNOSSUPRESSORES CONVENCIONAIS .....</b>	877
<b>2.2.6.1.4. ANTIBIÓTICOS.....</b>	888
<b>2.2.6.1.5. TERAPIA BIOLÓGICA.....</b>	888

2.2.6.2. TRATAMENTO CIRÚRGICO .....	922
2.2.6. PERSPECTIVAS DE TRATAMENTO .....	944
3. MAPA CONCEITUAL OU TEÓRICO .....	966
4. JUSTIFICATIVA .....	999
5. OBJETIVOS .....	100
5.1. OBJETIVOS GERAIS .....	100
2.2-OBJETIVOS SECUNDÁRIOS .....	100
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DA LITERATURA .....	101101
7. ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS .....	1366
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	1477
9. ANEXOS .....	1488
PROTOCOLO DE COLETA DE DADOS .....	1488
TERMO DE CONSENTIMENTO DOS PACIENTES .....	1499
TERMO DE CONSENTIMENTO DO GRUPO CONTROLE (REDOME) .....	15151
TERMO DE COMPROMISSO PARA USO DE DADOS INSTITUCIONAIS .....	1533

## 1. INTRODUÇÃO

O trato digestivo representa um dos sistemas imunológicos mais complexos do corpo humano (1). A barreira mucosa normal da parede intestinal separa o interior do indivíduo, essencialmente estéril, de uma série de desafios imunológicos antigênicos representados pelos microrganismos do lúmen (2). O epitélio intestinal produz muco, peptídeos antimicrobianos e imunoglobulina A secretora (Ig A), que contribuem para proteger o indivíduo de agressão, através de resposta rápida aos patógenos, ao mesmo tempo em que permite a ação de mecanismos imunológicos inatos que garantem a coexistência com bactérias comensais intestinais (3). Na DII ocorre o que se acredita ser, uma quebra desta tolerância e inflamação sobrevém, movido pela flora microbiana intestinal (4,5).

Doença de Crohn (DC) e Retocolite Ulcerativa (RU) são as principais doenças inflamatórias intestinais (DII) e têm sido foco de intensa investigação nas últimas duas décadas, tanto em ciências básicas quanto em pesquisa clínica. Esta atenção especial se justifica pelo crescimento extraordinário de informações sobre vários dos elementos envolvidos na doença (6). Embora ainda tenha etiologia desconhecida, evidência recente sugere que a DII resulte de uma interação complexa de fatores genéticos e ambientais, levando a uma resposta inflamatória inapropriada e desenvolvimento da doença.

A imunidade inata tem sido foco de atenção especial em estudos recentes, que sugerem ter a mesma um papel importante na primeira linha de defesa do organismo, no acionamento da cascata inflamatória e nas subseqüentes respostas patológicas do sistema imune adaptativo, característico de DII (7).



Parte desta linha de defesa inata se encontra no epitélio que compõe a mucosa intestinal, onde encontramos células especializadas produtoras de peptídeos com ação antimicrobiana, chamadas defensinas. Acredita-se que a expressão atenuada de defensinas possa comprometer a imunidade, alterando o equilíbrio existente no intestino, favorecendo a ocorrência de processo inflamatório e, desta forma, contribuir para a patogênese da DII. Evidência para esta hipótese pode ser demonstrada em DC, onde redução nos níveis de alfa-defensinas é vista em doença de localização no íleo, e níveis reduzidos de beta-defensinas, naquelas com envolvimento colônico. Embora não haja dúvida de que a expressão das defensinas esteja alterada em DII, está menos claro se a deficiência de defensina é uma das causas de DII ou se é uma consequência do processo da doença na mucosa (8).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. ESTRATÉGIA PARA BUSCA E SELEÇÃO DA INFORMAÇÃO

Esta revisão da literatura está focada nos fatores envolvidos na fisiopatologia da doença inflamatória intestinal, particularmente no papel das defensinas, especialmente o da beta-defensina 1 (DEFB1). A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: LILACS, SciELO, PubMed e Medscape, no período de 2000 a 2015. Foram realizadas buscas através dos termos “Inflammatory Bowel disease”, “Innate immunity”, “defensins” and “microbiota” e suas combinações apresentadas na abaixo:

<b>PUBMED/MEDLINE</b>	<b>Encontrados</b>	<b>Selecionados</b>
1.Defensins	3278 artigos	16
2.Inflammatory Bowel Disease	5401 artigos	21
3.Innate immunity	50210 artigos	14
4.Microbiota	16274 artigos	9
	1+2= 161 artigos	45
	1+ 3= 886 artigos	45
	1+ 4= 80 artigos	15
	1+2+3= 71 artigos	20
	<u>1+2+3+4= 11 artigos</u>	<u>7</u>
	<b>PUBMED= 192 ARTIGOS</b>	

<b>LILACS</b>	<b>Encontrados</b>	<b>Selecionados</b>
1.Defensins	25 artigos	1
2.Inflammatory Bowel Disease	435 artigos	20
3.Innate immunity	342 artigos	5
4.Microbiota	853 artigos	10
	1+2= 92 artigos	20
	1+ 3=90 artigos	13
	1+ 4= 53 artigos	14
	1+2+3= 30 artigos	9
	<u>1+2+3+4= 1 artigos</u>	<u>zero</u>
	<b>LILACS= 93 ARTIGOS</b>	

<b>SIELO</b>	<b>Encontrados</b>	<b>Selecionados</b>
1.Defensins	4 artigos	1
2.Inflammatory Bowel Disease	142 artigos	3
3.Innate immunity	51 artigos	2
4.Microbiota	443 artigos	2
	1+2= zero artigos	zero
	1+ 3= 2 artigos	zero
	<u>1+ 4= zero artigos</u>	<u>zero</u>
	<b>SIELO= 1 ARTIGO</b>	

Por haver duplicidade de alguns artigos do Pubmed e Lilacs foram selecionados um total de 210 artigos.

## 2.2. DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

### 2.2.1. DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA

RCU e DC são as duas formas principais de doença inflamatória intestinal (DII), que têm na cronicidade e atividade inflamatória progressiva suas características principais. Apesar de terem algumas características comuns, elas podem ser diferenciadas por predisposição genética, fatores de risco, características clínicas, endoscópicas e histológicas (9).

A inflamação na RCU é caracteristicamente restrita à superfície mucosa, estando as alterações inicialmente presentes no reto, podendo estender-se no sentido proximal, de forma contínua, através de todo o colón. A distribuição da doença é estratificada pela extensão do envolvimento colônico, desde proctite, à colite esquerda, até colite extensa (pancolite). A intensidade do processo inflamatório determina as alterações que ocorrem na mucosa, desde edema leve até ulcerações extensas. Os achados histológicos incluem presença de grande quantidade de neutrófilos na lâmina própria e nas criptas intestinais, onde formam micro-abscessos, podendo haver depleção das células caliciformes (7,10).

A DC pode afetar qualquer porção do trato digestivo, sendo mais comum o envolvimento do íleo terminal e do intestino grosso. O envolvimento do cólon pode ter padrão irregular, segmentar e o processo inflamatório pode envolver todas as camadas do intestino. A análise histopatológica pode documentar o processo inflamatório transmural, que é caracterizado por agregados de macrófagos que, com frequência, formam granulomas não-caseosos (7).

Pacientes com DII podem também ter manifestações extra-intestinais, tais como colangite esclerosante, espondilite anquilosante, uveíte, pioderma

gangrenoso, eritema nodoso, dentre outros (11). O diagnóstico é feito com base em dados clínicos, patológicos, endoscópicos e radiológicos (10,12).

Embora a incidência de DII varie de forma considerável ao redor do mundo, um aumento expressivo tem ocorrido nas últimas décadas, principalmente nos países industrializados. As incidências mundiais descritas de RCU e de DC variam de 0 a 24.3/100 000 habitantes e de 0 a 20.2/100 000 habitantes, respectivamente (13). No norte da América e da Europa a incidência varia de 9 a 20 casos por 100.000 pessoas /ano, e taxas de prevalência, de 156 a 291 casos por 100.000. As taxas são baixas no hemisfério sul e nos países orientais (Figura 1), no entanto, é interessante observar que a DII tem aumentado em países que passaram a adotar estilos de vida similares aos dos países industrializados, o que sugere que fatores ambientais possam desempenhar um papel decisivo na promoção do início da doença (14).



**Figura 1: Prevalência mundial de doença inflamatória intestinal prevista para 2015**

Fonte: (13)

Descrição: regiões do mundo com prevalência maior (em vermelho), intermediária (em amarelo), menor (em azul) e desconhecida (cinza). (Adaptado de Molodecky NA et al. *Gastroenterology* 2012; 142:46-54).

O quadro inicial de DII ocorre principalmente na segunda ou terceira década de vida, evoluindo para se tornar uma enfermidade crônica e recorrente na maioria dos indivíduos. RCU tem um padrão de incidência bimodal, com um pico de início principal entre as idades de 15 e 30 anos (14), e um segundo pico, menor, entre as idades de 50 e 70 anos. Estudos têm demonstrado não haver diferença entre sexos ou pequena preponderância entre homens (14). DC surge com mais frequência no final da adolescência ou no adulto jovem, também havendo um segundo pico de incidência na faixa dos 60 anos, e sendo distribuído igualmente entre os sexos (15).

## **2.2.2. FISIOPATOLOGIA**

### **2.2.2.1. FATORES GENÉTICOS**

Há muitos anos estudos populacionais têm demonstrado agregação familiar em DII. Kirsner e Spencer foram os primeiros a descreverem esta ocorrência, aproximadamente trinta anos após a descrição original de “ileíte regional” por Crohn e al em 1932 (16). Cerca de 30 anos depois, descobriu-se a vinculação de DC com o cromossomo 16 (17) e, graças aos avanços tecnológicos, em mais 5 anos identificou-se o primeiro gene ligado a DII, o *NOD2/CARD 15* (*nucleotide oligomerization domain 2 / caspase recruitment domain family*), situado no cromossomo 16 e que codifica a proteína NOD2 (*nuclear type binding oligomerization domain 2*) e suas variantes, associados com DC ileal (18).

NOD2/CARD15 é uma proteína citoplasmática cuja função é detectar partículas bacterianas intracelulares, contribuindo para sua depuração. Mutações do gene que o codifica podem levar à disfunção na atividade antimicrobiana das células

de Paneth, que são vitais para a defesa inata da mucosa. O gene *NOD2/CARD15* tem sido associado ao envolvimento ileal por DC e diminuição na produção de alfa-defensinas (19). A região onde se encontrou o gene *CARD2/NOD2* foi denominado IBD 1 (*Inflammatory Bowel Disease 1*).

Após um novo período de cinco anos, o segundo gene associado a DII foi descoberto: o receptor de interleucina *IL23R* (IL-23R) (20), estimulando novos estudos de associação genômica em todo o mundo, tais como o GWAS (*Genome-Wide Association Studies*), o que permitiu elevar, em apenas cinco anos adicionais, o número de associações de genes com DII a mais de 100 em 2011, e pelo menos a 163 em 2012 (21).

Entre as associações descobertas neste período foi a detecção de SNPs (*Single nucleotide polymorphisms*) dos genes da autofagia *ATG16L1* (*Autophagy-related 16-like 1*) e *IRGM* (*Immunity-related GTPase family, M*), associados a DC (22,23). Autofagia é um processo de decomposição de componentes intracelulares por lisossomos, e desempenha um papel relevante na depuração de patógenos intracelulares. Como a patogênese de DC parece depender da resposta imune à microbiota, uma disfunção da eliminação autofágica de bactérias intracelulares, causada pela disfunção de *ATG16L1* e *IRGM*, e uma resultante mudança da microbiota intestinal, poderia levar ao desenvolvimento de DC (24).

Várias outras associações seguiram, tais como aquelas dos SNPs de genes *IL-10* (*Interleukin 10*), *IL-10R* (*Interleukin 10 receptor*) ou *IL-18RAP* (*Interleukin 18 receptor accessory protein*), ressaltando o papel relevante da resposta imune e citocinas na patogênese de DII (25–28).

Após os achados iniciais de genes mais ligados a DC, foram encontrados outros, associados a RCU, tais como o polimorfismo de genes *ECM1* (*Extracellular*

*matrix protein 1*), *CDH1* (*Cadherin 1, type 1*), *HNF4a* (*Hepatonuclear fator 4 alpha*) e *LAMB1* (*Laminin beta 1*), que estão associados a regulação da permeabilidade da barreira epitelial do intestino. A revelação destes genes ajudou a lançar luz sobre a contribuição do aumento de permeabilidade da membrana na patogênese de RCU (29).

Outro resultado destes estudos do GWAS foi relatado por Kaser et al, que mostraram SNPs localizados no gene *XBP1* (*X-box binding protein 1*), que estão associadas as duas formas de DII, tanto RCU quanto DC (30). Este gene codifica um importante fator de transcrição (TF) na resposta ao stress do retículo endoplasmático (ER). A proteína XBP1, codificada pelo *mRNA XBP1*, é um potente fator de transcrição que faz a mediação da transcrição dos genes alvo do stress do ER, tais como aqueles envolvidos em dobradura de proteínas e degradação associada ao ER (*ERAD- Endoplasmatic reticulum associated protein degradation*). Kaser et al, também demonstraram, após realização de sequenciamento de nova geração na região do gene *XBP1*, SNPs raros presentes somente em pacientes com DII, e não em controles, e mostrou que duas destas variantes eram hipomórficas (30).

Estudos recentes demonstram que o número de alelos de risco para RCU ou DC que o paciente carrega aumenta, de forma diretamente proporcional, a razão de chances de desenvolver a doença (31). Assim sendo, quanto maior a carga de genes associados a DII, maior o risco de manifestação de DII. A contribuição da genética na patogênese da DII parece ser maior na DC do que na RCU, já que dos 163 genes associados a DII, 23 estão associados à RCU, 30 com DC, e os restantes 110 com ambas as formas de DII: RCU e DC (21). É interessante observar que ocorre maior concordância monozigótica em DC do que em RCU (32).



A disponibilidade crescente de novas tecnologias de sequenciamento, combinados com a diminuição dos custos, está permitindo agora o sequenciamento de genomas, exomas e transcritomas inteiros. Também estão permitindo fazer os chamados re-sequenciamentos de nova geração, nas regiões previamente identificadas pelo GWAS como associadas a DII, para permitir o achado de SNPs de baixa frequência, que provavelmente representem variantes funcionais (33). Banco de dados de referência para as variantes de DNA humano, tais como aqueles providenciados pelo *1000 Genomes Project*, também estão permitindo entender melhor como o genótipo influencia o fenótipo, abrindo novas frentes de pesquisa da genética na DII (34).

A busca por associações com DII se justifica, não apenas do ponto de vista de pesquisa, mas também, da prática clínica. Estudos demonstraram que assinaturas genéticas específicas podem identificar subgrupos de pacientes com DII, que podem ou não responder à terapia com imunossuppressores biológicos (35), podem prever doença clinicamente refratária (36), aqueles com risco de complicações e assim por diante. Este progresso nas técnicas de sequenciamento irá render novas descobertas, abrindo novos caminhos para a investigação da patogênese de doenças complexas como a DII.

Embora as descobertas de associações genéticas com DII sejam notáveis, elas não dão conta de explicar a patogênese, isoladamente. Fatores ambientais, sem dúvida interagem com o indivíduo geneticamente suscetível.

#### **2.2.2.2. FATORES AMBIENTAIS**

Embora fatores genéticos de risco para RCU e DC tenham sido identificados, estes não seriam suficientes para explicar o aumento destas doenças a partir da

segunda metade do século XX. A partir da Segunda Guerra Mundial houve um aumento expressivo, tanto na incidência quanto na prevalência DII, enquanto que no século XIX praticamente não havia relato destas doenças. O *pool* genético que havia no século XIX não mudou de forma significativa neste período curto de tempo, de modo que os genes, isoladamente, não conseguiriam explicar a escalada crescente em DII em quase todos os países (37,38). Os números sempre foram maiores nos países industrializados, no entanto, também tem havido aumento em países em fase de desenvolvimento, nos quais são adotados hábitos “ocidentais” (14).

As diferenças entre a incidência e a prevalência que ocorreram com o passar do tempo, e que existem entre diferentes regiões geográficas e entre diferentes populações, sugerem a existência de um papel importante para fatores ambientais na etiologia de DII (15,38,39). Ademais, evidência importante sobre o papel do meio ambiente vem de estudos de migrações populacionais: adultos que migram de regiões com baixa incidência de DII para alta, não desenvolvem a doença, mas as crianças menores, ou descendentes nascidos após a migração, vêm a serem acometidos de DII na mesma proporção que a população nativa da região de alto risco (40,41). Imigrantes adultos e seus filhos compartilham os mesmos genes, todavia seu risco de DII é diverso e depende, fundamentalmente, de quando e para onde migraram, sugerindo haver responsabilidade por parte de fatores ambientais aos quais os jovens e as novas gerações foram expostas.

Apoiando esta ideia, uma coorte recente, publicada em 2014, observou que pessoas nascidas e criadas em ambiente rural, em contato com animais da fazenda, tinham um efeito protetor para DII, quando comparados com indivíduos criados em área urbana. Neste mesmo grupo, criado na fazenda, a história de ingestão de leite não pasteurizado e de consumo de hortas do quintal na infância, também teriam

efeitos protetores contra DII, segundo o mesmo estudo. A possível explicação seria que uma exposição precoce a uma diversidade microbiana maior tenha efeito protetor no longo prazo (42).

Há muito tempo uma série de doenças, particularmente aquelas de natureza neoplásica e inflamatória crônica, incluindo DII, têm sido associados a fatores do meio ambiente. O número e a variedade de fatores de risco ambientais que têm sido ligados à DII é grande, variando de tabagismo, dieta, drogas, geografia, status social e educacional, stress, apendicectomia prévia, permeabilidade intestinal e microbiota intestinal (43). Embora alguma evidência exista para estes fatores, as limitações das pesquisas sobre os mesmos derivam de uma falta de grandes coortes populacionais, com informações detalhadas, coletadas de forma prospectiva.

O tabagismo é um dos gatilhos ambientais mais estudados em DII. Desde a primeira descrição em 1982, do efeito protetor para RCU e deletério para DC, vários outros estudos reproduziram estes resultados. Não está claro qual o mecanismo de proteção na RCU e dano na DC. Todavia é um fato verificado em várias séries, de que o paciente tabagista com DC piora de forma nítida, aumentando o risco de complicações e risco de sofrer mais procedimentos cirúrgicos do que o não fumante (44–46).

Vários medicamentos têm sido implicados como fatores ambientais que aumentam o risco de RCU e DC, embora os mecanismos do efeito não estejam claros. Neste grupo estão: os anticoncepcionais, a aspirina, os anti-inflamatórios não esteróides e os antibióticos (47,48). Há evidência epidemiológica convincente demonstrando que quanto mais cedo, e mais frequente for o uso de antibióticos nos primeiros anos de vida, maior o risco de desenvolver DII, principalmente DC, mais tarde ao longo da vida (49,50).

A deficiência de vitamina D tem sido associada com um vasto número de doenças. Recentemente tem sido descrito como um novo fator de risco para DC. Quando foi inicialmente descrito nestes pacientes, havia dúvida se fazia parte da etiopatogenia da enfermidade ou se seria consequência das limitações de mobilidade, pouca exposição solar, desnutrição e má absorção impostas pela doença (51). No entanto, é comum encontrar deficiência de vitamina D em pacientes recém-diagnosticados com DII, sugerindo que este fator possa aumentar o risco de desenvolver DII (52). Khalili et al examinaram uma grande coorte histórica americana sobre doenças crônicas, com o foco em DII. Observaram que os pacientes de regiões mais frias tinham um risco aumentado para DC e RCU, sugerindo uma relação com a menor exposição à luz ultravioleta, o maior determinante dos níveis de vitamina D (53,54).

Recentemente várias linhas de evidência ecológica e epidemiológica sugerem que a poluição do ar possa contribuir para o risco de DC e RCU. Na presença de ar atmosférico poluído, observou-se aumento na circulação de polimorfonucleares e de citocinas plasmáticas, incluindo o fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa), estimulando a investigação do papel destes poluentes na DII (45,55,56).

Com muita frequência a dieta tem sido apontada como possível causa de DII, no entanto há uma grande lacuna de dados consistentes para confirmar esta hipótese. Relatos apontam que a ingestão de proteína de origem animal e ácidos graxos ômega-6 possam aumentar o risco de RCU, enquanto que ácidos graxos ômega-3 e fibras possam oferecer proteção (57). Acredita-se que a dieta possa ter influência na doença, através de seu efeito modificador sobre a microbiota intestinal (45). Neste sentido, Wu et al demonstraram que o padrão de dieta adotado no longo prazo afeta a proporção de *Bacteroides*, *Prevotella* e *Firmicutes*, e que mudanças no

curto prazo não têm influência significativa. Nas comunidades onde a dieta de longo prazo era rica em proteína e gordura de origem animal havia predomínio de *Bacteroides*, enquanto que naquelas com dieta rica em carboidratos simples, o agrupamento predominante foi *Prevotella* (58). Além disso, Zimmer et al estudaram o impacto da dieta vegana e vegetariana na microbiota, e acharam uma redução significativa de *Bacteroides sp.*, *Bifidobacterium sp.*, e as enterobacteriáceas, enquanto que a carga total de bactérias permanecia inalterada (59). Como as entebacteriáceas têm sido encontradas em número elevado, de forma consistente, em pacientes com DII, seria importante investigar o padrão de dieta, de curto e de longo prazo, em futuros estudos sobre o papel do microbioma em DII.

Embora ainda não haja prova que alguma dieta específica cause, previna ou trate DII diretamente, é sempre importante considerar as interações que ocorrem entre nutrientes e a microbiota intestinal quando estudamos o papel do microbioma em doenças digestivas. Devido à complexidade dos efeitos dietéticos, incluir estas informações provavelmente só será possível em grandes estudos de coorte (60,61).

Todos estes fatores mencionados apontam para a hipótese de que uma biodiversidade baixa e mudanças análogas em exposição microbiana possam ter importância na etiologia de DII.

### **2.2.2.3. FATORES MICROBIOLÓGICOS**

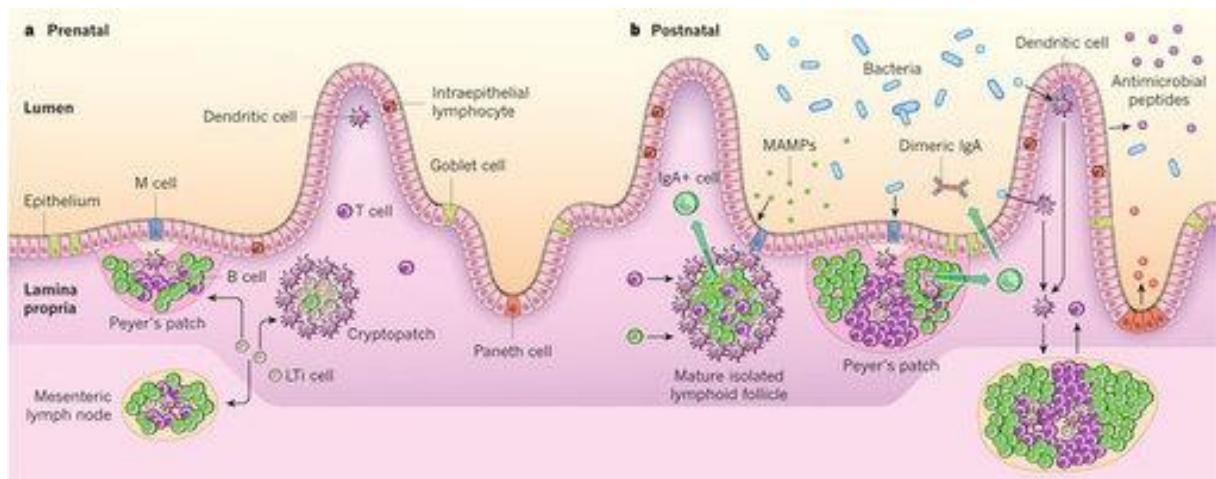
Nós coexistimos com nossa microbiota como mutualistas, mas essa relação, por vezes, se torna patológica, tal como em obesidade, em diabetes, em arteriosclerose e em doença inflamatória intestinal (62,63). A microbiota intestinal tem sido o foco de numerosos estudos na última década, por haver convicção de seu papel decisivo na etiopatologia da DII. O advento de técnicas que não

dependem de culturas, tais como sequenciamento de próxima geração e metagenômica, tem permitido avaliação global da microbiota intestinal de uma forma muito mais acurada e sofisticada do que era possível até poucos anos (64,65).

A composição dos microrganismos do intestino humano – a microbiota - é extremamente dinâmica e sofre evolução contínua, tanto em quantidade quanto em qualidade, desde o nascimento até a idade adulta, e esta evolução é influenciada pelo genoma e pelo meio ambiente ao qual o indivíduo é exposto. Ao nascer o trato digestivo é praticamente estéril, sendo colonizado após o parto (Figura 2). A forma do nascimento influencia fortemente a composição da microbiota humana, sendo mais diversificada nos indivíduos que nascem de parto vaginal do que naqueles de cesariana (66). Do nascimento até o primeiro ano de vida a microbiota varia de forma errática, quando atinge algum equilíbrio, no entanto, somente ao chegar à idade adulta o microbioma atinge estabilidade e complexidade, com melhora na sua resiliência contra perturbações (67). Ao envelhecer, no entanto, existe uma diminuição desta estabilidade (68).

Existe um conceito bem sedimentado de que o aleitamento materno tem uma influência inicial e contínua na formação do microbioma da criança, principalmente nos primeiros três meses. Além de proporcionar uma singular mistura de nutrientes e proteínas antimicrobianas, que influenciam a ecologia da microbiota neonatal, o leite materno fornece imunoglobulina A (Ig A) em abundância, cuja especificidade foi moldada pela microbiota materna (69). Nas crianças amamentadas pela mãe, as *Bifidobacterias* são mais comuns, enquanto que naquelas alimentadas com leite formulado comercialmente há mais *Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, *Bacterioides fragilis* e lactobacilos (70).

Durante este período crítico inicial, o sistema imune neonatal amadurece sob a influência desta microbiota, que sofre exposição a diversos fatores ambientais, tais como: dieta, novos micróbios, xenobióticos, bacteriófagos e infecções intestinais. Acredita-se que esta exposição tenha um papel crucial em moldar a composição da microbiota durante esta janela de maturação. Este seria um período sensível, um estágio de desenvolvimento, no qual o tipo da impressão microbiana sobre o sistema imune da mucosa intestinal pode resultar em um intestino saudável ou sujeito a desenvolver DII. Há evidência significativa indicando que quanto mais rica a microbiota – em número, variedade, complexidade e expressão genômica – mais saudável ficará, e mais efetiva será em educar o sistema imunológico sistêmico e da mucosa, e o indivíduo que os carrega será menos propenso ao desenvolvimento de doenças em geral. Ao contrário, pessoas com uma microbiota menos rica e diversa parecem ser mais propensas ao desenvolvimento de doenças. Esta é a situação nos pacientes com DII, como múltiplos relatos têm demonstrado: existe a associação de doença com a perda de diversidade microbiana, embora ainda haja alguma dúvida se este seria um evento primário, predispondo a DC ou RCU, ou se seria um achado secundário à presença de inflamação crônica intestinal (71).



**Figura 2: Evolução da interação da microbiota com o sistema imune pré e pós-natal**

Fonte: (72)

Descrição: a ilustração mostra o lúmen intestinal no período pré-natal, estéril e, após o nascimento, colonizado por microorganismos. Os elementos principais do sistema imune da parede intestinal e sua relação com os microrganismos luminiais. MAMP (peptídeos antimicrobianos da mucosa), IgA (Imunoglobulina A). (Adaptado de Maynard CL et al. Nature 2012; 489:231-41).

Ao atingir a idade adulta o trato digestivo distal - o íleo terminal e o cólon, as duas localizações principais de DC e RCU- contêm  $10^7 - 10^8$  e  $10^{11} - 10^{12}$  microrganismos por grama de conteúdo luminal, respectivamente (73). A estimativa é de que o intestino normal tenha 100 trilhões de micróbios diversos, isto é, 10 vezes mais do que as células do corpo humano, a maioria bactérias, envolvendo 1100 espécies prevalentes, com pelo menos 160 espécies em cada indivíduo (74). Estes micróbios apresentam tanto vantagens quanto riscos para o epitélio gastrointestinal. A microbiota intestinal auxilia na produção de vitaminas, na quebra de carboidratos complexos, de substratos inacessíveis às enzimas do hospedeiro e na competição que exercem com microrganismos danosos (75,76). Vários componentes da microbiota intestinal fermentam as fibras alimentares, para produzir ácidos graxos de cadeia curta (SCFA). Os SCFA, que incluem o acetato, propionato e butirato, são uma fonte primária de energia para as células epiteliais colônicas (77) e têm ação sobre a expansão das células T reguladoras (Treg) colônicas (78).



Em ratos de laboratório o butirato, derivado de ação de bactérias comensais, induz à diferenciação de células Treg colônicas. Butirato também é uma importante fonte energética de células epiteliais intestinais e aumentam a produção de mucina e peptídeos antimicrobianos (AMP). A concentração de butirato nas fezes de pacientes com DII é baixa. É possível que a concentração baixa de butirato no intestino contribua para induzir inflamação intestinal (79).

As bactérias, por outro lado, podem atuar de modo adverso provocando inflamação. Além de múltiplos estudos em modelos animais de colite experimental, há excelentes estudos humanos ilustrando claramente como a microbiota estimula uma rápida resposta imunológica no intestino, em indivíduos geneticamente suscetíveis. Um estudo clássico relato por D'Haens et al (80) mostrou que a infusão de conteúdo intestinal, coletado em bolsa de ileostomia, dentro do segmento livre de doença em paciente submetido a ressecção ileal, desencadeou inflamação local dentro de poucos dias. Também ficou demonstrada a importância da presença de microrganismos, em outro estudo clássico de Rutgeerts et al (81), no qual pacientes com DC distal tinham melhora do processo inflamatório após derivação cirúrgica.

Outra evidência de que existe interação entre o hospedeiro e os micróbios é o fato de alguns pacientes desenvolvem anticorpos contra microrganismos ou antígenos microbianos, tais como anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA) (82). De forma similar, células T de pacientes com DII podem ser direcionadas a epítomos microbianos, e não a auto-epítomos, sugerindo que, ao contrário do que se imaginava até pouco tempo, as DII, não sejam “autoimunes”. Sabendo que esta interação existe entre bactérias e o hospedeiro, não é de estranhar, que antibióticos tenham sido usados por muitos anos e proporcionam melhora clínica para alguns destes pacientes (83–85).

A diversidade filogenética da microbiota intestinal aumenta com o tempo, até estabilização na idade adulta, quando os filos bacterianos dominantes são os *Bacteroidetes* e *Firmicutes* (86). O envelhecimento resulta em redução da estabilidade do ecossistema intestinal, com diminuição dos *Firmicutes* e aumento de *Bacteroides*, assim como aumento do número dos *Proteobacteria* e redução dos *Bifidobacteria* (68).

Recentemente, uma análise exaustiva feita das comunidades bacterianas intestinais globais, em indivíduos normais, sugere a existência de agrupamentos de enterotipos predominantes (*Bacteroides*, *Prevotella* ou *Ruminococcus*). Não se sabe com certeza o motivo do agrupamento bacteriano, mas, aparentemente, não haveria relação com idade, sexo, nacionalidade ou índice de massa corporal (IMC) (58). Analisando as diferentes comunidades fecais observou-se uma tendência à distinção pelos níveis de *Bacteroides* e *Prevotella*, onde o enterotipo *Bacteroides* está associado com uma dieta “occidental”, rica em proteínas e gordura animal, ao passo que a do enterotipo *Prevotella* é associado a uma dieta rica em carboidratos simples. Especula-se, mas resta ainda ser demonstrado, que este enterotipo ocidental possa ser um fator de risco para desenvolver DII. Disbiose, ou uma mudança definitiva na flora intestinal normal, com uma quebra no mutualismo hospedeiro-microbioma, é uma hipótese cada vez mais atraente como evento definidor no desenvolvimento de DII (58).

Numerosos relatos demonstrando perda de diversidade bacteriana têm sido feitos em ambas as formas de DII, tanto em doença ativa, quanto quiescente, contribuindo para o conceito de microbiota intestinal anormal. Nos pacientes com DII demonstrou-se alteração da composição da flora microbiana, havendo menor número de bactérias com atividade anti-inflamatória e maior número de bactérias

pró-inflamatórias (87–89); por exemplo, o número da protetora *Bacterioides fragilis* está reduzido enquanto que a das *Enterobacteriaceae*, especialmente a *Escherichia coli*, mais virulenta, está aumentada em pacientes com DC (88,90,91). Algumas destas mudanças foram observadas em pacientes com DC ou com RCU, nos quais têm sido observada uma redução do filo *Firmiculites*. Entre os *Firmiculites*, a diminuição de *Faecalibacterium prausnitzii* tem sido bem documentada em pacientes com DC quando comparados com controles (92). Em alguns pacientes com DC ileal tem sido observada a presença de uma cepa de *E. coli* com maior capacidade de aderir e invadir as células epiteliais. Estas bactérias também replicam em macrófagos e estimulam a produção de TNF-alfa pelos macrófagos. Observou-se que o *Fusobacterium varium* adere às regiões inflamadas dos pacientes com RCU e invade a mucosa onde há ulceração.

Outra observação interessante, relatada em pacientes com DII, foi à presença de um número maior de bactérias dentro do muco intestinal, da mucosa e intraepiteliais, quando comparado com indivíduos saudáveis (93). Bactérias com propriedades mucolíticas tais como *Ruminococcus gnavus* e *Ruminococcus torques*, também foram descritas em DII (94). Evidência recente sugere que estas alterações na flora microbiana possam ser, ao menos em parte, secundárias a defeitos na imunidade inata, que serão descritas a seguir (95,96).

Gevers et al descreveram em 2014, uma interessante coorte de novos pacientes com DC que foram examinados antes de iniciar o tratamento, tendo sido coletadas biópsias de múltiplos segmentos do intestino e amostras de fezes. Este estudo observou aumento de enterobacteriácias e depleção de alguns grupos de *Clostridium* (clados IV e XIVa) durante a inflamação associada à doença (Figura 3). Interessante foi também o achado de que esta mudança no padrão bacteriano era

ainda mais pronunciada durante tratamento com antibióticos, sugerindo que a disbiose associada a DC possa aumentar durante tratamento com antibióticos (97).

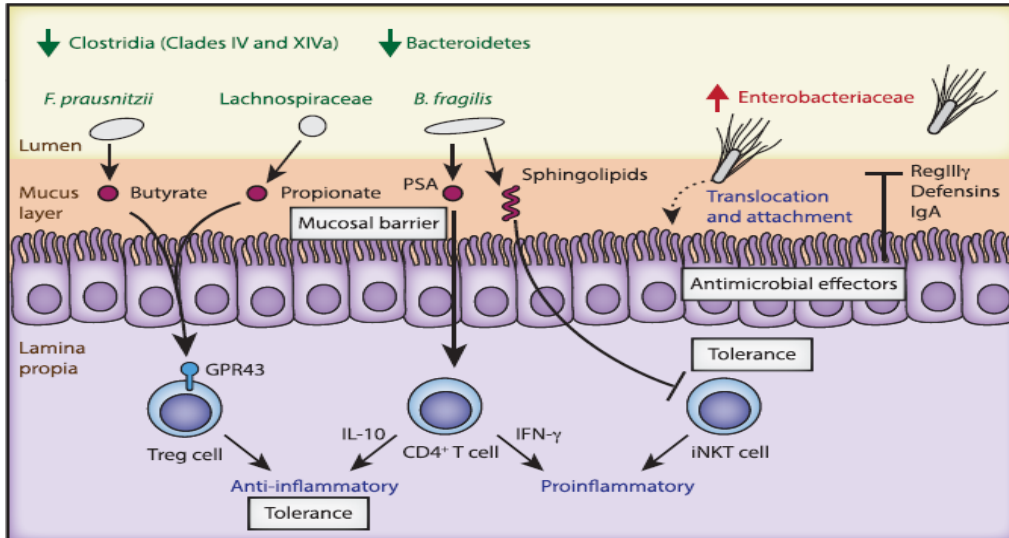
Análise metagenômica tem mostrado que o microbioma alterado em DII tem 25 % menos genes, e estudos metaproteômicos têm demonstrado uma depleção de proteínas e vias funcionais. Nos pacientes com DC encontrou-se alterações do metabolismo bacteriano de carboidratos, das interações bactérias-hospedeiros, além de diminuição de enzimas humanas secretadas pelo hospedeiro. Elucidação do impacto funcional das mudanças vistas na disbiose poderá auxiliar na confecção de medidas corretivas que poderão ajudar no tratamento de pacientes com DII. Acredita-se que fatores genéticos do hospedeiro, especificamente ligados à imunidade inata, devam ter um papel na etiopatogenia da DII. Não se sabe ainda se as mudanças vistas no microbioma intestinal são resultado de uma resposta imune alterada, em um indivíduo geneticamente suscetível, ou se a anomalia do microbioma intestinal leve a uma resposta imunológica anômala em tais indivíduos (24).

Estudos com gêmeos demonstraram que o fenótipo da doença, em vez de o genótipo do hospedeiro, desempenha um papel preponderante em determinar as mudanças na microbiota intestinal. No entanto, estudando a microbiota em um subgrupo de pacientes com e sem os alelos de risco *NOD2* e *ATG16L1*, demonstrou-se que os genótipos alterados tinham uma associação significativa com mudança na composição microbiana, mas o fenótipo da doença também foi importante. O fator de confusão é que estes dois alelos estão associados com DC ileal e não DC colônica. Torna-se difícil atribuir a causa da disbiose a estes defeitos genéticos, mas destaca o papel sofisticado da imunidade inata na DII (98).

A maior, e provavelmente mais ambiciosa, iniciativa de estudar estes microrganismos na última década é o Projeto do Microbioma Humano, patrocinado pelo NIH (*Nacional Institute for Health*), com um orçamento total de US \$115 milhões, para estudar o microbioma humano da saúde e na doença (2). O Projeto tem levado à publicação de 5177 perfis taxonômicos microbianos de uma população de uma amostra de 242 adultos saudáveis, coletados de 15 a 18 sítios do corpo, até três vezes, gerando mais de 3,5 terabases de sequências metagenômicas até agora, que vão servir de base para pesquisa nesta área (2,99).

Esta expansão de conhecimento na última década tem deslocado a busca de fatores ambientais desencadeantes externos para determinantes dentro do complexo microbioma intra-luminal. Antes desta mudança de cenário, o foco estava em procurar um agente patogênico específico dentre a vasta gama de micróbios do lúmen, que pudesse ser responsabilizado por iniciar a cascata inflamatória que é típica de DII. Um dos aprendizados deste recente “renascimento” em pesquisa sobre o microbioma, tem sido adotar um modelo ecológico em microbiologia, em vez do modelo de Koch: “um micróbio”, “uma doença”, que tinha sido o esteio da pesquisa em doenças infecciosas e microbiologia nas décadas anteriores.

Um passo importante em entender a função da microbiota em DII será aprofundar os estudos de associação sobre o microbioma humano, levando em conta as análises moleculares e bioquímicas detalhadas em modelos animais, para decifrar os circuitos celulares e moleculares que conectam produtos microbianos, as vias de sinalização e respostas fisiológicas do hospedeiro (61,97).



**Figura 3: Interações entre a Microbiota Intestinal e a Mucosa Intestinal em DII**

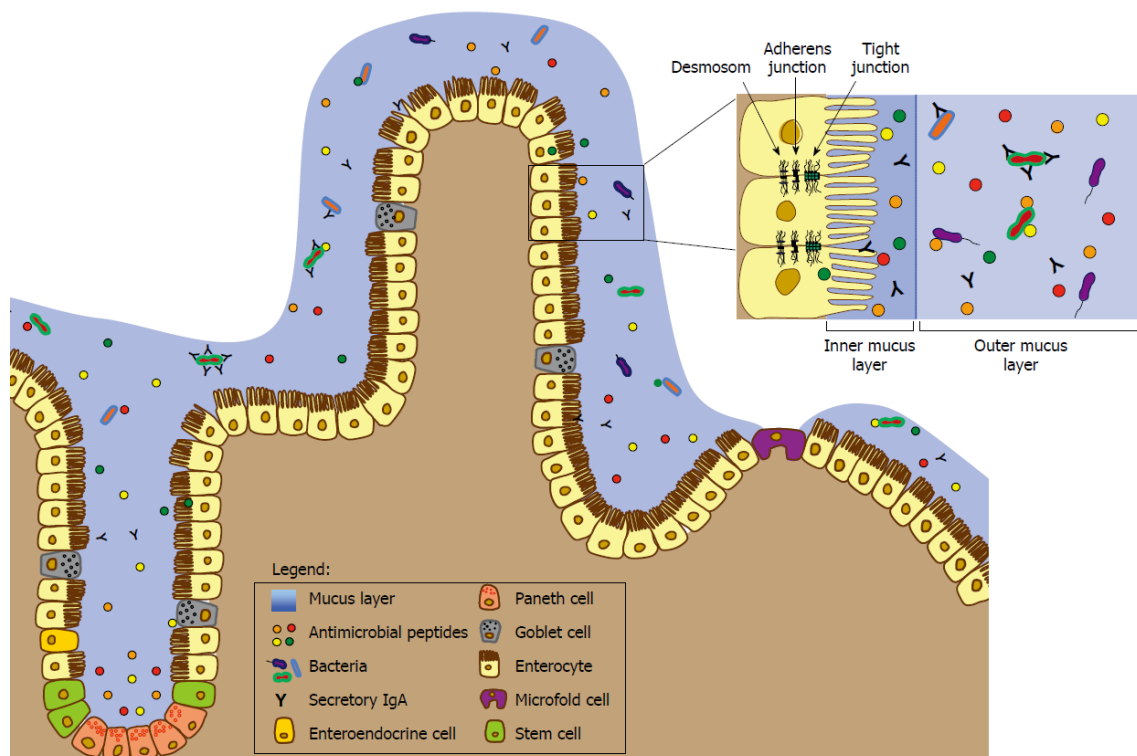
Fonte: (100)

Descrição: Esta ilustração retrata as maiores alterações na composição da microbiota intestinal em DII, os mecanismos para corrigir esta disbiose, e suas consequências funcionais na mucosa do hospedeiro. São mostrados: o lúmen (amarelo), a camada mucosa (marrom), epitélio (borda-em-escova roxa, contendo células), e lâmina própria (parte roxa inferior). As observações mais consistentes de estudos de perfis microbianos são demonstradas (clados com diminuição em DII estão em verde; aumentados em vermelho). Mecanismos microbianos específicos, apoiados por evidência experimental consistente são incluídas. Estes mecanismos incluem a expansão do compartimento das células Treg por butirato produzido por bactérias e inibição da função de células *Natural Killer* intestinais por esfingolípdeos produzidos por micróbios para produzir tolerância, além de fatores antimicrobianos produzidos pelo epitélio. Estes mecanismos estão agrupados em temas expostos em caixas de cor cinza (Adaptado de Huttenhower C et al. *Immunity* 2014;40:843-854).

#### 2.2.2.4. FATORES DA BARREIRA INTESTINAL

O epitélio intestinal desempenha um papel primordial na função da barreira física entre o conteúdo luminal e o interior do indivíduo. Estima-se que a área da superfície de contato do intestino deva medir aproximadamente 300 m<sup>2</sup>, o que o torna a maior porta de entrada para microrganismos no corpo humano (72). Esta não é uma fronteira passiva, de modo que para prevenir adesão e invasão de microrganismos, a mucosa intestinal é equipada com mecanismos variados protetores específicos e inespecíficos que, de forma coletiva, constroem uma barreira complexa e eficiente (Figura 4) (101–103). Este epitélio é constituído de uma camada única com quatro tipos de células diferentes: células colunares, células de Paneth, células

caliciformes e células neuroendócrinas, todas derivadas de células tronco intestinais multipotenciais (104). A superfície do intestino delgado e do grosso difere pelo fato de o delgado apresentar grande quantidade de protrusões (dobras, vilos e microvilos) que potencializam a capacidade de absorver nutrientes. Situado entre as vilosidades estão as criptas de Lieberkühn. O cólon não tem as vilosidades e tem superfície mais plana.



**Figura 4: Mecanismos de defesa da barreira intestinal normal**

Fonte: (74)

Descrição: ilustrados os componentes envolvidos na defesa da mucosa intestinal. A dupla camada de muco (externa e interna), os peptídeos antimicrobianos, a IgA secretora, e as células da parede (enterócitos, células entero-endócrinas, células de Paneth, células caliciformes, células de micropregas (M), e células tronco), e elementos envolvidos na junção intercelular (desmossomos, junções de adesão e junções de oclusão). Adaptado de Antoni L. World J Gastroenterol. 2014;20:1165.

As células absorptivas, os enterócitos e colonócitos, são as mais abundantes no epitélio intestinal. As células caliciformes são especializadas na secreção de muco, enquanto que as células neuroendócrinas produzem peptídeos hormonais

que estão envolvidos no trofismo celular, no reparo tecidual, na angiogênese, na diferenciação de enterócitos e na polarização ao longo do eixo cripta-vilosidade (105,106). O outro tipo de célula-secretora do epitélio intestinal é a célula de Paneth. Esta contém uma grande quantidade de granações secretoras cheias de produtos antimicrobianos ativos, tais como lisozimas, fosfolipase, alfa-defensinas e a proteína 3-alfa. As células de Paneth normalmente estão confinadas ao intestino delgado, onde são localizadas no fundo das criptas de Lieberkühn mantendo as mesmas estereis pela secreção destes peptídeos antimicrobianos (107–110). Além disto, o epitélio intestinal tem as células M, células com micropregas, que fazem parte do epitélio associado aos folículos sobre as placas de Peyer, e são responsáveis pelo transporte de bactérias e antígenos luminiais para as células imunológicas subjacentes (74,111).

O epitélio intestinal tem uma permeabilidade seletiva, permitindo passagem de água, eletrólitos e nutrientes, mas prevenindo a invasão de agentes danosos ou suas toxinas (112). Para que se cumpra este desafio, as células epiteliais intestinais são firmemente interconectadas por diferentes complexos proteicos compostos por junções de oclusão, junções de adesão e desmossomos. Estas conexões intercelulares são necessárias para estabilizar a coesão espacial das células, definindo o limite entre as regiões da membrana apical e basolateral, e são essenciais para a regulação da permeabilidade paracelular. Nestes complexos de adesão intercelular, a interação é feita entre a região extracelular, de proteínas transmembranas específicas, e de sua porção intracelular, via proteínas adaptadas ao citoesqueleto (106,112).

Para a manutenção de uma barreira intestinal efetiva a homeostase epitelial é mantida por um equilíbrio entre proliferação celular e apoptose. Reguladores



importantes desta homeostase são o fator de crescimento transformador alfa (TGF-alfa), que estimula proliferação, e TGF-beta, inibindo crescimento celular, através de vias sinalizatórias. Vital para a renovação epitelial é o a via de sinalização Wnt (*Wingless-related integration site*) (113). Esta via do Wnt/beta-catenina regula a proliferação celular, sendo a via Wnt5a essencial para o desenvolvimento de novas criptas.

Outra forma de proteção contra invasão de microrganismos é a camada de muco que recobre a mucosa. Para sua produção são essenciais as grandes glicoproteínas da família de mucinas formadoras de gel (114,115). A mucina MUC2 é o membro predominante desta família no trato digestivo, sendo produzido pelas células caliciformes (116). No intestino grosso a camada de muco tem duas porções: uma interna, mais compacta, firmemente aderida ao epitélio; e outra, externa, mais frouxa. No cólon normal a camada interna é estéril, evitando contato do epitélio com a população microbiana, enquanto que a externa é colonizada pelas bactérias comensais (106).

A camada de muco também apresenta propriedades antimicrobianas. Vários produtos com ação contra microrganismos foram identificados nesta camada, dentre eles: as defensinas, as cateclidinas, ubiquidinas, lectina REG III-gama (*regenerating islet-derived III gama*), IgA secretória (*Imunoglobulina A*) e membros da família das histonas (117,118). Alguns destes peptídeos antimicrobianos (AMP) estão presentes no intestino normal, apoiando a hipótese de que os AMPs epiteliais são retidos no muco. As mucinas intestinais têm carga negativa, enquanto que as AMPs catiônicas têm carga positiva, de modo que a ligação entre elas ocorre por interação eletrostática.

Peptídeos antimicrobianos fazem parte do sistema imune inato. Os dois grupos mais estudados são as defensinas e as catelicidinas (119). Nos humanos são produzidas as alfa-defensinas e beta-defensinas. Algumas defensinas são produzidas rotineiramente no intestino normal, enquanto que outras o são em situações de inflamação intestinal.

As defensinas humanas são pequenos peptídeos catiônicos com amplo espectro microbicida contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, fungos vírus e protozoários (120), sendo capazes de formar poros na membrana microbiana levando a ruptura das bactérias (121). As células caliciformes também produzem defensinas (122) além das mucinas, que são moléculas estruturais da camada protetora do muco luminal (123). Esta barreira bioquímica e física, com carga negativa, reveste todo o trato digestivo para prevenir a aproximação demasiada dos patógenos ao epitélio (123). Portanto, todo o epitélio intestinal, coberto por escudo de defensinas catiônicas que são fixadas com carga negativa à camada mucosa, formam uma barreira inata do intestino. Em indivíduos normais, esta parede de defesa mantém os microrganismos a uma distância segura do epitélio (106) (Figura 4). Na DII defeitos nesta barreira defensiva permitiria que microrganismos luminiais atacassem o epitélio.

Com relação ao reconhecimento de micróbios e a iniciação de resposta imune, são fundamentais os chamados receptores de reconhecimento de padrões (PRR- *pattern recognition receptors*), que são expressos em vários tipos celulares do trato digestivo, incluindo as células epiteliais e as células imunes. Os mais investigados PRR são os receptores de membrana do tipo *Toll* (TLR) e os receptores intracelulares tipo-NOD (NLR-*Nod-like receptors*). Os receptores citoplasmáticos NOD2 são expressos nas células de Paneth e têm a atribuição de reconhecer os

dipeptídeos muramyl (MDP), componente da parede de bactérias Gram positivas e negativas, desencadeando uma cascata sinalizatória, como o fator nuclear kappa-B (NF-kB), levando à expressão de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas e peptídeos antimicrobianos (102,111,124).

Na DII podem ocorrer defeitos em alguns destes mecanismos de defesa. Alteração nos PRR, na produção de AMPs, defeito na camada de muco, alteração no processo de autofagia ou aumento da permeabilidade da barreira epitelial podem comprometer a barreira protetora, aumentando a aderência e invasão. Desta forma, a reação imune é desencadeada de modo inadequado, resultando em inflamação crônica (74). A presença de bactérias na camada de muco interna e, mesmo intracelulares foi demonstrada em pacientes com DII (125,126) sugerindo deficiência nos mecanismos de proteção.

Alterações da camada de muco têm sido descrita em pacientes com DII, com relação à espessura, composição e estrutura da mucina, principalmente em RCU. A camada de muco é mais fina e menos contínua na RCU, o que poderia tornar a camada celular mais vulnerável aos microrganismos luminiais. Recentemente depleção de muco foi atribuída a um defeito de diferenciação celular das células caliciformes (127).

Alterações dos receptores intracelulares também têm sido descritas em pacientes com DC. A primeira descrição foi no gene *NOD2*, cujos portadores tinham uma redução de produção de defensinas por células de Paneth. Estes pacientes sofrem alteração da atividade antimicrobiana e, como consequência, da colonização do íleo terminal (128). Recentemente, um segundo membro da família-NLR, os NLRP3 (*Pyrin domain containing 3*), têm sido implicado na patogênese de DII, sugerindo aumento de risco para DC (129) através de diminuição de beta-

defensinas, redução de atividade antimicrobiana nas secreções das criptas intestinais e disbiose. O risco seria maior em DC de localização colônica.

Como NOD2 e alfa-defensinas estão ambas envolvidas com células de Paneth de delgado, acredita-se que uma alteração da biologia celular das mesmas tenha um papel relevante na DC. Alguns pacientes com DC ileal apresentam alteração da via de sinalização Wnt e estes níveis se correlacionam com os do *mRNA* de alfa-defensinas em células de Paneth. Como a via Wnt está envolvida diretamente na expressão de alfa-defensina e, também influenciam diretamente a maturação de células de Paneth, existe a hipótese de que a diferenciação deficiente das células de Paneth possa estar envolvida na patogênese de DC (130).

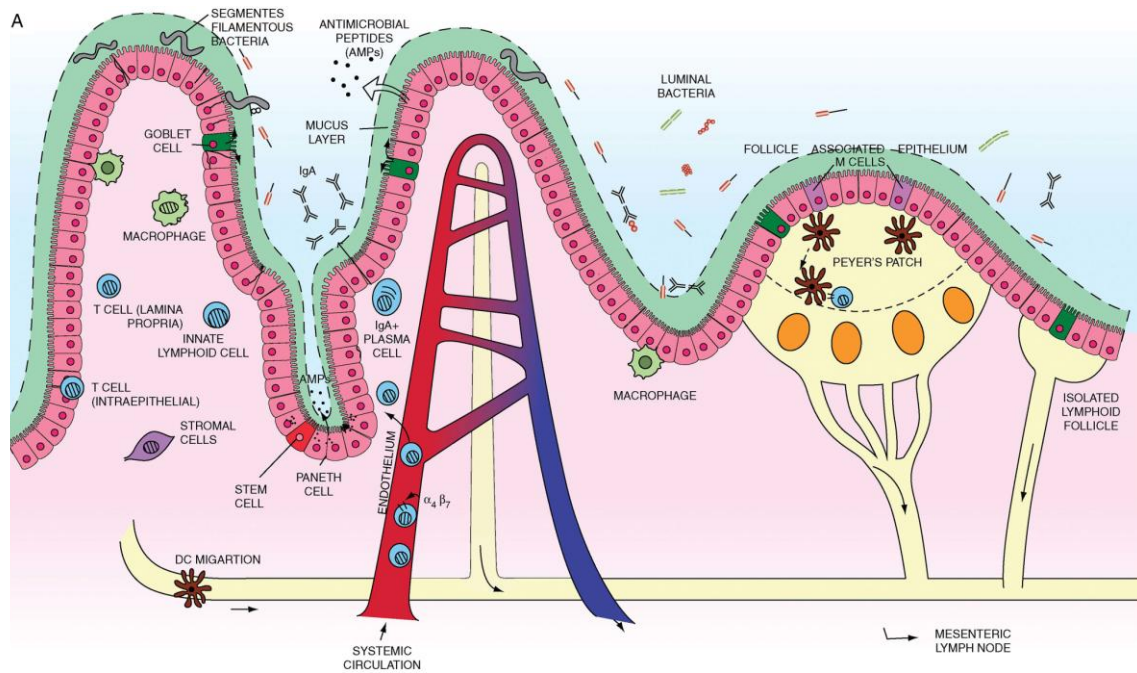
A expressão de proteínas mutantes perturba a dobradura de proteínas no retículo endoplasmático (ER), causando stress-ER, e ativando uma rede de sinalização chamada resposta não resolvida à proteínas mal enoveladas (UPR). Nos últimos anos este sistema tem sido envolvido na patogênese DC e RCU, primeiro por evidência em modelos de animais laboratoriais (131) e, após, por achados em pacientes. A deleção do fator de transcrição XBP1, componente do stress-ER, aumenta o processo inflamatório nestes modelos, nos quais se observou, também, diminuição das células de Paneth e das calciformes. A diminuição de produção de AMP, pela deficiência destas células, diminuiria a ação antimicrobiana nas criptas facilitando invasão e inflamação (132). Neste contexto da relação de stress-ER e DII, dois estudos em animais de laboratório, mostraram deficiência na produção de muco como fator importante no processo inflamatório anormal. Um estudo foi com ratos com deficiência do gene *MUC2* onde se observava diminuição de células calciformes e síntese de muco (133). O outro estudo é referente a gene que codifica proteína AGR2 (*anterior gradient homolog 2*), que está presente no ER de células

epiteliais secretoras do intestino, e é fundamental para a produção de muco, para a resposta ao stress-ER e prevenção de inflamação. Nos ratos com deficiência de AGR2, havia anormalidades nas células caliciformes, células de Paneth, deficiência na produção de muco e aumento de mediadores de inflamação (134,135).

Outro mecanismo importante para a homeostase do intestino é o processo de autofagia, que pode ser ativado em situações de stress, como fome ou de privação de fator de crescimento. Também auxilia na decomposição de bactérias invasoras. Duas alterações genéticas que mediam esta função foram descritas recentemente e estão relacionadas a risco aumentado para DC: o gene *ATG16L1* e *IRGM*. Tanto em modelos animais quanto em pacientes com DC observou-se alterações nas células de Paneth e no processo de autofagia (22,136,137). Num artigo recente, demonstrou-se que os PRR intracelulares NOD1 e NOD2 estão envolvidos na indução de autofagia, através do recrutamento de ATG16L1 até a membrana plasmática, no sítio de entrada das bactérias (138). Como o gene *NOD2* estava mutado e deficiente neste estudo, estes achados forneceram um elo funcional entre os dois genes mais importantes ligados à DC, que são o *NOD2* e *ATG16L1*, e ressaltam a relevância da alteração do processo de percepção e eliminação de bactérias na patogênese de DC (138).

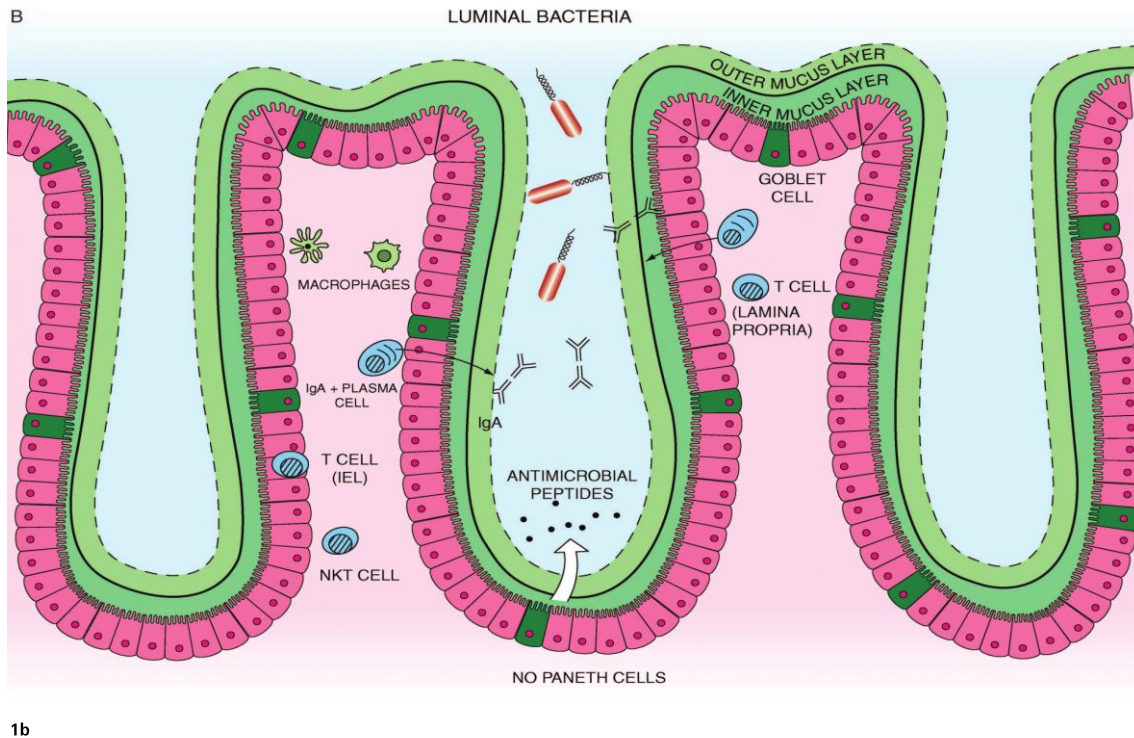
O aumento da permeabilidade intestinal tem sido relatado desde a década de 1980, em crianças com DC (139) e, mais recentemente, em pacientes com RCU (140,141). Alguns estudos demonstraram aumento de permeabilidade de membrana em familiares de primeiro grau de pacientes com DC, levando a crer que este possa ser um fator primário na patogênese da doença, precedendo o desenvolvimento da inflamação (142,143). Os mecanismos moleculares para este aumento de permeabilidade têm sido atribuídos a vários fatores, incluindo anormalidades nas

junções intercelulares (144,145). Apoptose epitelial também aumenta a permeabilidade da membrana. Este fenômeno está aumentado na RCU e na DC. Nestes últimos, Goetz demonstrou aumento do espaço interepitelial na mucosa de pacientes com DC usando a endomicroscopia confocal (146).



**Figura 5: Panorama do sistema imune na mucosa do Intestino delgado**

Fonte: (71) Adaptado de Cader MZ et al. Gut 2013;62:1653-64.



1b

**Figura 6: Sistema imune da mucosa do intestino grosso**

Fonte: (71) Adaptado de Cader MZ et al. Gut 2013;62:1653-64.

### 2.2.2.5. FATORES LIGADOS AO SISTEMA IMUNE

A microbiota do trato gastrointestinal é uma das principais fontes de estimulação imunológica. O epitélio intestinal se situa próximo de uma grande quantidade de microrganismos, havendo uma contínua rede de comunicação entre as células e os micróbios (Figuras 5 e 6). Esta comunicação contínua é essencial para a manutenção da homeostase no indivíduo saudável e, embora seja vital para vários processos: obtenção de nutrientes, competição com microrganismos patogênicos, podem ter efeito danoso, contribuindo com inflamação intestinal (79). Esta homeostase imunológica intestinal depende de uma regulação ativa e recíproca entre a microbiota do lúmen e uma variedade de células imunológicas e não-

imunológicas da mucosa (61). Células epiteliais, células de Paneth, células dendríticas, células T e B secretam uma variedade de fatores solúveis que regulam a quantidade e a qualidade dos micróbios do lúmen. Como contrapartida, os micróbios luminais influenciam o desenvolvimento de folículos linfóides, produção de anticorpos, e células T efetoras e reguladoras na mucosa (147). Conseqüentemente, qualquer alteração de ambos os lados da interface luminal pode levar a uma desregulação do equilíbrio que existe, e inflamação é desencadeada. Não sabemos ainda como a DII é iniciada, o que começa a resposta imune inicial, o que a mantém ativa, mas fatores ambientais e genéticos devem contribuir de forma concomitante para a mesma. Apesar desta lacuna de conhecimento, o padrão de resposta imune tem sido bem caracterizado: em DC há predomínio da resposta Th1 e Th17, traduzido por aumento na produção de IL-12, TNF-alfa, interferon (IFN)-  $\gamma$ , e IL-17A (148), enquanto que em RCU há uma resposta atípica Th2, definida por um aumento na produção de IL-5, fator de crescimento beta (TGF-beta) e IL-13 e baixa de IL-4 (149). Esta divisão é, até certo ponto, arbitrária, já que todas as citocinas estão sempre presentes na mucosa inflamada, e as diferenças são mais quantitativas do que qualitativas. No entanto, este paradigma tem sido útil para o estudo de cada forma de DII, e tem ajudado no desenvolvimento de novas formas de terapia baseada no perfil de citocinas acima mencionadas. Além destas respostas imunes adaptativas, muito tem sido aprendido sobre os defeitos da imunidade inata na DII, principalmente em DC.

Vários mecanismos permitem que a comunicação ocorra entre o conteúdo do lúmen e o sistema imune, despertando ou não reação. A reação pode ocorrer por intermédio da imunidade inata, considerada primeira linha de defesa, e que atua de forma rápida e inespecífica, e da qual fazem parte as células epiteliais, neutrófilos,



macrófagos, células dendríticas e células *Natural Killer* (NK). Pode ocorrer também por meio da adaptativa, na qual o indivíduo desenvolve memória à exposição a determinado antígeno. A imunidade adaptativa pode ser dividida em imunidade humoral (anticorpos) ou celular (linfócitos T) (7,74).

Por muitas décadas a maioria dos estudos focava numa imunidade adaptativa irregular, pois as alterações patológicas observadas na DC e RCU sempre estiveram associadas a uma ação dos linfócitos da mucosa CD-4-T e, portanto, mediadas pela imunidade adquirida. Recentemente, no entanto, verificou-se que a imunidade inata também atua de forma decisiva na resposta inflamatória (7,74).

Nos anos 2000 o foco começou a se deslocar das células T e B, e seus produtos, para células imunes inatas, tais como células epiteliais, células dendríticas, neutrófilos macrófagos e células NK (150). Uma evolução importante no estudo da imunidade em DII foi a compreensão de que a imunidade inata seria diretamente mais relevante na patogênese da doença do que as respostas adaptativas, embora possam ocorrer simultaneamente, mas provavelmente são desencadeadas em fases diferentes da doença. Estudos genéticos demonstraram que vários genes da imunidade inata têm polimorfismos funcionais relevantes (3).

Atualmente a maioria das outras células teciduais está sendo avaliada como participantes da imunidade e da inflamação, incluindo células mesenquimais e endoteliais, queratinócitos e plaquetas, além da matriz acelular extracelular. Com a adoção da ideia expandida do que é “imune” ou do que media a inflamação, e especialmente a inflamação crônica, há a necessidade de reconhecer a importância crucial das interações biológicas, particularmente com componentes da microbiota. Com relação à DII, a fisiopatologia não pode ser mais vista como dependente exclusivamente da resposta de células imunes tradicionais, mas também às células

epiteliais, mesenquimais, endoteliais e neurais, e é a resposta tecidual global que determina a natureza aguda ou crônica do intestino, tais como angiogênese, linfangiogênese, cicatrização e fibrose (6). Como a resposta tecidual à DII envolve mais componentes do que se previa: tanto células imunes quanto não-imunes participam das respostas imunes inatas e adaptativas, todas devem ser avaliadas em detalhe e, eventualmente, consideradas alvos terapêuticos em potencial.

Os dois tipos principais de células mediadoras do processo imune inato são os macrófagos e as células dendríticas. No intestino normal os macrófagos na mucosa expressam um fenótipo não inflamatório com uma baixa produção de citocinas pró-inflamatórias (151). Na DII os macrófagos da mucosa se tornam ativados e são fenotipicamente heterogêneos (152) havendo maior produção de IL-1 alfa, IL-1 beta e TNF-alfa (153). As células dendríticas intestinais são apresentadoras de antígenos e têm participação, tanto na imunidade inata quanto da adquirida, proporcionando proteção e defesa, induzindo tolerância ou inflamação (154,155). Na DII elas estão ativadas e produzem níveis mais altos de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12 e IL-6 (156).

Na DII a imunidade adquirida é mediada predominantemente por linfócitos de mucosa CD-4 T-helper. A linhagem linfocítica efetora varia de acordo com apresentação da doença. Em DC existe uma predominância de linfócitos T-helper tipo 1 (Th1), apresentando um perfil de liberação de citocinas baseadas no TNF, interferon gama (IFN-gama) e interleucina 12 (IL-12). Também ocorre liberação de IL-17, por um subgrupo de células chamadas T-helper 17 (Th17). Os pacientes com RCU apresentam uma predominância de linfócitos T-helper tipo 2 (Th2), havendo maior aumento na liberação de IL-5, IL-13, e fator de crescimento Beta (TGF-beta). Ocorre também, na RCU a produção aumentada de IL-13 pelas células T NK, na

mucosa inflamada. Embora em menor número, também há aumento de Th 17 na RCU (7,148,149).

Outro grupo de células T são as reguladoras (Treg), cujas funções são monitorar e prevenir ativação excessiva do sistema imunológico, evitando dano tecidual (157,158). Acredita-se que o equilíbrio entre a ação deste grupo Treg e as células efetoras T-helper é que garantem a homeostase imunológica da mucosa intestinal. Em pacientes com DII ocorre uma diminuição do número ou da função deste grupo supressor desta forma, o que talvez contribua para manutenção da atividade inflamatória (159,160).

Com relação ao papel modulador do sistema imune intestinal com os microrganismos intestinais, um estudo recente mostrou que os *Bacteroides* e os *Clostridium* induzem a expansão de células T reg, reduzindo inflamação (78). Além de proporcionar as SCFA, tal como o butirato, que estimulam o incremento das T reg, ocorre a produção de polissacarídeo A, que tem efeito imunoprotetor através do aumento da IL-10. Também se acredita que os *B fragilis* produzam esfingolipídeos, que atuam sobre as células NK intestinais, diminuindo sua ativação (100). Outros membros da microbiota podem atenuar a inflamação da mucosa, regulando a ativação do NF-kB (161).

Numerosos relatos têm apontado polimorfismos de genes da imunidade inata que controlam o reconhecimento e processamento de componentes bacterianos, incluindo *NOD2*, *TLR4*, *TRL5*, *ATG16L1* e *IRGM* (162). Além disso, defeitos na função de macrófagos têm sido relatados em pacientes com DC, sugerindo que a resposta inflamatória aguda esteja defeituosa neste tipo de DII e possa ser a causa da formação de granulomas e inflamação persistente (163). É provável que a reatividade imune alterada, que media a inflamação e dano tecidual em DII, seja

altamente complexa e, possivelmente, variável ao longo do curso da doença, mas certamente tanto as vias de imunidade inata e adaptativa estão envolvidas.

Como foi citado anteriormente, a barreira intestinal tem mecanismos que permitem a comunicação entre os elementos presentes no lúmen intestinal, o epitélio que reveste o intestino e o sistema imune subjacente. Os receptores de membrana PRR são essenciais para diferenciar “amigo de inimigo” nesta interação complexa e são fundamentais para saber como fatores genéticos levam a um ambiente imunológico anormal, onde microrganismos comensais possam levar a inflamação crônica patológica. Em pacientes com DII este equilíbrio está alterado como resultado de defeitos no reconhecimento imunológico ou das estratégias de manejo/depuração. Na superfície e no interior das células epiteliais há receptores da membrana que permitem o reconhecimento de antígenos luminiais. Estes atuam como iniciadores da resposta imune inata, dando ao hospedeiro a habilidade de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Os PAMPs são partículas microbianas comuns, tais como: lipopolissacarídeos, peptidoglicans, flagelina e lipoproteínas (164), e que permitem ao sistema imune inato reconhecer bactérias. O hospedeiro reconhece os PAMPs com o auxílio de receptores que reconhecem padrões (PRR- *pattern recognition receptors*), dos *toll-like receptors* (TLR) e receptores intracelulares *nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD). Polimorfismos nos genes que codificam estes receptores têm sido descritos ao longo dos últimos 15 anos. Entre a família NOD, o NOD2 está envolvido de forma crucial na patogênese de DII. É expresso no epitélio e reconhece os dipeptídeos muramyn (MDP) que estão presentes nas bactérias gram-negativas e gram-positivas (165,166). Mutações específicas do gene *NOD2* (Arg702Trp, Gly908Arg e leu1007fsinsC) são relacionadas a aumento da suscetibilidade a DC ileal (18,167). O

risco de desenvolver DC ileal é duas a quatro, e 20 a 40 vezes, respectivamente, para portadores de mutações hetero e homozigóticas deste gene (168). Os TLR detectam padrões moleculares microbianos e associados a dano e são, portanto, envolvidos na manutenção da flora comensal e homeostase mucosa (169). No intestino normal TLR são expressos em pequena quantidade não apenas em células epiteliais, mas também em monócitos, macrófagos e células dendríticas (170). Em DII, seu perfil de expressão está alterado (169,171); por exemplo, TLR3 está diminuído na DC ativa, mas não na RU e TLR5 está aumentada nas duas formas de DII (169,171). Recentemente TLR4 Asp299Gly foi descrito, tanto para RCU como para DC. Essencialmente, estes receptores fornecem um sinal de perigo que, entre outros efeitos, estimulam a formação de alfa e beta-defensinas (172,173). O epitélio colônico normal expressa normalmente uma variedade de PRR embora seus níveis de expressão sejam baixos, com muitos receptores localizados lateralmente ou junto à base, desta forma diminuindo interação com antígenos luminiais. Ainda assim, as células epiteliais intestinais são responsivas a ligantes TLR e respondem às bactérias comensais secretando proteínas antimicrobianas e citocinas que facilitam interações intracelulares (174,175).

Peptídeos antimicrobianos são efetores importantes da imunidade inata. Estes peptídeos têm um raio de ação amplo e incluem bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e vírus. A produção de defensinas pode ser induzida por ativação por citocinas ou TLR, e pode modular respostas imunes adaptativas (176,177).

### 2.2.3. DEFENSINAS

Desde o final do século XIX, era conhecida a ação antimicrobiana de algumas secreções, do sangue e de tecido linfáticos. Entre 1920 e 1950 muitos compostos antimicrobianos isolados destas secreções demonstravam ter ação contra bactérias Gram positivas e Gram negativas (178). A lista de compostos incluía uma substância do muco nasal (mais tarde chamado de lisozima), proteínas básicas antimicrobianas e polipeptídeos teciduais lineares básicos. Embora as proteínas básicas maiores fossem tidas como frações de histonas e protaminas, a identidade dos polipeptídeos teciduais menores não era conhecida (179). Desta forma iniciou-se a pesquisa de peptídeos antimicrobianos. Pouco tempo após, substâncias antimicrobianas foram purificadas de extratos de grânulos fagocíticos por Hirsch (180) e correlacionadas com compostos nestes grânulos (181–183) com baixo peso molecular, incluindo proteínas bactericidas que aumentava a permeabilidade da membrana (184). Este campo expandiu-se ainda mais quando Lehrer isolou e purificou as defensinas em mamíferos (185).

Os peptídeos antimicrobianos são classificados de acordo com sua estrutura e composição de aminoácidos. As defensinas são as mais estudadas, e contêm menos de 100 aminoácidos, tendo peso molecular de 3000 a 4500 (186). Defensinas são pequenos peptídeos catiônicos com amplo espectro microbicida contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, fungos, vírus e protozoários (120). Elas são capazes de formar poros na membrana microbiana levando a ruptura das bactérias (121). As defensinas possuem uma estrutura sequencial característica, contendo 6 resíduos de cisteínas e 3 ligações dissulfureto intramoleculares (187). De acordo com a posição de três ligantes característicos intramoleculares dissulfuretos, as defensinas podem ser classificadas em três grandes subgrupos: alfa, beta e teta-

defensinas (188). As primeiras duas são defensinas que ocorrem nos humanos, portanto será sobre estas que iremos revisar. A teta-defensina ocorre apenas em primatas não-humanos. As ligações de dissulfureto entre cisteínas nas alfa-defensinas ocorrem entre a primeira e a sexta cisteína (Cys1-Cys6), Cys2-Cys4 e Cys3-Cys5, enquanto que nas beta-defensinas as ligações são entre as Cys1-Cys5, Cys2-Cys4 e Cys3-Cys6.

As defensinas são abundantes em vários tecidos. As alfa-defensinas humanas têm sido identificadas como tendo seis membros, os peptídeos neutrofílicos humanos 1-4 (HNP-1, HNP-2, HNP-3 e HNP-4), porque estão localizadas nos grânulos azurofílicos de neutrófilos circulantes. No trato gastrointestinal, alfa-defensinas são abundantemente expressas principalmente confinadas ao intestino delgado, de acordo com a presença de neutrófilos na lâmina própria (189). As alfa-defensinas são sintetizadas como pré-propeptídeos. Por outro lado, as outras duas alfa-defensinas humanas-5 (HD-5) e defensina-6 (HD-6) (também conhecidos como DEFA5 e DEFA6), são expressas na base das criptas no intestino delgado, nas células de Paneth (190,191). Ao contrário dos HNPs, as alfa-defensinas humanas-5 (HD5) são liberadas como propeptídeos que são ativados extracelularmente (187,188). Células de Paneth são as principais fontes destas duas defensinas entéricas no intestino delgado (192).

Por outro lado, as beta-defensinas humanas (HBD) incluem 4 subgrupos que são expressos em múltiplos sítios, HBD-1, HBD-2, HBD-3 e HBD-4 (8). Em contraste, beta-defensinas estão ausentes dos neutrófilos humanos ou células de Paneth. No cólon, células epiteliais e células plasmáticas da lâmina própria são as principais produtoras de HBD. Células epiteliais expressam HBD-1, normalmente na mucosa, enquanto que, HBD-2, HBD-3 e HBD-4 são induzidos no sítio de infecções

ou inflamações por estímulos bacterianos variados (117). Células plasmáticas do cólon também expressam HBD-2, -3 e -4, no entanto não é claro se esta expressão é constitutiva ou induzível (193).

A principal característica das células de Paneth, situadas na profundidade das criptas do intestino delgado, é manter as criptas estéreis pela secreção destes peptídeos antimicrobianos (107). Células caliciformes também produzem defensinas (122) além de mucinas, que são moléculas estruturais da camada protetora do muco luminal (123). Esta barreira bioquímica e física com carga negativa reveste todo o trato digestivo para prevenir a aproximação demasiada dos patógenos ao epitélio (123). Portanto, todo o epitélio intestinal, recoberto por um escudo de defensinas catiônicas que são fixadas com carga negativa à camada mucosa, formam uma barreira inata do intestino. Em indivíduos normais, esta parede de defesa mantém os microrganismos a uma distância segura do epitélio (106) (Figura 4). Na DII ocorrem defeitos nesta barreira.

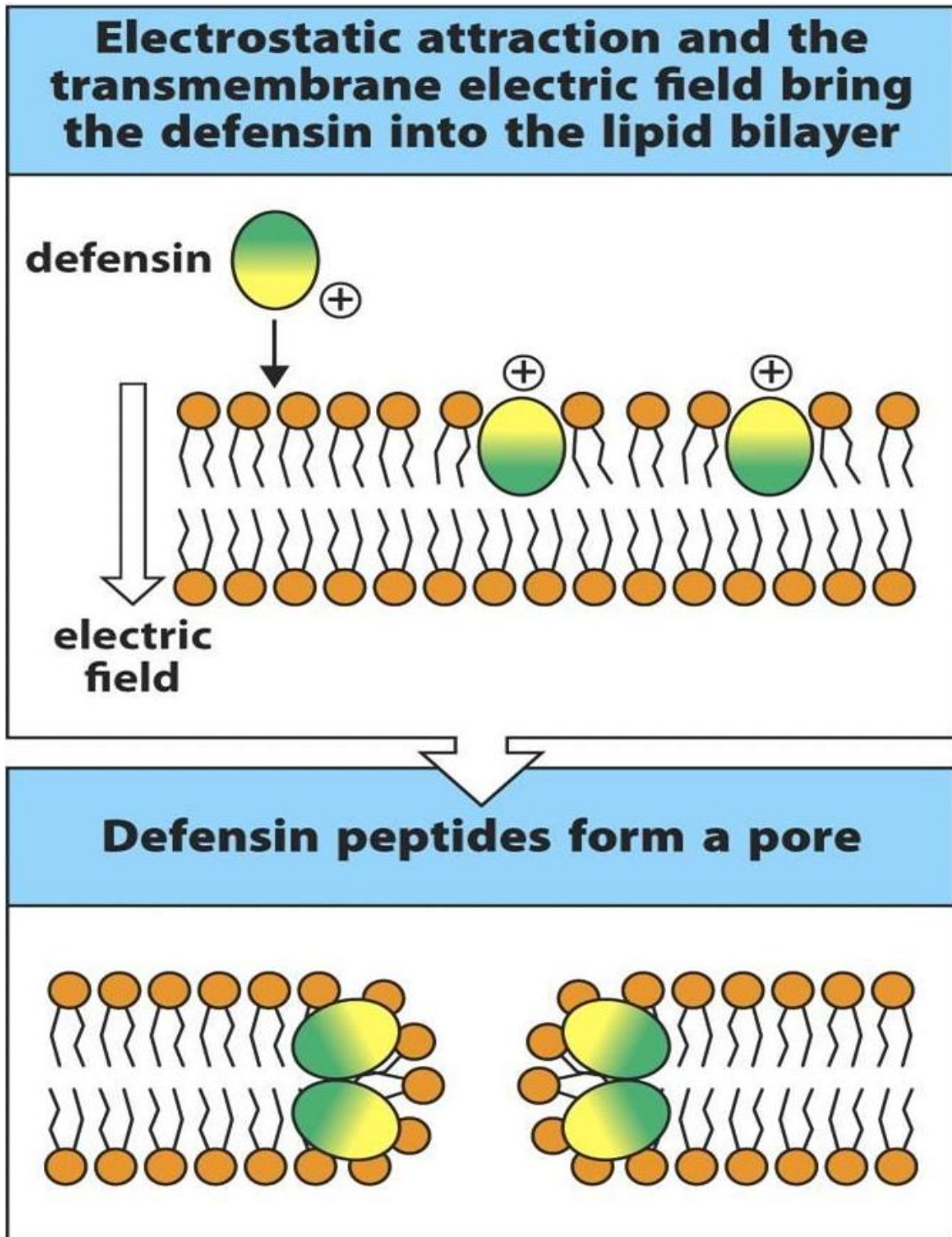
### **2.2.3.1. ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS DEFENSINAS**

Defensinas são produzidas por fagócitos profissionais, células de Paneth e células epiteliais. Sua expressão disseminada sugere que ela desempenhe um papel importante na manutenção da estabilidade da população microbiana. Defensinas têm uma ação antimicrobiana para Gram-positivos, Gram-negativos, fungos e certos vírus (194). Como outros peptídeos antimicrobianos catiônicos, acredita-se que o mecanismo bactericida consista em romper a membrana da célula alvo (195–197). Defensinas interagem com grupos fosfolipídicos da camada externa das células alvo, repondo lipídios no seu lugar e, assim enfraquecendo a membrana. Como resultado haveria desintegração da membrana (figura 7).



Defensinas humanas alfa, especialmente o HD-5 é ativo contra muitas espécies tais como bactérias Gram-positivas (ex: *Listeria monocytogenes* e *S.aureus*), Gram-negativos (ex: *E. coli* e *S. typhimurium*) e fungos (*C.Albicans*) (198,199). Surpreendentemente, a defensina humana alfa HD-6 tem pouca atividade antimicrobiana in vitro, a despeito de suas propriedades de carga iônica similar. A beta-defensina humana HBD-1, assim como HBD-6, tem menos atividade antibacteriana. O HBD-2 tem especificidade contra bactérias Gram-negativas como *P. aeruginosa* e *E. coli*, mas apresentam menos atividade contra bactérias Gram-positivas. Em contraste, a HBD-3 tem potência maior contra Bactérias Gram-positivas (ex: *S. aureus*) (200,201). Defensinas também influenciam a colonização da microbiota intestinal, porque alguns microrganismos são mais sensíveis do que outros. Portanto, a composição da população microbiana está sendo moldada por estes peptídeos.

Muita evidência sugere que as defensinas interagem com células imunológicas do hospedeiro, fornecendo uma ponte entre as respostas imunes inatas e a imunidade adaptativa.



**Figura 7: Mecanismo de ação das defensinas**

Fonte: (202)

Descrição: atração eletrostática e o campo elétrico transmembrana trazem as defensinas para dentro da dupla camada lipídica, criando poros na membrana (Adaptado de Murphy KM. Janeway's Immunobiology. 2011. p.888. Garland Science).

### 2.2.3.2. DEFENSINAS E IMUNIDADE INATA

A imunidade inata é o mais primitivo sistema de defesa contra patógenos. As defensinas protegem as células epiteliais e células plasmáticas desativando vários patógenos microbianos e exotoxinas bacterianas específicas no trato gastrointestinal (203).

A atividade antimicrobiana das defensinas permite que a mucosa gastrointestinal mantenha um equilíbrio entre a proteção de patógenos e tolerância à flora normal (204). Expressão reduzida ou função atenuada de defensinas resulta em aumento na frequência e severidade das infecções intestinais (205). Muitos estudos têm sugerido que a deficiência de defensinas é um evento basilar na patogênese de DII, levando à invasão bacteriana e inflamação.

### 2.2.3.3. DEFENSINAS E IMUNIDADE ADAPTATIVA

Ademais, defensinas poderiam servir como uma ponte entre a imunidade inata e a resposta imune adaptativa. Defensinas intestinais agem como fator quimiotático para células T, monócitos, células dendríticas imaturas, beneficiando o início da resposta imune adquirida e auxiliando no recrutamento de células do sistema imune. HNP-1-3 podem agir de forma seletiva atraindo monócitos, células T imaturas, células dendríticas imaturas, via um receptor de proteína G (206).

As beta-defensinas humanas induzem a migração de células T em repouso e células dendríticas imaturas, interagindo com o receptor quimiotático CCR 6 (*Chemokine receptor 6*), promovendo, como consequência, resposta imune adaptativa. Alguns trabalhos mostram que a HBD-2 tem estrutura similar com o ligante quimiotático natural CC (CCL) 20 e poderia ser um competidor efetivo (38,207). Como os receptores tipo-*Toll* (TLR-4), ligante endógeno, o HBD-2 poderia

combinar com TLR-4 levando a ativação do NF-kB, e migração para o núcleo, para ativar a transcrição do gene da quimiotaxia, ativando células T, e desencadeando uma forte resposta adaptativa imune (208).

#### **2.2.3.4. DEFENSINAS EM DII**

Muitos estudos demonstraram o papel da expressão deficiente de defensinas em doenças entéricas humanas. A relação entre as defensinas e as células de Paneth foi demonstrada através de pesquisa das alfa-defensinas (HD-5 e HD-6), revelando seu papel na etiologia da DII. Por outro lado, as beta-defensinas são produzidas pelas células epiteliais e células plasmáticas no cólon, não estando claro se são produzidas de modo constitutivo ou se são induzíveis. Uma disfunção das defensinas no epitélio poderia deixar a mucosa menos eficiente em matar bactérias, permitindo que penetrem a barreira epitelial. Portanto, o papel das defensinas na patogênese da DII deve ser avaliado por inteiro (176,177,209).

#### **2.2.3.5. ALFA-DEFENSINAS EM DII**

Células de Paneth são a principal fonte de alfa-defensinas no intestino delgado, sendo localizadas na base de criptas, desta forma protegendo as células tronco epiteliais. As células de Paneth secretam uma variedade de proteínas e peptídeos antimicrobianos. As alfa-defensinas (HD-5 e HD-6) são as mais abundantes e são expressas desde o período pré-natal (210). Estudos recentes proveem evidência de que a expressão reduzida das defensinas de células de Paneth podem ser um dos efetores chave na patogênese da doença de Crohn ileal. Nos últimos anos tem evoluído a hipótese de que a expressão reduzida de alfa-defensinas possa comprometer as defesas do hospedeiro (176,177).

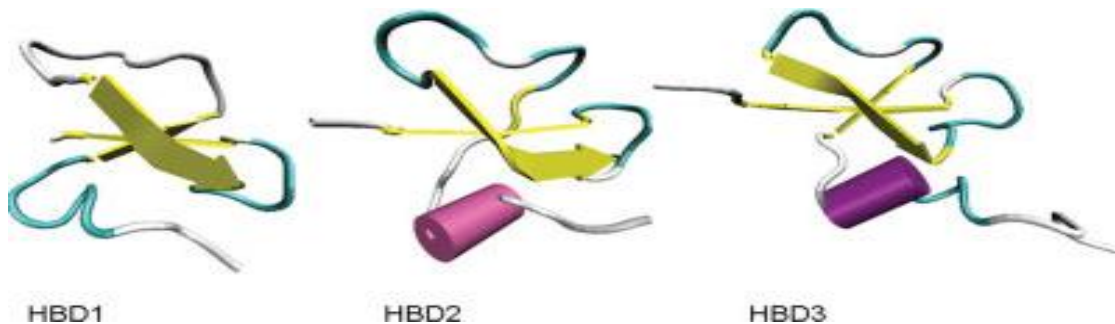
O déficit foi demonstrado em DC ileal e não em DC do cólon ou RU (211), independente do grau de processo inflamatório. Estudos também tem demonstrado um vínculo entre mutações (do tipo “*frame shift*”) do *NOD2*, um importante receptor intracelular de reconhecimento para os dipeptídeos muramyl, e as células de Paneth (95). Em estudos de modelos animais, naqueles com déficit no gene *NOD2* havia diminuição de alfa-defensinas, e incapacidade de detectar os dipeptídeos muramyl (108). Nos pacientes com mutações do *NOD2*, existe diminuição das alfa-defensinas (189). Esta teoria fornece um novo mecanismo para a patogênese de DC ileal, no entanto, o mecanismo ainda não é claro.

Estudos recentes têm investigado o possível papel do sistema de sinalização Wnt e sua relação com a expressão de defensinas em DII. Demonstrou-se que o caminho de sinalização Wnt media o déficit de defensinas na maioria dos pacientes que não tem a mutação do *NOD2*. Sinalização Wnt, que é transduzido através de beta-catenina/Tcf-4, tem sido apontada como o circuito regulatório chave para a diferenciação e indução de maturação de células de Paneth nas criptas intestinais (212). Dados de estudos recentes mostram que há redução do fator de transcrição Tcf-4 da via de sinalização Wnt em DC ileal, independente da intensidade do processo inflamatório. Os níveis de Tcf-4 mRNA em DII ileal está diminuída e apresenta relação com mRNA HD-5 e HD-6 (213). Por outro lado, verificou-se que a associação entre alfa-defensinas das células de Paneth e Tcf-4 era independente da genotipagem *NOD2*.

Outras alfa-defensinas são expressas em células epiteliais intestinais fora das células de Paneth. As defensinas HNP1-3 podem ser vistas na superfície de mucosa colônica inflamada (214), podendo aumentar o seu mRNA, tanto em DC como em RU, dependendo da intensidade do processo inflamatório (215). Os níveis de HNP1-

3 circulantes são compatíveis com a contagem de leucócitos e neutrófilos em DC, mas não em RCU. Os níveis plasmáticos de HNP 1-3 refletem o grau de resposta inflamatória e funciona como um biomarcador do processo inflamatório da DC (216). Não está claro se a inflamação intestinal provoca a expressão epitelial aumentada destas defensas, ou se elas são tomadas pelos enterócitos de neutrófilos adjacentes.

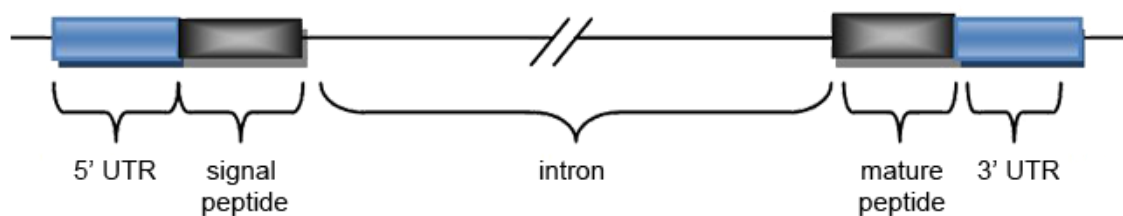
### 2.2.3.6. BETA-DEFENSINAS EM DII



**Figura 8: Estrutura espacial das beta-defensinas**

Fonte: (217)

Descrição: estrutura das beta-defensinas humanas 1, 2 e 3 (Adaptado de (Taylor K et al. Biopolymers 2008; 90:1-7)



**Figura 9: Estrutura do mRNA, incluindo as UTRs**

Fonte: <http://cm.jefferson.edu>

Como o cólon é um ecossistema complexo, as células epiteliais proporcionam uma barreira quimiomecânica potente, incluindo a HBD-1 (218). A HBD-1 é

produzida normalmente pelas células epiteliais do cólon. Evidências apontam para uma redução em nível de mRNA nas variantes do gene *HBD-1* e expressão de HBD-1 na mucosa colônica de pacientes com DC e RU (219). Várias associações de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) de *HBD-1* foram feitas com pacientes com DC colônica (220). Ademais, HBD-1 é inversamente associada com marcadores sorológicos em pacientes com DC, apoiando o conceito de seu papel na defesa da imunidade da mucosa (221).

Ao contrário do HBD-1, as outras HBDs estão ausentes do cólon normal. No entanto, a expressão de HBD-2, HBD-3 e HBD-4 são induzidas por inflamação e estímulos bacterianos em pacientes com DC e RU (205). Síntese colônica de HBD 2-4 depende de ativação do sistema NF- $\kappa$ B, estimulado por citocinas inflamatórias, incluindo o TNF- $\alpha$  (222), indicando haver expansão de defesa dos HBD 2-4 em situações de aumento de inflamação.

Recentemente vários estudos tem demonstrado que o HBD-2 tem um papel central em aumentar a função de barreira do intestino. No cólon normal, a expressão de HBD-2 é baixa, mas aumentada no epitélio inflamado. A expressão de mRNA *HBD-2* está aumentada em pacientes com DC e RU quando comparado com controles. A expressão de HBD-2 é aumentada nos pacientes com RU quando comparada com os com DC (223). Observa-se também, aumento de expressão em mucosa inflamada quando comparado com mucosa não inflamada (224). Há evidência apontando o NOD2 como sendo o mediador da indução do HBD-2 na DC colônica e RU. Estudos genéticos têm mostrado que um número menor de cópias do gene *HBD-2*, no locus das beta-defensinas, predispõe a DC colônica (225).

Duas beta-defensinas com um espectro antimicrobiano diferente, HBD-3 e HBD-4, parecem seguir este padrão de distribuição, embora seus níveis de

expressão de mRNA sejam menores (127). A expressão colônica de HBD-3 e HBD-4 também são maiores em RCU do que em controles. Não há diferença entre controles e DC colônica (226). Parece que HBD 3-4 possam ser apenas aumentadas como consequência dos eventos inflamatórios, não tendo um papel na patogênese da doença. No entanto, estudos futuros são necessários para definir esta questão.

A defensina HBD1 foi a primeira a ser descoberta. Ela é expressa em múltiplos tipos de células do sistema imune tal como macrófagos, monócitos, células dendríticas e leucócitos. Várias células epiteliais também expressam HBD1, incluindo do intestino (227,228). Inicialmente achava-se que o HBD1 era expresso rotineiramente, mas evidência recente sugere que sua expressão seja regulada sob condições específicas. Além disso, sabe-se que o HBD1 tem propriedades quimioatrativas para células de memória T e células dendríticas, através do receptor de citocinas CC, sugerindo ter um papel importante em inflamação (229,230). HBD1 também está envolvido na apoptose celular. Vários tumores têm diminuição da expressão de defensinas, tais como câncer de próstata e de rim, para inibir apoptose e aumentar a progressão tumoral. Portanto, a expressão do gene *DEFB1* e o papel dos seus polimorfismos são de importância significativa na saúde humana (231,232). Além disso, uma frequência menor do genótipo GG em SNP C-44G, *DEFB1* C-44, que abriga um sítio de ligação do NF- $\kappa$ B, tem sido relatado em pacientes com DC, sugerindo que a troca do alelo C por G possa aumentar o fator protetor para DC (220).

Para avaliar a associação do gene *DEFB1* com DII nosso grupo comparou a expressão dos SNPs da área não traduzida 5' do gene *DEFB1* (233). Embora não tenhamos encontrado uma associação clara e firme entre a suscetibilidade/proteção



do SNPs '5-UTR *DEFB1* e DII, a associação foi limítrofe, particularmente para os pacientes com DC de cólon.

Uma meta-análise de 2015 avaliou seis estudos, incluindo o do nosso grupo, analisando a associação de polimorfismos do gene *DEFB1* com suscetibilidade a doenças digestivas (Tabela 1). Avaliando o somatório dos seis grupos, os autores observaram associação significativa dos SNPs localizados na região reguladora do *DEFB1* com DC, particularmente na região não-traduzida-'5, rs11362 (G-20-A), rs 1800972 (C-44G), e rs 1799946 (G-52-A) (Tabela 2) (234).

Nossos achados, e a meta-análise subsequente, reforçam a impressão de que estudos em grupos maiores, ou estudos que envolvam vários centros, devam ser realizados para auxiliar no esclarecimento do papel que a *DEFB1* possa desempenhar em DII, fazendo associações e estratificando por fenótipo da doença.

Os resultados acumulados de pesquisa sobre defensinas terá uma influência sobre futuras estratégias terapêuticas direcionadas a restauração da homeostase do hospedeiro.

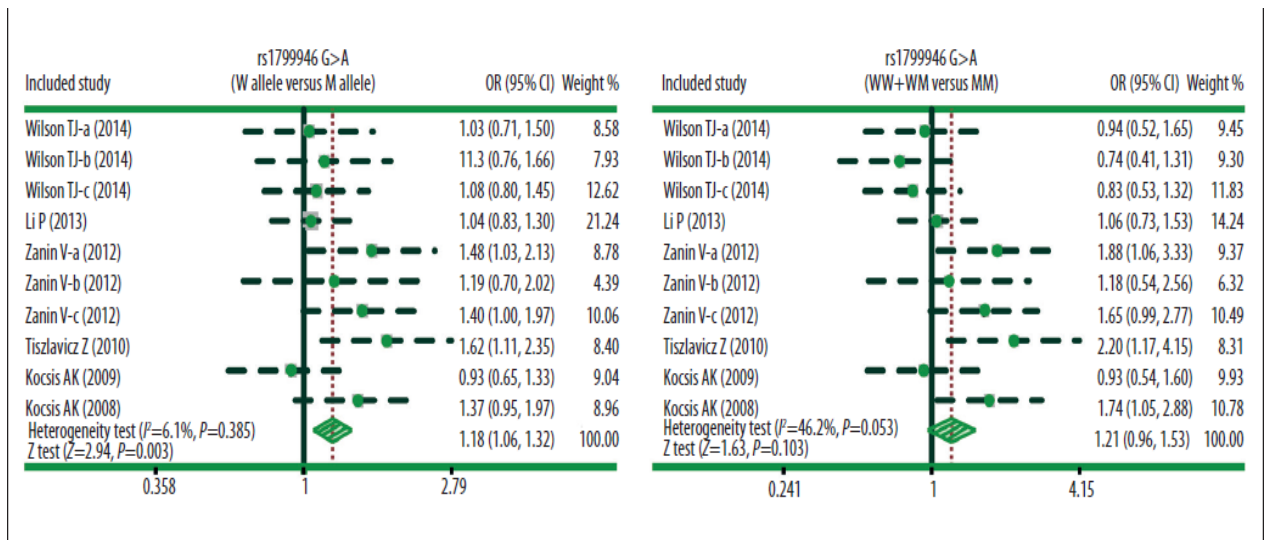
**Tabela 1: Metanálise avaliando polimorfismo do *DEFB1* e doenças digestivas**

Table 1. Baseline characteristics of included studies. Six case-control studies were included in this meta-analysis.

First author	Year	Country	Disease	Sample size		Gender (M/F)		Age (years)		Genotyping methods	SNP
				Case	Control	Case	Control	Case	Control		
Wilson TJ [10]	2014	Brazil	IBD	149	200	75/74	100/100	–	–	DS	rs11362 G>A rs1800972 C>G rs1799946 G>A
Li P [8]	2013	China	UC	300	302	161/139	157/145	40.4±13.8	42.0±14.6	Mass Array	rs1799946 G>A
Zanin V-a [9]	2012	Italy	CD	108	130	–	–	36.5±14.0	31.3±12.4	DS	rs11362 G>A rs1800972 C>G rs1799946 G>A
Zanin V-b [9]	2012	Italy	UC	37	130	–	–	38.2±15.7	31.3±12.4	DS	rs11362 G>A rs1800972 C>G rs1799946 G>A
Tiszlavicz Z [30]	2010	Hungary	SAP	124	100	75/49	65/35	58.0±6.9	45.0±8.9	TaqMan assay	rs11362 G>A rs1800972 C>G rs1799946 G>A
Kocsis AK [5]	2009	Hungary	Chronic gastritis	150	100	–	53/47	–	26.0±15.0	PCR-RFLP	rs11362 G>A rs1800972 C>G rs1799946 G>A
Kocsis AK [29]	2008	Hungary	CD	190	95	108/82	50/45	36.4±12.9	26.0±15.0	PCR-RFLP	rs11362 G>A rs1800972 C>G rs1799946 G>A

M – male; F – female; IBD – inflammatory bowel disease; UC – ulcerative colitis; CD – Crohn's disease; SAP – severe acute pancreatitis; a and b represent two different diseases in one study; DS – direct sequencing.

Fonte: (234)

**Tabela 2: Metanálise mostrando associação positiva do SNP RS 179946 G>A com doença de Crohn**

Fonte: (234)

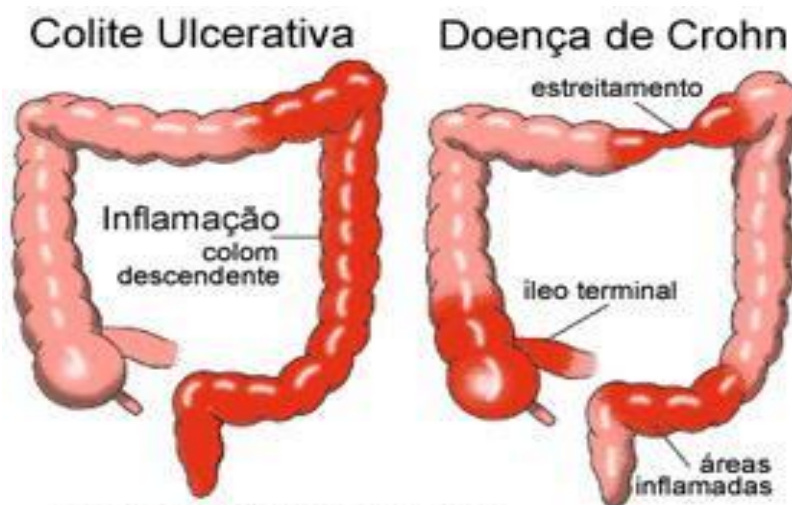
## **2.2.4. QUADRO CLÍNICO E MANEJO**

### **2.2.4.1. QUADRO CLÍNICO**

A sintomatologia da DII depende da localização no trato digestivo e da intensidade do processo inflamatório (Figura 10). Na RU os sintomas característicos são diarreia sanguinolenta, podendo haver dor abdominal em cólica, urgência ou tenesmo. O quadro clínico é caracterizado por períodos de exacerbação e remissão de sintomas, sendo que aproximadamente 50 % têm uma recidiva ao ano, enquanto uma minoria tem doença de comportamento contínuo, com recidivas mais frequentes. Após o primeiro ano de doença, aproximadamente 90 % dos pacientes estão inteiramente capacitados para o trabalho (definido como um mês de afastamento do trabalho por ano), embora, para uma minoria, RU cause dificuldade para manter-se empregada. No passado a RU tinha morbidade e mortalidade elevadas, mas graças ao progresso no manejo clínico e cirúrgico ela tem, atualmente, uma mortalidade que se mantém um pouco acima do da população em geral nos primeiros dois anos de diagnóstico, apresentando pouca diferença, nos anos subsequentes. No entanto, uma crise severa de RU ainda é uma doença que ameaça a vida. Em torno de 20-30 % dos pacientes que iniciam a doença como uma pancolite acaba sendo submetido à colectomia (235).

Assim como na RU, o quadro clínico de DC também se caracteriza por exacerbações e remissões. Sintomas de DC são mais heterogêneos, uma vez que pode afetar qualquer porção do trato digestivo (Figura 11), mas inclui tipicamente, dor abdominal, diarreia por mais de seis semanas, anemia e perda de peso. Estes sintomas devem levantar suspeita de DC, especialmente nos mais jovens. Sintomas sistêmicos de indisposição, anemia, anorexia ou febre são mais comuns em DC do

que em RU. Anemia sem explicação e deficiência no crescimento em crianças também devem ser consideradas para evitar diagnóstico tardio. Dor abdominal e perda de peso são vistos em 70 e 60 % dos pacientes com DC antes do diagnóstico. Sangue e/ou muco nas fezes podem ser vistas em até 40 a 50 % dos pacientes com colite por Crohn, mas menos frequentes em RU. Fístulas anais estão presentes em 10 % dos pacientes ao diagnóstico e pode ser a queixa inicial (236).



Locais de Manifestação das Doenças Inflamatórias Intestinais

Figura 10: Envolvimento intestinal na Retocolite Ulcerativa e na Doença de Crohn

Fonte: <http://www.proctosite.com>



**Figura 11: Envolvimento do trato digestivo por Doença de Crohn**

Fonte: <http://www.proctosite.com>

Embora seja comum haver início insidioso da DC, também pode ocorrer uma apresentação mais aguda, e ileíte terminal aguda por DC pode ser confundida com apendicite aguda. Por ser um processo inflamatório transmural a DC pode causar obstrução devido a estenoses, fístula (frequentemente perianais), ou abscessos. A mortalidade global de DC é levemente superior ao da população normal, sendo maior nos primeiros dois anos após o diagnóstico, e naqueles com doença no trato digestivo superior. DC tende a causar maior incapacidade do que RU, com apenas 75 % dos pacientes em plena capacidade laboral no ano de diagnóstico e com 15% dos pacientes incapazes para o trabalho após 5-10 anos de doença. Tanto colite ulcerativa como colite por Crohn estão associadas a um risco aumentado de carcinoma colorretal (236).

Pacientes podem apresentar manifestações extra-intestinais de DC antes das gastrointestinais se tornarem evidentes. Anormalidades do sistema musculoesquelético são as manifestações mais comuns de DII, incluindo

articulações centrais e periféricas. Manifestações extra intestinais são mais comuns quando a DC afeta o cólon (12,235).

#### **2.2.4.2. DIAGNÓSTICO**

O diagnóstico de DII é confirmado por avaliação clínica e uma combinação de investigações laboratoriais, endoscópicas, histológicas e exames de imagem.

No caso de RU o diagnóstico deve ser feito com base em suspeita clínica, apoiado em achados endoscópicos macroscópicos característicos, achados histológicos típicos na biópsia, e exames de fezes negativos para agentes biológicos. Para DC o diagnóstico depende da demonstração de inflamação focal, assimétrica e, muitas vezes, granulomatosa, mas as investigações selecionadas variam de acordo com a sintomatologia, achados clínicos e complicações (237).

Investigação laboratorial deve procurar sinais de resposta inflamatória aguda ou crônica, anemia, desidratação, sinais de desnutrição ou má absorção. Exames iniciais recomendados seriam: hemograma completo, exames de função hepática, velocidade de sedimentação globular, proteína C reativa, além de exames microbiológicos para diarreias infecciosas, incluindo pesquisa de toxina de *Clostridium difficile*. Testes adicionais investigando agentes biológicos específicos podem ser necessários para quem viajou para o exterior. Outros marcadores também podem ser usados para identificar inflamação intestinal ativa, particularmente calprotectina fecal. A calprotectina fecal é uma proteína liberada por neutrófilos em resposta à presença de processo inflamatório no intestino (238).

Alguns marcadores sorológicos imunológicos podem ser úteis no diagnóstico diferencial de RU e DC, no entanto não são absolutamente específicos. O anticorpo

anti-citoplasma de neutrófilos de padrão perinuclear (p-ANCA) está presente em 20-85% dos pacientes com RU e 2-28% dos com DC. O anticorpo anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA) está presente em 39-76 % dos pacientes com DC e até 15 % dos pacientes com RU (239).

Para todo o paciente com diarreia, retossigmoidoscopia rígida deve ser realizada, a não ser que haja plano imediato de realizar retossigmoidoscopia flexível ou colonoscopia. Características macroscópicas de RU são a perda do padrão vascular, granularidade, friabilidade, e ulcerações da mucosa retal (Figura 13). Uma biópsia do reto deve ser feita para exame histológico, mesmo sem haver alterações macroscópicas (235,240).

Para doença leve a moderada, colonoscopia é preferível, em geral, à retossigmoidoscopia flexível, porque a extensão da doença pode ser avaliada; mas em doença moderada a severa, há um risco maior de perfuração intestinal e retossigmoidoscopia flexível é mais segura. É adequado postergar a investigação do restante do cólon até que condições clínicas melhorem.

Havendo suspeita de DC a avaliação envolve, muitas vezes, endoscopia digestiva alta e baixa, além de exames que permitam visualizar o intestino delgado. Para avaliar a extensão da DC no intestino recomenda-se colonoscopia até o íleo terminal. O aspecto endoscópico característico no cólon é envolvimento segmentar com ulcerações, que podem ser do tipo aftóide até, grandes, assimétricas e descontínuas, muitas vezes, em meio à mucosa de aspecto normal (Figura 12). Biópsia do íleo terminal durante a colonoscopia documenta a extensão do exame e pode achar evidência microscópica de DC. A DC afeta mais frequentemente o íleo terminal e o ceco, porém sabe-se que ela pode envolver qualquer segmento do tubo digestivo. (235). A avaliação do delgado pode ser feita com exame contrastado de

trânsito intestinal ou com exames de imagem com TC ou RM que utilizem contraste do delgado. As características principais da RU e DC estão na Tabela 3.

**Tabela 3: Características da Doença de Crohn e da Retocolite Ulcerativa**

<b>Doença de Crohn</b>	<b>Retocolite ulcerativa</b>
Reto frequentemente poupado	Reto sempre envolvido
Lesões saltitadas	Envolvimento uniformemente contínuo
Úlceras aftóides	Perda do padrão vascular
Aspecto em pedra de calçamento	Enantema difuso
Úlceras longitudinais e serpiginosas	Aspecto granular da mucosa
Fístulas	Não há fístulas
Ulceração no íleo terminal	Aparência normal do íleo terminal
Presença de estenose	Ausência de estenose

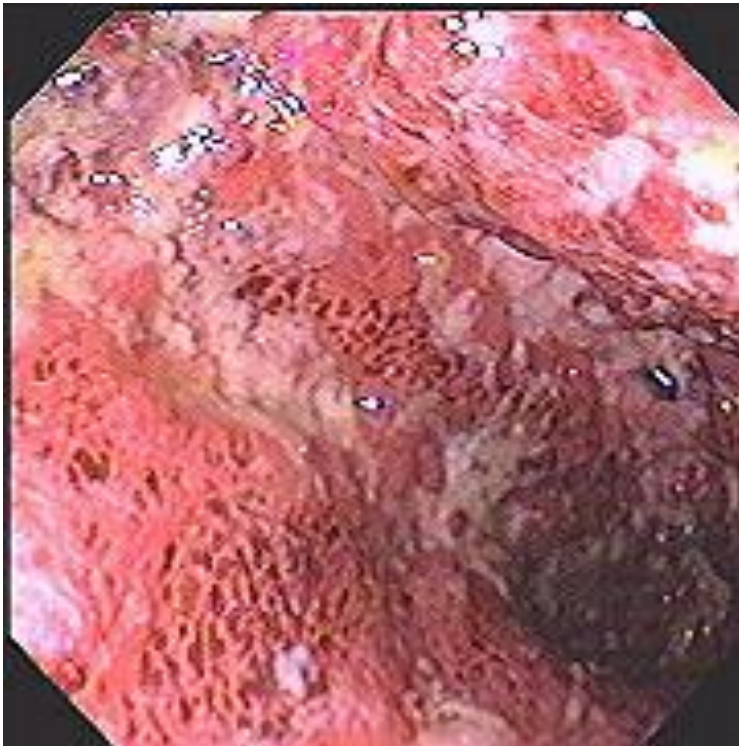
Fonte: (241)





**Figura 12: Aspecto endoscópico típico da Doença de Crohn**

Fonte: <http://www.proctosite.com.br>



**Figura 13: Aspecto endoscópico típico de retocolite**

Fonte: <http://www.proctosite.com.br>

Vários exames de imagem podem ser úteis para definir diagnóstico, auxiliar na conduta e seguimento dos pacientes com DII. Radiografia do abdômen é de grande utilidade na avaliação inicial do paciente com suspeita de DII severa: exclui dilatação colônica e pode auxiliar na definição da extensão de RU ou identificar constipação proximal. Em DC a radiografia do abdômen pode dar a impressão de massa em fossa ilíaca direita ou pode mostrar evidência de dilatação de intestino delgado (235).

O exame de trânsito intestinal (TI), no qual o paciente é radiografado após ingerir contraste, permite uma avaliação de todo o trato digestivo alto, identificando dilatações, estenoses ou ulcerações no delgado. As enterografias feitas por Ressonância Magnética Nuclear (RM) ou com o uso da Tomografia Computadorizada (TC) são exames diagnósticos com alta capacidade de detectar envolvimento do intestino delgado e lesões transmurais em DC (235).

Ultrassonografia abdominal é uma técnica adicional útil para avaliar inflamação do intestino, mas a acurácia diagnóstica é menor e é operador-dependente.

A TC ou RM do abdome são recomendadas para avaliação de complicações extra-murais de DC.

Exame a cápsula endoscópica deve ser reservado para os pacientes nos quais a suspeita clínica de DC se mantém alta apesar de avaliações negativas com ileocolonoscopia e exames radiológicos do delgado (TI, CT ou MR).

Enteroscopia com duplo balão (DBE) deve ser reservado para situações específicas onde biópsias de áreas suspeitas são importantes para o diagnóstico, ou onde dilatação de alguma estenose é factível (235).

### 2.2.4.3. CLASSIFICAÇÃO

A classificação de doença inflamatória intestinal e o sistema de escores são ferramentas importantes que auxiliam na definição de condutas terapêuticas, permite manter um banco de dados confiável e permite comparar resultados de diferentes séries de pacientes. Tanto na RU quanto na DC é importante de definir a extensão do envolvimento do intestino e a intensidade da atividade inflamatória. Vários escores e sistemas de classificação foram propostos para analisar dados e uniformizar a linguagem ao longo dos anos. Os principais serão expostos abaixo.

Durante Congresso Mundial de Gastroenterologia em Viena, em 1998, foi proposta classificação de DC que leva em conta a idade do diagnóstico (<40 ou > ou = a 40 anos), a localização (íleo terminal, cólon, íleocolônica e trato gastrointestinal superior) e o comportamento patológico da doença (não-estenosante, não-penetrante; estenosante; e penetrante). Esta Classificação de Viena passou a ser usada largamente (242). Para incluir outros dados relevantes, no Congresso Mundial de Montreal, em 2005, algumas modificações foram acrescentadas, conforme sumarizado na tabela abaixo (tabela 4) (243,244). Neste mesmo evento, recomendou-se uma subclassificação para RCU abordando extensão (tabela 5) e grau de atividade clínica (tabela 6). Recentemente, o grupo de estudo Europeu sobre DII, no Congresso da ECCO (*European Crohn's and Colitis Organisation*), ratificou a recomendação de usar estas classificações (236).

**Tabela 4: Classificação de Vienna e Montreal para doença de Crohn**

	Vienna	Montreal
Age at diagnosis	A1 below 40 y A2 above 40 y	A1 below 16 y A2 between 17 and 40 y A3 above 40 y
Location	L1 ileal L2 colonic L3 ileocolonic L4 upper	L1 ileal L2 colonic L3 ileocolonic L4 isolated upper disease*
Behaviour	B1 non-stricturing, non-penetrating B2 stricturing B3 penetrating	B1 non-stricturing, non-penetrating B2 stricturing B3 penetrating p perianal disease modified†

\*L4 is a modifier that can be added to L1–L3 when concomitant upper gastrointestinal disease is present.  
†“p” is added to B1–B3 when concomitant perianal disease is present.

Fonte: (236)

**Tabela 5: Classificação para extensão da RCU – Montreal**

<b>CLASSIFICAÇÃO</b>	<b>DEFINIÇÃO</b>
E1 – proctite ulcerativa	Envolvimento limitado ao reto
E2 – colite esquerda	Envolvimento até ângulo esplênico
E3 – colite extensiva	Envolvimento além do ângulo esplênico

Fonte: (244)

**Tabela 6: Classificação de extensão da Doença de Crohn – Montreal**

<b>Localização</b>	<b><u>Modificador TGI superior</u></b>
L1 – íleo terminal	L1 + L4
L2 – cólon	L2 + L4
L3 – 76leocolônica	L3 + L4
L4 – TGI superior	

Fonte: (244)

**Tabela 7: Classificação de Montreal para o grau de atividade da Retocolite Ulcerativa**

Severity		Definition
S0	Clinical remission	Asymptomatic
S1	Mild UC	Passage of four or fewer stools/day (with or without blood), absence of any systemic illness, and normal inflammatory markers (ESR)
S2	Moderate UC	Passage of more than four stools per day but with minimal signs of systemic toxicity
S3	Severe UC	Passage of at least six bloody stools daily, pulse rate of at least 90 beats per minute, temperature of at least 37.5°C, haemoglobin of less than 10.5 g/100 ml, and ESR of at least 30 mm/h

ESR, erythrocyte sedimentation rate.

Fonte: (236)

Diferentes sistemas de análise da apresentação da DII foram propostos para melhorar o manejo do doente com RCU e DC.

#### **2.2.4.3.1-DOENÇA DE CROHN**

Na DC os sistemas de avaliação medem parâmetros de atividade clínica, endoscópica e doença perianal. Para avaliação clínica, os índices mais usados são o índice de atividade da doença de Crohn (IADC) e o índice de Harvey-Bradshaw. Para avaliação e classificação das lesões perianais, usa-se o índice de atividade da doença perianal (IADP).

O IADC foi desenvolvido em 1976 (245), tendo sido usado amplamente até a presente data. Utiliza 8 variáveis objetivas e subjetivas, necessitando de 7 dias para contagem de pontos acumulados. Em uma escala de pontuação de 0 a 600, é possível classificar entre resposta e remissão clínica (queda de 70 a 100 pontos sugere resposta clínica; valor total < ou = a 150 pontos sugere remissão) e atividade moderada com pontuação IADC > 220 e grave com valor de IADC > 450 (245–247).

As variáveis subjetivas e o tempo de sete dias necessários para completar a avaliação são fatores limitantes (tabela 8).

**Tabela 8: Índice de atividade da doença de Crohn (IADC)**

Número de evacuações líquidas (diariamente por 7 dias)	x 2
Dor abdominal (nenhuma = 0, leve = 1, moderada = 2, intensa = 3)	x 5
Sensação de bem-estar (bem = 0, desconfortável = 1, ruim = 2, péssimo = 3, terrível = 4)	x 7
Número de complicações (artrite/artralgia, irite/uveíte, eritema nodoso/ pioderma gangrenoso ou estomatite aftosa, fissura/fístula ou abscesso anal, outras fístulas, febre > 37,8° C)	x 20
Uso de difelionato ou loperamida (não = 0, sim = 1)	x 30
Massa abdominal (não = 0, questionável = 1, com certeza = 5)	x 10
Hematócrito (homens: 47 – Ht%, mulheres: 42 – Ht%)	x 6
Peso ( 1 – peso / peso padrão x 100. Adicione ou subtraia segundo o sinal)	x 1
<b>Total</b>	

Fonte: <http://www.gedib.com.br>

Uma alternativa mais simples, que dispensa o acompanhamento durante 1 semana e a medida do peso, é o índice de Harvey-Bradshaw. É um método validado, de fácil uso e que avalia: sensação de bem estar, dor abdominal, número de evacuações líquidas diárias, presença de massa abdominal e complicações da DC (artralgia, uveíte/irite, eritema nodoso, úlceras aftóides orais, pioderma gangrenoso, fissuras anais, fístulas e abscessos) (248). Existe risco de subjetividade na pontuação de dor abdominal e sensação de bem-estar (tabela 9).

Tabela 9: Índice de Harvey-Bradshaw para doença de Crohn

<b>Bem-estar geral</b>	0 = muito bem, 1 = levemente abaixo da média 2 = ruim 3 = muito ruim 4 = péssimo
<b>Dor abdominal</b>	0 = ausente 1 = leve 2 = moderada 3 = intensa
<b>Número de evacuações líquidas por dia</b>	
<b>Massa abdominal</b>	0 = ausente 1 = duvidosa 2 = definida 3 = definida e dolorosa
<b>Complicações</b>	Artralgia, uveíte, eritema nodoso, aftas, pioderma gangrenoso, fissura anal, fístula recente, abscesso - 1 ponto cada

Fonte: [http:// www.gedib.com.br](http://www.gedib.com.br)

O índice de atividade da doença perianal (IADP) foi desenvolvido pelo impacto que esta manifestação tem sobre a qualidade de vida do paciente com DC. Avalia em escala de graduação e pontuação, cinco variáveis: drenagem, dor/restrição de atividades, restrição de atividade sexual, tipo de doença perianal e graus de endurecimento. Cada categoria é avaliada em uma escala de 5 pontos, que vai desde ausência de sintomas (0 pontos) a sintoma severo (4 pontos); uma pontuação maior indica doença mais grave (249).

A avaliação endoscópica da DC tem sido caracterizada e baseada em uma série de lesões da mucosa: eritema, úlceras aftóides e de tamanho e profundidade variadas, *cobblestoning*, fístulas e estenoses (250). No final da década de 80 o grupo francês para estudo das doenças inflamatórias intestinais (GETAID) desenvolveu um índice denominado: Índice de Severidade Endoscópica de Doença

de Crohn (ISEDC). Este dividia o intestino em cinco segmentos (reto, sigmóide+descendente, transverso, ascendente+ceco e íleo terminal), sendo as lesões classificadas pelo tipo de lesão (ulcerações rasas ou profundas, estenoses ulceradas e não ulceradas), e sendo feito também, uma estimativa da superfície intestinal acometida. Este instrumento foi extensamente utilizado em ensaios clínicos multicêntricos, sendo aprovado para avaliação da atividade endoscópica (251). Embora fosse um instrumento validado, o seu uso rotineiro apresentava algumas limitações. O mesmo era de aplicação demorada e, nos ensaios clínicos com uso de corticoide, havia uma falta de correlação entre atividade clínica da DC e aspectos endoscópicos (252). Recentemente tem sido constatada a importância que a cicatrização da mucosa tem para minimizar risco de progressão da DC. Em 2004 Daperno e al. realizaram um trabalho para a criação e validação de um escore endoscópico simplificado (SES-CD) para avaliação da DC, onde levava em consideração 4 variáveis: úlceras, proporção da superfície coberta pelas úlceras, proporção de superfície coberta por outras lesões e estenoses. Cada variável foi classificada em uma pontuação de 0 a 3 em cada seguimento. As úlceras foram classificadas conforme o seu tamanho (diâmetro de 0,1-0,5 cm, 0,5- 2,0cm, ou > 2,0cm). A proporção de superfície ulcerada expressas em porcentagem (<10%, 10-30%, ou >30%) bem como a proporção da extensão da superfície afetada (<50%, 50-75%, ou >75%). As estenoses foram avaliadas pelo número e pela possibilidade de serem ou não ultrapassadas pelo colonoscópio (Tabela 4). Desta forma este escore que é mais simples e possui uma boa correlação com o CDEIS, além de baixa variabilidade interobservador contempla desfechos clínicos e endoscópicos (253).



Tabela 10: Definições do Escore Endoscópico Simplificado para Doença de Crohn

Valores do escore endoscópico simplificado para DC				
Variável	0	1	2	3
<b>Tamanho das Úlceras</b>	nenhuma	Úlceras aftóides 0,1-0,5cm	Úlceras grandes 0,5-2cm	Úlceras maiores > 2 cm
<b>Superfície ulcerada</b>	nenhuma	<10%	10-30%	>30%
<b>Superfície afetada</b>	nenhuma	<50%	50-75%	>75%
<b>Presença de Estenoses</b>	nenhuma	Única, pode ultrapassar	Múltiplas, pode ultrapassar	Não podem ultrapassar

Fonte: (253)

Para avaliar a recorrência endoscópica após cirurgia por DC, foi criado o escore de Rutgeerts, que avalia o aspecto da mucosa do íleo e o número de ulcerações aftóides (254).

#### 2.2.4.3.2-RETOCOLITE ULCERATIVA

Os sistemas de avaliação de RCU incluem aspectos clínicos, laboratoriais e endoscópicos.

O sistema de classificação proposto por Truelove e Witts em 1955 (255) tinha por objetivo avaliar a gravidade do surto agudo no paciente com RCU. Avaliando número de evacuações, sangramento, febre, frequência cardíaca, valor de

hemoglobina e velocidade de hemossedimentação (VHS), este sistema estratifica a doença em leve, moderada e severa, conforme tabela abaixo (tabela 11).

Na RCUI os achados endoscópicos são importantes para definir o grau de atividade da doença, sendo o método mais objetivo para avaliar e quantificar o dano à mucosa do cólon. A extensão deve ser definida em RU distal (proctite ulcerativa), de cólon esquerdo (colite esquerda) ou pancolite (colite extensiva), (256,257).

O escore de Mayo integra dados clínicos e endoscópicos, e, diferentemente do sistema criado por Truelove e Witts, permite acompanhar e mensurar mudanças no quadro clínico. Hábito intestinal, sangramento retal, aspecto da mucosa visto por endoscopia e aspecto clínico pessoal são anotados conforme a tabela abaixo (tabela 15). Atualmente este é o escore mais utilizado em ensaios clínicos (258).

**Tabela 11: Índice de atividade de Truelove e Witts (Oxford)**

	<b>Leve</b>	<b>Moderada</b>	<b>Severa</b>
<b>Nº de evacuações</b>	< ou = 4	5	> ou = 6
<b>Sangramento vivo</b>	+ -	+	++
<b>Temperatura (°C)</b>	Normal	Intermediário	> 37,5°C à noite ou > 37,8°C 2 – 4 dias
<b>Pulso</b>	Normal	Intermediário	>90 bpm
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	> 10	Intermediário	< ou = 10
<b>VSG (mm/h)</b>	< ou =	Intermediário	>30

Fonte: (255)

Tabela 12: Índice de atividade de Mayo

Índice de atividade de Mayo	
<b>Mayo Score - RCU</b>	
<b>Frequência de evacuações</b>	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Número normal para o paciente</li> <li>2. 1 a 2 evac. a mais do que o normal</li> <li>3. 3 a 4 evac. a mais do que o normal</li> <li>4. 5 ou mais evac. a mais do que o normal</li> </ol>	
<b>Sangramento retal</b>	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Sem sangramento</li> <li>2. Raios de sangue com fezes em menos da metade das vezes</li> <li>3. Evidente sangue com fezes na maioria das vezes</li> <li>4. Sangue sem fezes</li> </ol>	
<b>Achados da endoscopia</b>	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Normal ou doença inativa</li> <li>2. Doença leve (eritema, padrão vascular diminuído, friabilidade leve)</li> <li>3. Doença moderada (intenso eritema, padrão vascular ausente, friabilidade, erosões)</li> <li>4. Doença intensa (sangramento espontâneo, ulceração)</li> </ol>	
<b>Avaliação clínica global</b>	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Normal</li> <li>2. Doença leve</li> <li>3. Doença moderada</li> <li>4. Doença intensa</li> </ol>	

*A avaliação médica global leva em consideração a queixa diária do paciente de desconforto abdominal, a sensação geral de bem-estar, achados do exame físico e o desempenho do paciente para atividades diárias.*

**ESCORE**

≤2 s/ nenhum

Subescore &gt; 1

3 -5

6-10

11-12

**GRAVIDADE**

Remissão clínica

Atividade Leve

Atividade Moderada

Atividade Grave

## **2.2.5. TRATAMENTO**

Nas últimas duas décadas o conhecimento sobre doença inflamatória intestinal evoluiu de forma espetacular, no entanto, as estratégias de tratamento, até o presente, têm permitido apenas o controle destas doenças crônicas, e não a cura (259). A etiologia precisa não é conhecida, portanto a terapêutica específica dirigida ao agente causal ainda não está disponível (235). A abordagem terapêutica clínica atual é baseada em medicamentos que exercem uma ação direta (ex: corticóides e imunossupressores) ou indireta (ex: antibióticos) na cascata inflamatória de ambas as doenças (260–262). Desta forma a maioria dos medicamentos é aprovada tanto para RU quanto para DC, tendo como meta a promoção do controle da doença e a melhora a qualidade de vida relacionada à saúde destes pacientes (263).

Os medicamentos usados no tratamento clínico das DII no presente são os salicilatos, corticosteróides, antibióticos e imunossupressores. Estes agentes suprimem a resposta do hospedeiro à bactérias que penetraram o epitélio, e desta forma, reduzem a inflamação secundária. Eles podem ser acompanhados de vários efeitos colaterais potencialmente graves, incluindo infecções oportunistas (264).

### **2.2.5.1. TRATAMENTO CLÍNICO**

#### **2.2.5.1.1. DERIVADOS SALICÍLICOS**

A sulfassalazina tem sido o medicamento usado na primeira linha de tratamento de doenças inflamatórias intestinais desde a década de 50 (265). Ela consiste em um composto ativo, o ácido 5-aminossalicílico (5-ASA), combinada com a sulfapiridina através de uma ligação azo. Esta ligação torna o medicamento

estável em pH ácido e impede a absorção do 5-ASA no estômago e intestino delgado. Ao chegar ao intestino grosso, a ligação azo é desfeita, por ação bacteriana, permitindo que a sulfapiridina seja absorvida e eliminada através do metabolismo hepático e urinário, e a porção ativa, o 5-ASA, segue agindo topicamente na mucosa colorretal. Acredita-se que o 5-ASA tenha ação anti-inflamatória através de inibição de citocinas (interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral alpha (TNFalfa), IL-2, IL-8, e fator nuclear kappa beta (NF-kB) (266,267), inibição de prostaglandinas, de síntese de leucotrienos e eliminação de radicais livres (268–270). Para permitir o uso isolado da porção terapêutica, também denominada mesalazina (5-ASA), desenvolveram-se diferentes cápsulas resistentes ao pH ácido, permitindo a liberação no intestino delgado ou no grosso, conforme a propriedade desejada. Por ter ação tópica, a mesalazina também foi desenvolvida na forma de supositório e enemas, para administração nos pacientes com doença distal.

A mesalazina é a primeira linha de tratamento para RU leve a moderada, podendo ser administrada por via oral, principalmente nos pacientes com doença extensa, ou tópica na forma de supositório ou enema, se a doença for limitada à porção distal do intestino grosso. O uso concomitante de medicação oral e tópica tem sido usado com boa tolerância e resultados mais eficazes nestes pacientes com doença extensa (271).

O uso dos salicílicos não é recomendado apenas na doença ativa, mas também para a manutenção da remissão (237,272). Há evidência de que seu uso tenha benefício no longo prazo, para prevenção de formação de displasia e neoplasia colorretal nos pacientes com doença extensa de longa duração (273).

Nos pacientes com DC com atividade no intestino grosso, a indicação é mais controversa, havendo evidência mais limitada dos seus benefícios. Existe um aparente benefício para os pacientes com doença ativa leve a moderada no intestino grosso, mas não no delgado. Também não há suporte atual para o uso dos salicílicos para manutenção ou prevenção de recidivas da DC (274,275).

#### **2.2.5.1.2. CORTICÓIDES**

Os corticóides têm uma potente ação antiinflamatória e imunossupressora, suprimindo mediadores inflamatórios, inibindo quimiotaxia de neutrófilos e macrófagos e deprimindo a imunidade celular. Seu uso é fundamental para o controle de doença inflamatória moderada a severa, na fase ativa da doença, tanto em DC como em RU. Em pacientes com RU leve a moderada, nos quais não se alcance remissão de sintomas com os salicílicos, o corticóide pode ser associado. A medicação pode ser administrada por via oral, na forma de prednisona ou metilprednisolona, ou endovenosa, na forma de prednisolona ou hidrocortizona. O objetivo de tratamento com corticoides é atingir a remissão dos sintomas, e, gradualmente reduzir a dose, mantendo remissão com outros medicamentos. O uso de corticóide não é recomendado para manutenção ou prevenção de recidivas (276). Os efeitos do uso prolongado de corticóides (retenção hídrica, hiperglicemia, hipertensão, acne, estrias, osteoporose, fascies Cushingóide e suscetibilidade a infecções) comprometem a sua utilidade para manutenção.

Novos corticóides foram desenvolvidos para minimizar estes efeitos colaterais. A budesonida permite o uso tópico com mínima exposição sistêmica. Estima-se que 90 % da medicação oral sofra inativação após absorção no delgado e passagem pelo fígado. Tem sido medicação útil para indução da remissão em

pacientes com DC leve a moderada de íleo terminal e cólon direito, como alternativa aos outros corticóides (277). Também existe na forma de enema para doença distal.

Alguns pacientes não toleram a redução da dose do corticóide, tornando, o que chamamos de “córtico-dependentes”. Outros pacientes que usaram corticóides num segundo uso, numa recorrência de sintomas, passam a não ter a mesma resposta, desenvolvendo o que se denomina “córtico-resistência” (278–280). Para estes pacientes as drogas imunossupressoras são úteis.

### **2.2.5.1.3. IMUNOSSUPRESSORES CONVENCIONAIS**

Fazem parte deste grupo a azatioprina e a 6-mercaptopurina. Esta classe de medicamentos trouxe grandes resultados para manter a remissão induzida por corticóides em pacientes com DC, assim como para os pacientes córtico-dependentes ou córtico-resistentes. Em pacientes com RU com doença persistentemente ativa, córtico-dependente ou resistente estes imunossupressores podem ser usados como alternativa.

O metotrexate é outra medicação imunossupressora alternativa que pode ser usada para induzir ou manter a remissão de pacientes com DC no qual se deseja evitar o corticóide.

Alguns ensaios clínicos foram feitos em pacientes com RU refratária, no qual se deseja evitar o corticóide, com o imunossupressor tacrolimus, com bons índices de manutenção de remissão.

Para pacientes com RU severa, não responsivos à corticoesteróides, a ciclosporina endovenosa pode permitir tratamento clínico de resgate. Vários ensaios clínicos mostram resposta, na ordem de 70 a 80 % (281,282).

#### **2.2.5.1.4. ANTIBIÓTICOS**

Com a ideia de que as bactérias intestinais fazem parte do processo de desencadeamento e manutenção da DII, o uso de antibióticos para algumas apresentações tem sido relatado com boas respostas (166,283). As drogas descritas nos ensaios clínicos foram ciprofloxacina e metronidazole, via de regra, associadas a outra medicação. Os resultados do seu uso foram particularmente melhores na localização colônica e perianal, bem como nas situações de doença transmural da DC. Seu uso como tratamento primário da RU ou DC em atividade ou em remissão é controverso (83,84).

Seu uso prolongado fica limitado por parefeitos potenciais, bem como o risco de seleção de cepas de bactérias por uso de antibióticos por tempo prolongado (166).

#### **2.2.5.1.5. TERAPIA BIOLÓGICA**

O estudo do processo inflamatório intestinal mostrou a importância do fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) em recrutar células inflamatórias circulantes, induzir edema, ativar coagulação e participar na formação de granulomas (284). Esta descoberta motivou o desenvolvimento de um anticorpo monoclonal quimérico dirigido a este mediador inflamatório, chamado infliximabe. Ensaios clínicos multicêntricos (256,285) em pacientes com DC refratária moderada a grave, mostraram bons resultados com altos índices de remissão e menores complicações cirúrgicas. A sua utilidade em pacientes com DC fistulizante e seu papel na indução de cicatrização da mucosa tem sido ratificada em estudos recentes (286).

Em 2001 surgiram as primeiras publicações sobre o emprego do infliximabe na RU com resultados animadores (257). Ensaios clínicos multicêntricos seguiram,

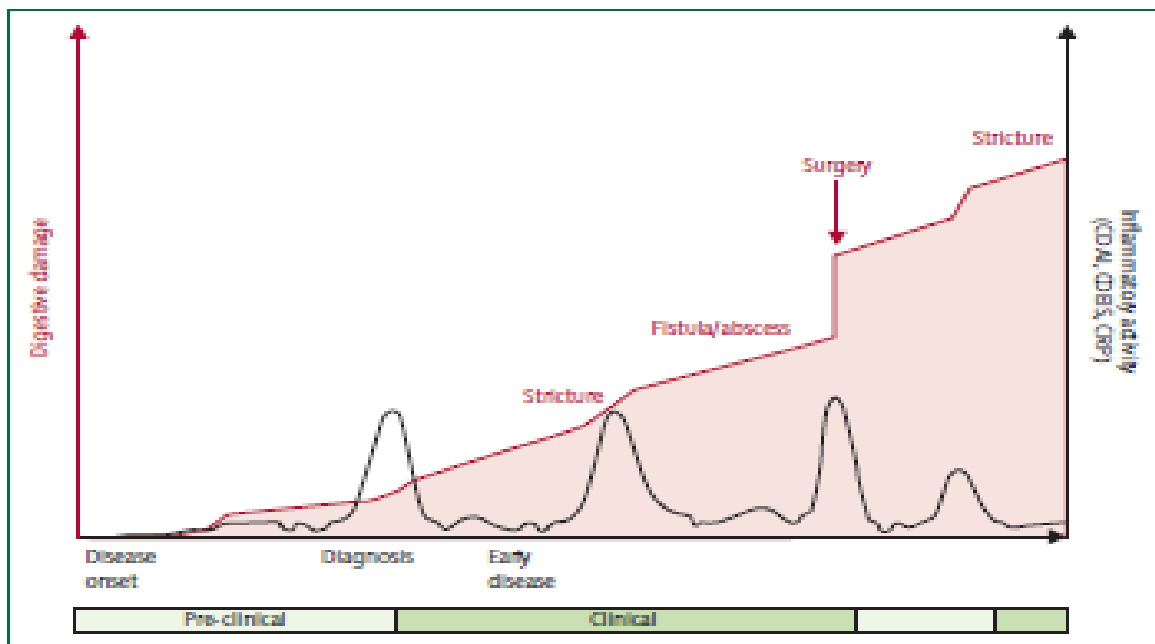


para indução e manutenção em RU moderada a grave (287), sancionando seu uso neste tipo de DII que seja refratário a tratamentos convencionais.

Outro anticorpo monoclonal anti-TNF-alfa, o adalimumab, de origem humana, foi desenvolvido e colocado à prova em ensaios clínicos a partir de 2007 (288), tendo mostrado sua eficácia para pacientes com DC moderada a severa, com remissão de sintomas e manutenção, fechamento de fistulas e cicatrização de mucosa, e gerando menos internações hospitalares.

O uso destes novos imunossupressores, denominados biológicos, não é isento de riscos. Cuidados especiais devem ser tomados para prevenção e vigilância contra infecções oportunistas e linfomas (48,289).

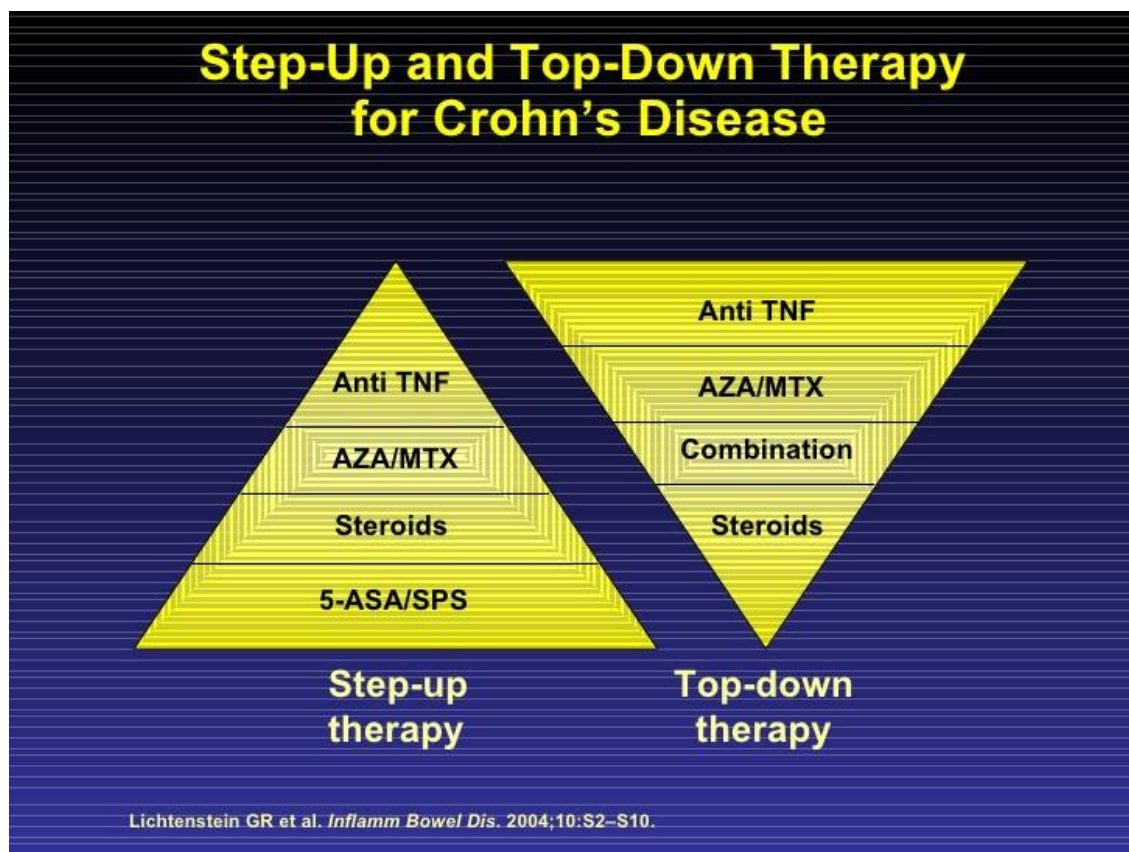
A estratégia do uso destes grupos medicamentos tem sido iniciar com os salicilados, acrescentando os esteroides, se necessário, progredindo para os imunossupressores tradicionais e, finalmente, se necessário, os biológicos. Este modo de tratar, começando pelo menos até o mais complexo tem sido chamado “*Step-up*”. É o que se pratica largamente para RCU e o que era a regra para DC, até pouco tempo. Após o surgimento dos biológicos, e seu sucesso em casos de DC com fistulização, existe um crescente uso destes medicamentos mais complexos no início do quadro, e, após estabilização do quadro, a transição para os medicamentos por via oral: imunossupressores, corticóides e salicilados. Esta estratégia é chamada “*Top-down*” e tem por objetivo evitar a progressão da DC do comportamento de doença: inflamatório, para estenosante e, finalmente, para fistulizante/penetrante (figuras 14 e 15). Embora uso destes imunossupressores novos tenham riscos acredita-se que havendo resolução precoce do processo inflamatório com cicatrização da mucosa, haja menos risco de haver envolvimento transmural com as complicações decorrentes (estenose e fistulização) (240,290).



**Figura 14: Evolução patológica da Doença de Crohn**

Fonte: (290)

Descrição: evolução da doença de Crohn sobre o intestino desde as alterações patológicas inflamatórias, às estenosantes e às fistulizantes (Adaptado de Neurath MF et al. Gut 2012;61:1619-35).



**Figura 15: Programa "step-up" e "top-down" para Doença de Crohn**

Fonte: (291) Descrição: as duas estratégias de tratamento: "step-up", onde se evolui dos medicamentos menos até os mais complexos; e o "top-down", onde se inicia com o mais complexo e, após a estabilização do processo inflamatório, se faz a transição para os menos (Adaptado de Lichtenstein GR et al. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10 Suppl 2:S2-10)

Nos últimos anos, esforços crescentes estão sendo feitos para caracterizar e dissecar os mecanismos dentro das cascatas inflamatórias em ambas as doenças, de modo a identificar novos alvos para terapias doença-específicas. Além da possível melhora no controle da doença, o uso de tais terapias com alvos específicos deve reduzir os efeitos colaterais relacionados ao uso de tratamentos imunomoduladores inespecíficos (ex: neoplasias, infecções e reações alérgicas), desta forma apoiando políticas de controle de custos (6).

### 2.2.5.2. TRATAMENTO CIRÚRGICO

Na RU a cirurgia deve ser indicada para os pacientes que não respondem a tratamento clínico intensivo. A proctocolectomia restauradora com bolsa ileal e anastomose anal (IPPA) é o procedimento de escolha em pacientes com RU fulminante, recorrente ou associada à neoplasia (Figura 16). Pacientes com displasia ou câncer, doença mal controlada, episódios recorrentes ou crônicos de RU, ou aqueles que mantêm um coto retal de colectomia prévia deve ser aconselhado sobre as opções cirúrgicas. A maioria dos pacientes submetidos a IPPA evoluem bem com melhora da qualidade de vida. Em RU, uma velocidade de sedimentação globular (VSG) inicial acima de 30 mm/h e colite extensa no diagnóstico pode aumentar a probabilidade de colectomia subsequente durante os primeiros 10 anos (292,293). O papel das escalas de resultados relatados pelo paciente é aperfeiçoar o tratamento de DII e apoiar as decisões sobre o manejo da doença tem se tornado mais importante na última década (294,295). A decisão de operar deve sempre ser tomada em conjunto com o paciente. Pacientes com RU devem receber toda a informação e aconselhamento sobre os tipos de opções cirúrgicas, inclusive sobre bolsa ileal.

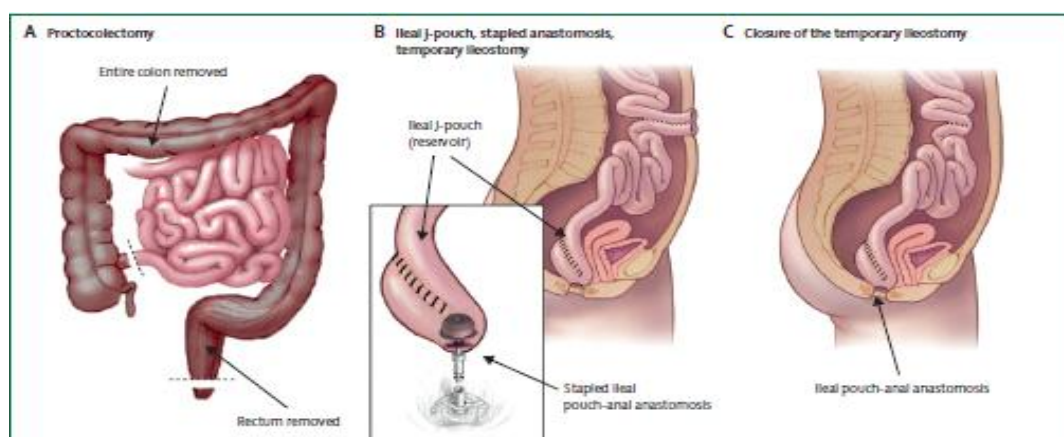


Figura 16: Proctocolectomia restauradora com bolsa ileal

Fonte: (9) Descrição: as diferentes fases da cirurgia: A- a proctocolectomia; B- a confecção da bolsa ileal; e C- o fechamento da ileostomia temporária (Adaptado de Ordás I et al. Lancet 2012;380:1606-19).

Na DC a indicação cirúrgica deve ocorrer apenas para o paciente sintomático, com doença identificada por métodos de imagem, pelo fato de ser doença panentérica e estar sujeita a recidiva após a cirurgia. Ressecções devem ser conservadoras limitando-se à doença macroscópica. Nas estenoses de delgado, onde for possível realizar plastias das estenoses, elas são preferidas em lugar das ressecções, por preservar área de absorção. Nos pacientes com colite por DC submetidos à IPPA as complicações são mais frequentes, de modo que sua indicação deve ser considerada com cuidado (80–82,89,95–98). DC a cirurgia não é curativa e o manejo é direcionado a minimizar o impacto da doença. Pelo menos 50 % dos pacientes vão precisar cirurgia nos primeiros 10 anos, e aproximadamente 70-80 % vão precisar cirurgia ao longo da vida. Estudos recentes sobre DC identificaram fatores prognósticos presentes ao diagnóstico que aumentam a probabilidade de cirurgia. Estes fatores incluem: doença no íleo terminal, doença estenosante ou fistulizante, e idade abaixo de 40 anos ao diagnóstico (296,297). Anastomose primária não é recomendada na presença de sepse e desnutrição (237).

Pacientes com DC anal e perianal devem ser operados apenas quando sintomáticos. Os procedimentos devem ser conservadores em conjunto com o tratamento clínico, principalmente focado em drenagem de abscessos. Reparo de fístulas pode ser adequado em casos selecionados com mínima ou nenhuma doença retal.

Até o momento os tratamentos para DII têm como alvo apenas o sistema imune, a despeito dos outros componentes da patogênese de DII: o genoma, o meio

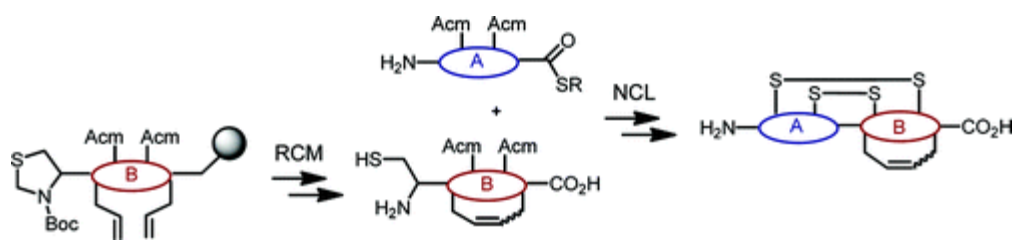
ambiente e a microbiota intestinal. Se DII é o resultado de uma interação complexa entre estes componentes, um tratamento ideal e efetivo deveria abordar todos os elementos envolvidos. À medida que o conhecimento sobre a fisiopatologia de DII progride poderá haver uma alteração deste cenário num futuro próximo.

### **2.2.6. PERSPECTIVAS DE TRATAMENTO**

Um tratamento realmente efetivo deve abordar todos os elementos envolvidos. Esta atenção especial ao papel da microbiota na patogênese de DII em nível investigativo tem sido acompanhada por várias estratégias diferentes cujo alvo era modular sua composição, com graus variáveis de sucesso. Havendo comprovação de que mudanças na dieta tenham efeito sobre a microbiota e, como consequência, na evolução de DII, esta seria uma intervenção interessante, com baixo risco e mais fácil de executar do que as demais modalidades de tratamento. A possibilidade de modular a microbiota através do uso de pré-bióticos e pró-bióticos também é uma área que promete render efeitos positivos (298,299).

Recentemente o uso de transplante de fezes de doadores saudáveis em pacientes com colite pseudomembranosa serviu de base para alguns estudos em pacientes com DII, tendo sido testado em vários centros. Os resultados preliminares são animadores, embora não haja uniformidade de resultados e haja dificuldades técnicas de aplicar o procedimento (300,301).

A possibilidade de produzir defensinas em laboratório já é uma possibilidade (302) (Figura 17). A utilização de peptídeos antimicrobianos sintéticos, ou a indução da produção de defensinas endógenas, são estratégias plausíveis para serem consideradas para ensaios clínicos em pacientes com DII num futuro próximo (303).



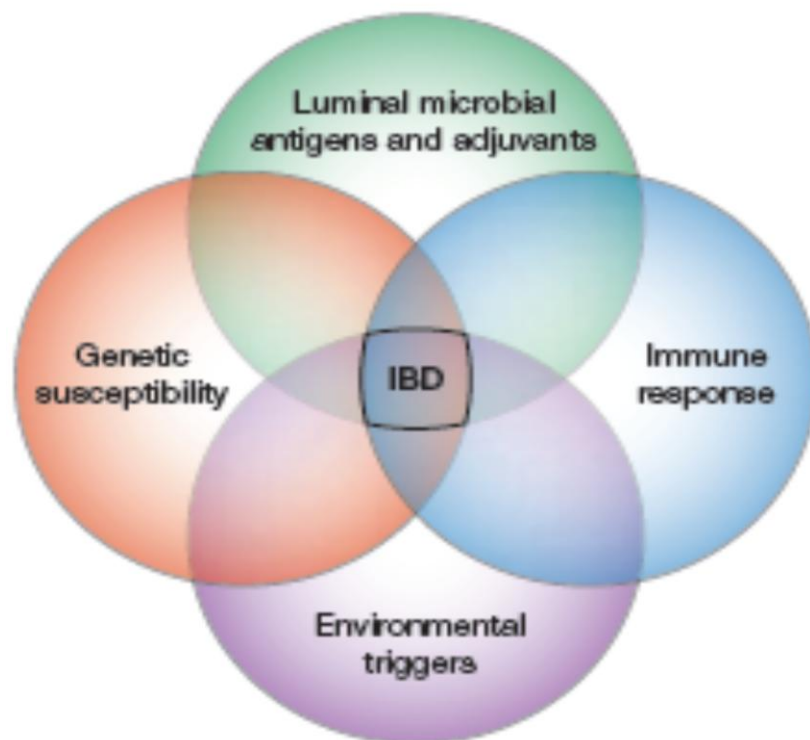
**Figura 17: Defensina sintética**

Fonte: (302) Descrição: estrutura química de defensina produzida em laboratório (Adaptado de Heapy AM et al. Org Lett 2012;14:878-81)

### 3. MAPA CONCEITUAL OU TEÓRICO

I

Doença inflamatória intestinal = sujeito geneticamente suscetível, sob influência de fatores ambientais e bacterianos.



Sartor 2012 [www.nature.com](http://www.nature.com)

II

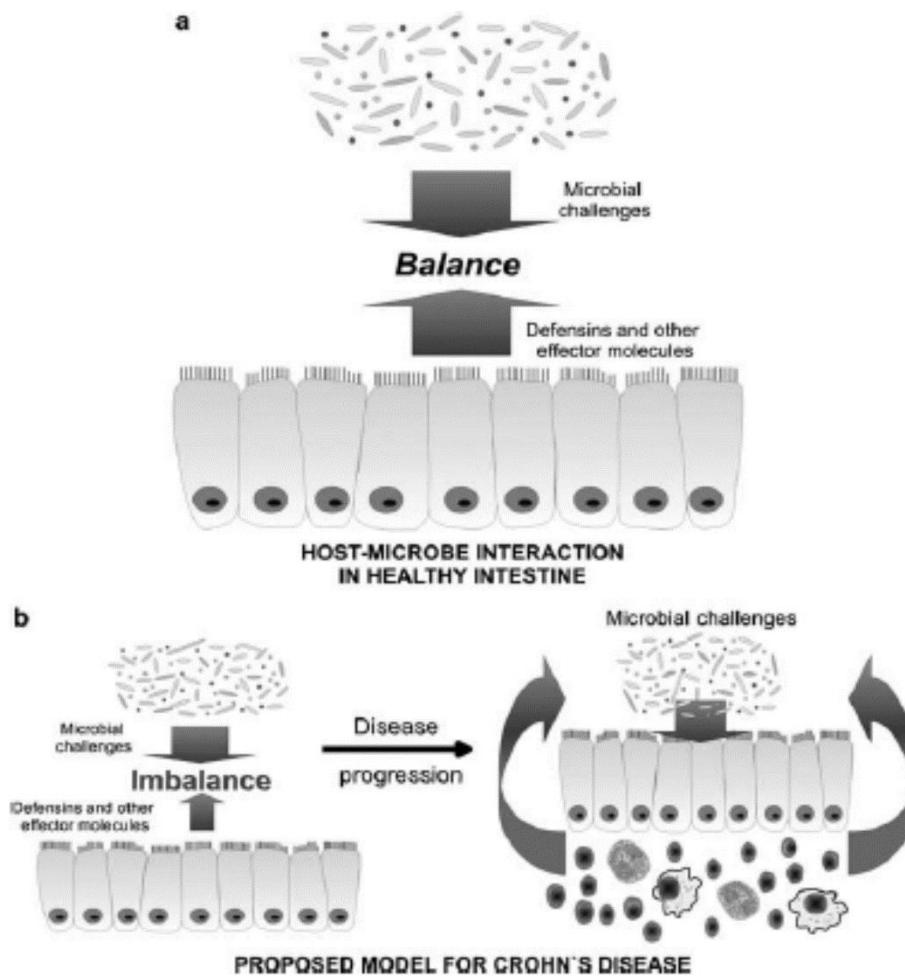
Fatores genéticos influenciam a função de fatores protetores na barreira intestinal e componentes da imunidade inata. Entre estes a produção de defensinas, como a HDB-1, codificada pelo gene *DEFB1*, que é o tema deste estudo.





Com a deficiência de defensinas haveria menor ação antimicrobiana no epitélio intestinal, diminuindo proteção e alterando o equilíbrio que normalmente existe com a microbiota intestinal.

III



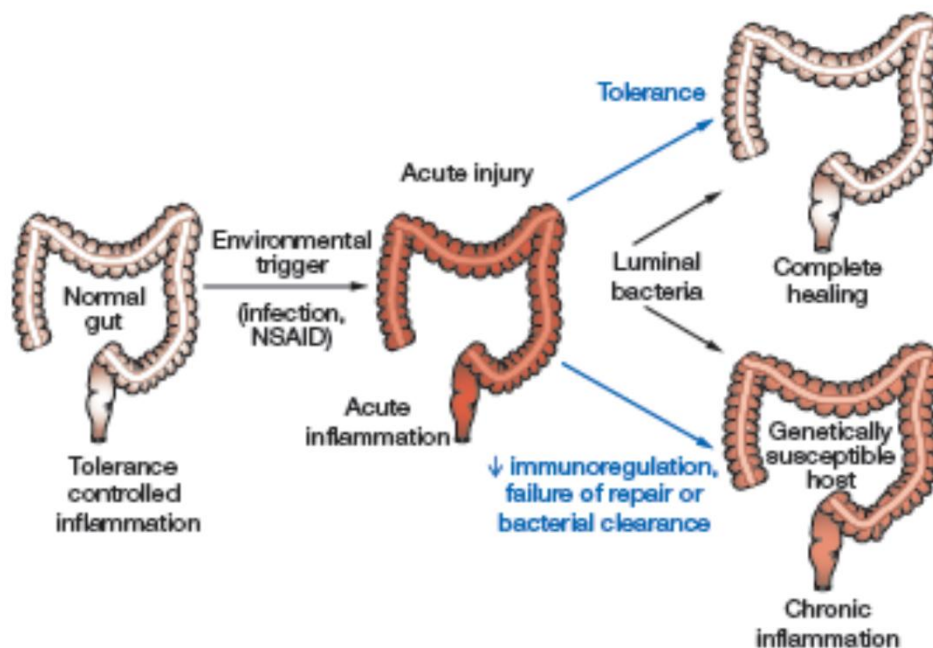
Wehkamp Mucosal Immunol 2008





## IV

Com a proteção comprometida ocorreria a perda do equilíbrio que habitualmente existe, entre um estado de tolerância com os microrganismos e inflamação, havendo aumento da intensidade e cronificação do processo inflamatório. Como consequência ocorrem as alterações patológicas características da doença inflamatória intestinal.



Sartor 2012 [www.nature.com](http://www.nature.com)

#### 4. JUSTIFICATIVA

Há poucos trabalhos sobre potenciais associações entre genes *DEFB1* e DII, na população brasileira. Consideramos, pois, que a identificação das diferenças entre grupos de pacientes e controles sadios poderá favorecer o surgimento de informações que contribuam para a melhor compreensão do eventual papel do gene *DEFB1* nestas doenças. Entendemos, também, que estes novos conhecimentos poderão ser úteis na identificação de indivíduos com maior ou menor predisposição ao desenvolvimento da doença, bem como no estabelecimento de prognóstico, auxiliando, assim, no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas focadas na imunidade inata contra a DII.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. OBJETIVOS GERAIS

- Investigar os polimorfismos do gene *DEFB1* em pacientes com DII e grupo controle, ambos caucasoides.

### 2.2-OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Avaliar a frequência dos SNPs do gene *DEFB1* em pacientes com Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa, estratificando a frequência com a apresentação da doença, e comparando-os com grupo controle, ambos caucasóides.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Maloy KJ, Powrie F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature* [Internet]. 2011 Jun 16;474(7351):298–306. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21677746>
2. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* [Internet]. 2012 Jun 14;486(7402):207–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22699609>
3. Abraham C, Medzhitov R. Interactions between the host innate immune system and microbes in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* [Internet]. 2011 May;140(6):1729–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21530739>
4. Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* [Internet]. 2008 Feb;134(2):577–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18242222>
5. Lakatos PL, Fischer S, Lakatos L, Gal I, Papp J. 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* [Internet]. 2006 Mar 28;12(12):1829–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16609988>
6. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease pathogenesis: where are we? *J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2015 Mar;30 Suppl 1:12–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25827798>
7. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* [Internet]. 2007 Jul 26;448(7152):427–34. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature06005>
8. Ramasundara M, Leach ST, Lemberg DA, Day AS. Defensins and inflammation: the role of defensins in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2009 Feb;24(2):202–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19215333>
9. Ordás I, Eckmann L, Talamini M, Baumgart DC, Sandborn WJ. Ulcerative colitis. *Lancet* [Internet]. 2012 Nov;380(9853):1606–19. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673612601500>

10. Magro F, Langner C, Driessen A, Ensari A, Geboes K, Mantzaris GJ, et al. European consensus on the histopathology of inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* [Internet]. 2013 Nov;7(10):827–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23870728>
11. Bernstein CN, Wajda A, Blanchard JF. The clustering of other chronic inflammatory diseases in inflammatory bowel disease: a population-based study. *Gastroenterology* [Internet]. 2005 Sep;129(3):827–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16143122>
12. Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* [Internet]. 1989;170:2–6; discussion 16–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2617184>
13. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* [Internet]. 2012 Jan;142(1):46–54.e42; quiz e30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22001864>
14. Van Limbergen J, Wilson DC, Satsangi J. The genetics of Crohn's disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* [Internet]. 2009;10:89–116. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19453248>
15. Loftus E V. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* [Internet]. 2004 May;126(6):1504–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15168363>
16. KIRSNER JB, SPENCER JA. FAMILY OCCURRENCES OF ULCERATIVE COLITIS, REGIONAL ENTERITIS, AND ILEOCOLITIS. *Ann Intern Med* [Internet]. 1963 Aug;59:133–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14049341>
17. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugerie L, et al. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* [Internet]. 1996 Feb 29;379(6568):821–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8587604>
18. Hugot J-P, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard J-P, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* [Internet]. 2001 May 31;411(6837):599–603. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/35079107>

19. Hugot J-P. CARD15/NOD2 mutations in Crohn's disease. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2006 Aug;1072:9–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17057186>
20. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* [Internet]. 2006 Dec 1;314(5804):1461–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17068223>
21. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* [Internet]. 2012 Nov 1;491(7422):119–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23128233>
22. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet* [Internet]. 2007 Feb;39(2):207–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17200669>
23. Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ, Tremelling M, Anderson CA, Fisher SA, et al. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet* [Internet]. 2007 Jul;39(7):830–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17554261>
24. Sarah C Glover AGJ. IBD Associated Genetic Polymorphisms: Novel Insights into the Pathogenic Mechanisms. *J Vaccines Vaccin* [Internet]. 2013;04(07). Available from: <http://www.omicsonline.org/ibd-associated-genetic-polymorphisms-novel-insights-into-the-pathogenic-mechanisms-2157-7560.1000e121.php?aid=19458>
25. Hisamatsu T, Kanai T, Mikami Y, Yoneno K, Matsuoka K, Hibi T. Immune aspects of the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2013 Mar;137(3):283–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23103332>
26. Zhernakova A, Festen EM, Franke L, Trynka G, van Diemen CC, Monsuur AJ, et al. Genetic analysis of innate immunity in Crohn's disease and ulcerative colitis identifies two susceptibility loci harboring CARD9 and IL18RAP. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2008 May;82(5):1202–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18439550>
27. Glocker E-O, Kotlarz D, Klein C, Shah N, Grimbacher B. IL-10 and IL-10 receptor defects in humans. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2011 Dec;1246:102–

7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22236434>
28. Cho JH, Brant SR. Recent insights into the genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* [Internet]. 2011 May;140(6):1704–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21530736>
29. Thompson AI, Lees CW. Genetics of ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2011 Mar;17(3):831–48. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00054725-201103000-00017>
30. Kaser A, Lee A-H, Franke A, Glickman JN, Zeissig S, Tilg H, et al. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell* [Internet]. 2008 Sep 5;134(5):743–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18775308>
31. Wang M-H, Fiocchi C, Ripke S, Zhu X, Duerr RH, Achkar J-P. A novel approach to detect cumulative genetic effects and genetic interactions in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2013 Aug;19(9):1799–808. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23598818>
32. Brant SR. Promises, delivery, and challenges of inflammatory bowel disease risk gene discovery. *Clin Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2013 Jan;11(1):22–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23131344>
33. Morey M, Fernández-Marmiesse A, Castiñeiras D, Fraga JM, Couce ML, Cocho JA. A glimpse into past, present, and future DNA sequencing. *Mol Genet Metab* [Internet]. 2013;110(1-2):3–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23742747>
34. 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* [Internet]. 2012 Nov 1;491(7422):56–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23128226>
35. Arijis I, Li K, Toedter G, Quintens R, Van Lommel L, Van Steen K, et al. Mucosal gene signatures to predict response to infliximab in patients with ulcerative colitis. *Gut* [Internet]. 2009 Dec;58(12):1612–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19700435>
36. Haritunians T, Taylor KD, Targan SR, Dubinsky M, Ippoliti A, Kwon S, et al. Genetic predictors of medically refractory ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2010 Nov;16(11):1830–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20848476>



37. Bernstein CN, Shanahan F. Disorders of a modern lifestyle: reconciling the epidemiology of inflammatory bowel diseases. *Gut* [Internet]. 2008 Sep;57(9):1185–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18515412>
38. Ekbohm A. The epidemiology of IBD: a lot of data but little knowledge. How shall we proceed? *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2004 Feb;10 Suppl 1:S32–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15168828>
39. Koloski N-A, Bret L, Radford-Smith G. Hygiene hypothesis in inflammatory bowel disease: a critical review of the literature. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2008 Jan 14;14(2):165–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18186549>
40. Williams CN. Does the incidence of IBD increase when persons move from a low- to a high-risk area? *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2008 Oct;14 Suppl 2:S41–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18816730>
41. Shanahan F. The gut microbiota-a clinical perspective on lessons learned. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2012 Oct;9(10):609–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22890109>
42. Timm S, Svanes C, Janson C, Sigsgaard T, Johannessen A, Gislason T, et al. Place of upbringing in early childhood as related to inflammatory bowel diseases in adulthood: a population-based cohort study in Northern Europe. *Eur J Epidemiol* [Internet]. 2014 Jun;29(6):429–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24916994>
43. Danese S, Sans M, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmun Rev* [Internet]. 2004 Jul;3(5):394–400. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15288007>
44. Cosnes J. What is the link between the use of tobacco and IBD? *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2008 Oct;14 Suppl 2:S14–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18816683>
45. Ananthakrishnan AN. Environmental triggers for inflammatory bowel disease. *Curr Gastroenterol Rep* [Internet]. 2013 Jan;15(1):302. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23250702>
46. Birrenbach T, Böcker U. Inflammatory Bowel Disease and Smoking. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2004 Nov;10(6):848–59. Available from:

<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00054725-200411000-00019>

47. Takeuchi K, Smale S, Premchand P, Maiden L, Sherwood R, Thjodleifsson B, et al. Prevalence and mechanism of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced clinical relapse in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2006 Feb;4(2):196–202. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16469680>
48. Cornish JA, Tan E, Simillis C, Clark SK, Teare J, Tekkis PP. The risk of oral contraceptives in the etiology of inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2008 Sep;103(9):2394–400. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18684177>
49. Shaw SY, Blanchard JF, Bernstein CN. Association between the use of antibiotics in the first year of life and pediatric inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2010 Dec;105(12):2687–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20940708>
50. Shaw SY, Blanchard JF, Bernstein CN. Association between the use of antibiotics and new diagnoses of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2011 Dec;106(12):2133–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21912437>
51. Garg M, Lubel JS, Sparrow MP, Holt SG, Gibson PR. Review article: vitamin D and inflammatory bowel disease--established concepts and future directions. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet]. 2012 Aug;36(4):324–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22686333>
52. Leslie WD, Miller N, Rogala L, Bernstein CN. Vitamin D status and bone density in recently diagnosed inflammatory bowel disease: the Manitoba IBD Cohort Study. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2008 Jun;103(6):1451–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18422819>
53. Khalili H, Huang ES, Ananthakrishnan AN, Higuchi L, Richter JM, Fuchs CS, et al. Geographical variation and incidence of inflammatory bowel disease among US women. *Gut* [Internet]. 2012 Dec;61(12):1686–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22241842>
54. Nerich V, Jantchou P, Boutron-Ruault M-C, Monnet E, Weill A, Vanbockstael V, et al. Low exposure to sunlight is a risk factor for Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet]. 2011 Apr;33(8):940–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21332762>

55. van Eeden SF, Tan WC, Suwa T, Mukae H, Terashima T, Fujii T, et al. Cytokines involved in the systemic inflammatory response induced by exposure to particulate matter air pollutants (PM(10)). *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2001 Sep 1;164(5):826–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11549540>
56. Beamish LA, Osornio-Vargas AR, Wine E. Air pollution: An environmental factor contributing to intestinal disease. *J Crohns Colitis* [Internet]. 2011 Aug;5(4):279–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21683297>
57. Hou JK, Abraham B, El-Serag H. Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2011 Apr;106(4):563–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21468064>
58. Wu GD, Bushmanc FD, Lewis JD. Diet, the human gut microbiota, and IBD. *Anaerobe* [Internet]. 2013 Dec;24:117–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23548695>
59. Zimmer J, Lange B, Frick J-S, Sauer H, Zimmermann K, Schwiertz A, et al. A vegan or vegetarian diet substantially alters the human colonic faecal microbiota. *Eur J Clin Nutr* [Internet]. 2012 Jan;66(1):53–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21811294>
60. Moschen AR, Wieser V, Tilg H. Dietary Factors: Major Regulators of the Gut's Microbiota. *Gut Liver* [Internet]. 2012 Oct;6(4):411–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23170142>
61. Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D. The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. *Gastroenterology* [Internet]. 2014 May;146(6):1489–99. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24560869>
62. Hooper L V, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* [Internet]. 2001 May 11;292(5519):1115–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11352068>
63. Emminger A, Kahmann E, Savage DS. A novel class of antitumour agents II. In vitro testing. *Cancer Lett* [Internet]. 1977 Mar;2(4-5):273–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383577800323>
64. Weinstock GM. Genomic approaches to studying the human microbiota. *Nature* [Internet]. 2012 Sep 12;489(7415):250–6. Available from:

<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature11553>

65. Zoetendal EG, Rajilic-Stojanovic M, de Vos WM. High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut* [Internet]. 2008 Nov;57(11):1605–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18941009>
66. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2010 Jun 29;107(26):11971–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20566857>
67. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* [Internet]. 2012 Sep 12;489(7415):220–30. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature11550>
68. Biagi E, Nylund L, Candela M, Ostan R, Bucci L, Pini E, et al. Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. *PLoS One* [Internet]. 2010;5(5):e10667. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20498852>
69. Isolauri E. Development of healthy gut microbiota early in life. *J Paediatr Child Health* [Internet]. 2012 Jun;48:1–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1440-1754.2012.02489.x>
70. Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* [Internet]. 2006 Aug;118(2):511–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16882802>
71. Cader MZ, Kaser A. Recent advances in inflammatory bowel disease: mucosal immune cells in intestinal inflammation. *Gut* [Internet]. 2013 Nov;62(11):1653–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24104886>
72. Maynard CL, Elson CO, Hatton RD, Weaver CT. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature* [Internet]. 2012 Sep 12;489(7415):231–41. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature11551>
73. Eckburg PB, Relman DA. The role of microbes in Crohn's disease. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2007 Jan 15;44(2):256–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17173227>

74. Antoni L. Intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2014;20(5):1165. Available from: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v20/i5/1165.htm>
75. O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* [Internet]. 2006 Jul;7(7):688–93. Available from: <http://embor.embopress.org/cgi/doi/10.1038/sj.embor.7400731>
76. Kau AL, Ahern PP, Griffin NW, Goodman AL, Gordon JI. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature* [Internet]. 2011 Jun 16;474(7351):327–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21677749>
77. Ahmad MS, Krishnan S, Ramakrishna BS, Mathan M, Pulimood AB, Murthy SN. Butyrate and glucose metabolism by colonocytes in experimental colitis in mice. *Gut* [Internet]. 2000 Apr;46(4):493–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10716678>
78. Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, Suda W, Nagano Y, Nishikawa H, et al. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature* [Internet]. 2013 Aug 8;500(7461):232–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23842501>
79. Matsuoka K, Kanai T. The gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Semin Immunopathol* [Internet]. 2015 Jan;37(1):47–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25420450>
80. D'Haens GR, Geboes K, Peeters M, Baert F, Penninckx F, Rutgeerts P. Early lesions of recurrent Crohn's disease caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum. *Gastroenterology* [Internet]. 1998 Feb;114(2):262–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9453485>
81. Rutgeerts P, Geboes K, Peeters M, Hiele M, Penninckx F, Aerts R, et al. Effect of faecal stream diversion on recurrence of Crohn's disease in the neoterminal ileum. *Lancet (London, England)* [Internet]. 1991 Sep 28;338(8770):771–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1681159>
82. Gjaffer MH, Clark A, Holdsworth CD. Antibodies to *Saccharomyces cerevisiae* in patients with Crohn's disease and their possible pathogenic importance. *Gut* [Internet]. 1992 Aug 1;33(8):1071–5. Available from: <http://gut.bmj.com/cgi/doi/10.1136/gut.33.8.1071>

83. Rutgeerts P, Hiele M, Geboes K, Peeters M, Penninckx F, Aerts R, et al. Controlled trial of metronidazole treatment for prevention of Crohn's recurrence after ileal resection. *Gastroenterology* [Internet]. 1995 Jun;108(6):1617–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7768364>
84. Khan KJ, Ullman TA, Ford AC, Abreu MT, Abadir A, Abadir A, et al. Antibiotic therapy in inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2011 Apr;106(4):661–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21407187>
85. Sartor RB. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology* [Internet]. 2004 May;126(6):1620–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15168372>
86. Rajilić-Stojanović M, Heilig HGJ, Molenaar D, Kajander K, Surakka A, Smidt H, et al. Development and application of the human intestinal tract chip, a phylogenetic microarray: analysis of universally conserved phylotypes in the abundant microbiota of young and elderly adults. *Environ Microbiol* [Internet]. 2009 Jul;11(7):1736–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19508560>
87. Bibiloni R, Mangold M, Madsen KL, Fedorak RN, Tannock GW. The bacteriology of biopsies differs between newly diagnosed, untreated, Crohn's disease and ulcerative colitis patients. *J Med Microbiol* [Internet]. 2006 Aug;55(Pt 8):1141–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16849736>
88. Chassaing B, Darfeuille-Michaud A. The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* [Internet]. 2011 May;140(6):1720–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21530738>
89. Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2007 Aug 21;104(34):13780–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17699621>
90. Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, Desreumaux P, et al. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* [Internet]. 1998 Dec;115(6):1405–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9834268>

91. Swidsinski A, Weber J, Loening-Baucke V, Hale LP, Lochs H. Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2005 Jul;43(7):3380–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16000463>
92. Fujimoto T, Imaeda H, Takahashi K, Kasumi E, Bamba S, Fujiyama Y, et al. Decreased abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* in the gut microbiota of Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2013 Apr;28(4):613–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23216550>
93. Swidsinski A, Sydora BC, Doerffel Y, Loening-Baucke V, Vaneechoutte M, Lupicki M, et al. Viscosity gradient within the mucus layer determines the mucosal barrier function and the spatial organization of the intestinal microbiota. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2007 Aug;13(8):963–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17455202>
94. Png CW, Lindén SK, Gilshenan KS, Zoetendal EG, McSweeney CS, Sly LI, et al. Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2010 Nov;105(11):2420–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20648002>
95. Biswas A, Liu Y-J, Hao L, Mizoguchi A, Salzman NH, Bevins CL, et al. Induction and rescue of Nod2-dependent Th1-driven granulomatous inflammation of the ileum. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2010 Aug 17;107(33):14739–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20679225>
96. Rehman A, Sina C, Gavrilova O, Häsler R, Ott S, Baines JF, et al. Nod2 is essential for temporal development of intestinal microbial communities. *Gut* [Internet]. 2011 Oct;60(10):1354–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21421666>
97. Gevers D, Kugathasan S, Denson LA, Vázquez-Baeza Y, Van Treuren W, Ren B, et al. The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2014 Mar 12;15(3):382–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24629344>
98. Bakhtiar SM, LeBlanc JG, Salvucci E, Ali A, Martin R, Langella P, et al. Implications of the human microbiome in inflammatory bowel diseases. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 2013 May;342(1):10–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23431991>
99. NIH HMP Working Group, Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, et al. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res* [Internet].

- 2009 Dec;19(12):2317–23. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19819907>
100. Huttenhower C, Kostic AD, Xavier RJ. Inflammatory bowel disease as a model for translating the microbiome. *Immunity* [Internet]. 2014 Jun 19;40(6):843–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24950204>
  101. Gill N, Finlay BB. The gut microbiota: challenging immunology. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2011 Oct;11(10):636–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21869815>
  102. Salim SY, Söderholm JD. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2011 Jan;17(1):362–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20725949>
  103. McGuckin MA, Eri R, Simms LA, Florin THJ, Radford-Smith G. Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2009 Jan;15(1):100–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18623167>
  104. Leedham SJ, Brittan M, McDonald SAC, Wright NA. Intestinal stem cells. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2005 Jan;9(1):11–24. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1582-4934.2005.tb00333.x>
  105. Goto Y, Kiyono H. Epithelial barrier: an interface for the cross-communication between gut flora and immune system. *Immunol Rev* [Internet]. 2012 Jan;245(1):147–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22168418>
  106. Roda G, Sartini A, Zambon E, Calafiore A, Marocchi M, Caponi A, et al. Intestinal epithelial cells in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2010 Sep 14;16(34):4264–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20818809>
  107. Ouellette AJ. Defensin-mediated innate immunity in the small intestine. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* [Internet]. 2004 Apr;18(2):405–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15123078>
  108. Wehkamp J, Stange EF. Paneth's disease. *J Crohns Colitis* [Internet]. 2010 Nov;4(5):523–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21122555>



109. Koslowski MJ, Beisner J, Stange EF, Wehkamp J. Innate antimicrobial host defense in small intestinal Crohn's disease. *Int J Med Microbiol* [Internet]. 2010 Jan;300(1):34–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19850516>
110. Bevan MJ. Memory T cells as an occupying force. *Eur J Immunol* [Internet]. 2011 May;41(5):1192–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21469134>
111. Hindryckx P, Laukens D. Intestinal Barrier Dysfunction : The Primary Driver of IBD ? *Inflamm Bowel Dis - Adv Pathog Manag* [Internet]. 2012;19. Available from: <http://www.intechopen.com/books/inflammatory-bowel-disease-advances-in-pathogenesis-and-management/intestinal-barrier-dysfunction-the-primary-driver-of-ibd->
112. Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2009 Jul;124(1):3–20; quiz 21–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19560575>
113. Pinto D, Gregorieff A, Begthel H, Clevers H. Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev* [Internet]. 2003 Jul 15;17(14):1709–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12865297>
114. Dharmani P, Srivastava V, Kissoon-Singh V, Chadee K. Role of intestinal mucins in innate host defense mechanisms against pathogens. *J Innate Immun* [Internet]. 2009;1(2):123–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20375571>
115. Kim YS, Ho SB. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep* [Internet]. 2010 Oct;12(5):319–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20703838>
116. Allen A, Hutton DA, Pearson JP. The MUC2 gene product: a human intestinal mucin. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 1998 Jul;30(7):797–801. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9722984>
117. Zhao C, Wang I, Lehrer RI. Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Lett* [Internet]. 1996 Nov 4;396(2-3):319–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8915011>
118. Antoni L, Nuding S, Weller D, Gersemann M, Ott G, Wehkamp J, et al. Human colonic mucus is a reservoir for antimicrobial peptides. *J Crohns Colitis*

- [Internet]. 2013 Dec;7(12):e652–64. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23787054>
119. Cederlund A, Gudmundsson GH, Agerberth B. Antimicrobial peptides important in innate immunity. *FEBS J* [Internet]. 2011 Oct;278(20):3942–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21848912>
  120. Zasloff M. Antimicrobial peptides in health and disease. *N Engl J Med* [Internet]. 2002 Oct 10;347(15):1199–200. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12374882>
  121. Papo N, Shai Y. A molecular mechanism for lipopolysaccharide protection of Gram-negative bacteria from antimicrobial peptides. *J Biol Chem* [Internet]. 2005 Mar 18;280(11):10378–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15632151>
  122. Frye M, Bargon J, Dauletbaev N, Weber A, Wagner TO, Gropp R. Expression of human alpha-defensin 5 (HD5) mRNA in nasal and bronchial epithelial cells. *J Clin Pathol* [Internet]. 2000 Oct;53(10):770–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11064671>
  123. Shirazi T. Mucins and inflammatory bowel disease. *Postgrad Med J* [Internet]. 2000 Aug 1;76(898):473–8. Available from: <http://pmj.bmj.com/cgi/doi/10.1136/pmj.76.898.473>
  124. Cario E. Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut* [Internet]. 2005 Aug;54(8):1182–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15840688>
  125. Conte MP, Schippa S, Zamboni I, Penta M, Chiarini F, Seganti L, et al. Gut-associated bacterial microbiota in paediatric patients with inflammatory bowel disease. *Gut* [Internet]. 2006 Dec;55(12):1760–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16648155>
  126. Swidsinski A, Loening-Baucke V, Herber A. Mucosal flora in Crohn's disease and ulcerative colitis - an overview. *J Physiol Pharmacol* [Internet]. 2009 Dec;60 Suppl 6:61–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20224153>
  127. Gersemann M, Becker S, Kübler I, Koslowski M, Wang G, Herrlinger KR, et al. Differences in goblet cell differentiation between Crohn's disease and ulcerative colitis. *Differentiation* [Internet]. 2009 Jan;77(1):84–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19281767>

128. Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, Nuding S, Weichenthal M, Petras RE, et al. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2005 Dec 13;102(50):18129–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16330776>
129. Hirota SA, Ng J, Lueng A, Khajah M, Parhar K, Li Y, et al. NLRP3 inflammasome plays a key role in the regulation of intestinal homeostasis. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2011 Jun;17(6):1359–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20872834>
130. Gersemann M, Wehkamp J, Fellermann K, Stange EF. Crohn's disease--defect in innate defence. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2008 Sep 28;14(36):5499–503. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18810765>
131. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2000 Jun;2(6):326–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10854322>
132. Kaser A, Blumberg RS. Paneth cells and inflammation dance together in Crohn's disease. *Cell Res* [Internet]. 2008 Dec;18(12):1160–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19043437>
133. Heazlewood CK, Cook MC, Eri R, Price GR, Tauro SB, Taupin D, et al. Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. *PLoS Med* [Internet]. 2008 Mar 4;5(3):e54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18318598>
134. Park S-W, Zhen G, Verhaeghe C, Nakagami Y, Nguyenvu LT, Barczak AJ, et al. The protein disulfide isomerase AGR2 is essential for production of intestinal mucus. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2009 Apr 28;106(17):6950–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19359471>
135. Zhao F, Edwards R, Dizon D, Afrasiabi K, Mastroianni JR, Geyfman M, et al. Disruption of Paneth and goblet cell homeostasis and increased endoplasmic reticulum stress in *Agr2*<sup>-/-</sup> mice. *Dev Biol* [Internet]. 2010 Feb 15;338(2):270–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20025862>
136. Kuballa P, Huett A, Rioux JD, Daly MJ, Xavier RJ. Impaired autophagy of an intracellular pathogen induced by a Crohn's disease associated ATG16L1 variant. *PLoS One* [Internet]. 2008;3(10):e3391. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18852889>

137. Cadwell K, Liu JY, Brown SL, Miyoshi H, Loh J, Lennerz JK, et al. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature* [Internet]. 2008 Nov 13;456(7219):259–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18849966>
138. Travassos LH, Carneiro LAM, Ramjeet M, Hussey S, Kim Y-G, Magalhães JG, et al. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat Immunol* [Internet]. 2010 Jan;11(1):55–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19898471>
139. Pearson AD, Eastham EJ, Laker MF, Craft AW, Nelson R. Intestinal permeability in children with Crohn's disease and coeliac disease. *BMJ* [Internet]. 1982 Jul 3;285(6334):20–1. Available from: <http://www.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bmj.285.6334.20>
140. Arslan G, Atasever T, Cindoruk M, Yildirim IS. (51)CrEDTA colonic permeability and therapy response in patients with ulcerative colitis. *Nucl Med Commun* [Internet]. 2001 Sep;22(9):997–1001. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11505209>
141. Welcker K, Martin A, Kölle P, Siebeck M, Gross M. Increased intestinal permeability in patients with inflammatory bowel disease. *Eur J Med Res* [Internet]. 2004 Oct 29;9(10):456–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15546811>
142. Hollander D, Vadheim CM, Brettholz E, Petersen GM, Delahunty T, Rotter JI. Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor. *Ann Intern Med* [Internet]. 1986 Dec;105(6):883–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3777713>
143. Hollander D. Permeability in Crohn's disease: altered barrier functions in healthy relatives? *Gastroenterology* [Internet]. 1993 Jun;104(6):1848–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8500744>
144. Hering NA, Fromm M, Schulzke J-D. Determinants of colonic barrier function in inflammatory bowel disease and potential therapeutics. *J Physiol* [Internet]. 2012 Mar 1;590(Pt 5):1035–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22219336>
145. Zeissig S, Bürgel N, Günzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, et al. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* [Internet]. 2007 Jan;56(1):61–72. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16822808>

146. Goetz M, Kiesslich R. Advances of endomicroscopy for gastrointestinal physiology and diseases. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* [Internet]. 2010 Jun;298(6):G797–806. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20185688>
147. Hooper L V., Littman DR, Macpherson AJ. Interactions Between the Microbiota and the Immune System. *Science* (80- ) [Internet]. 2012 Jun 8;336(6086):1268–73. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1223490>
148. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* [Internet]. 2007 Aug 6;204(8):1849–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17635957>
149. Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, et al. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol* [Internet]. 1996 Aug 1;157(3):1261–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8757634>
150. Wilson TJ, Jobim M, Jobim LF, Portela P, Salim PH, Rosito MA, et al. Study of killer immunoglobulin-like receptor genes and human leukocyte antigens class I ligands in a Caucasian Brazilian population with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Hum Immunol* [Internet]. 2010 Mar;71(3):293–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20036705>
151. Smith PD, Ochsenbauer-Jambor C, Smythies LE. Intestinal macrophages: unique effector cells of the innate immune system. *Immunol Rev* [Internet]. 2005 Aug;206:149–59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16048547>
152. Selby WS, Janossy G, Bofill M, Jewell DP. Lymphocyte subpopulations in the human small intestine. The findings in normal mucosa and in the mucosa of patients with adult coeliac disease. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 1983 Apr;52(1):219–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6345034>
153. Rugtveit J, Bakka A, Brandtzaeg P. Differential distribution of B7.1 (CD80) and B7.2 (CD86) costimulatory molecules on mucosal macrophage subsets in human inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* [Internet]. 1997 Oct;110(1):104–13. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9353156>

154. Rescigno M, Di Sabatino A. Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. *J Clin Invest* [Internet]. 2009 Sep;119(9):2441–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19729841>
155. Billsborough J, Viney JL. Gastrointestinal dendritic cells play a role in immunity, tolerance, and disease. *Gastroenterology* [Internet]. 2004 Jul;127(1):300–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15236195>
156. Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ, Bell SJ, Emmanuel A V, Knight SC, et al. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* [Internet]. 2005 Jul;129(1):50–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16012934>
157. Jiang H, Chess L. An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J Clin Invest* [Internet]. 2004 Nov;114(9):1198–208. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15520848>
158. Feuerer M, Hill JA, Mathis D, Benoist C. Foxp3+ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. *Nat Immunol* [Internet]. 2009 Jul;10(7):689–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19536194>
159. Makita S, Kanai T, Oshima S, Uraushihara K, Totsuka T, Sawada T, et al. CD4+CD25bright T cells in human intestinal lamina propria as regulatory cells. *J Immunol* [Internet]. 2004 Sep 1;173(5):3119–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15322172>
160. Brimnes J, Allez M, Dotan I, Shao L, Nakazawa A, Mayer L. Defects in CD8+ regulatory T cells in the lamina propria of patients with inflammatory bowel disease. *J Immunol* [Internet]. 2005 May 1;174(9):5814–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15843585>
161. Kelly D, Campbell JI, King TP, Grant G, Jansson EA, Coutts AGP, et al. Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA. *Nat Immunol* [Internet]. 2004 Jan;5(1):104–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14691478>
162. Lees CW, Barrett JC, Parkes M, Satsangi J. New IBD genetics: common pathways with other diseases. *Gut* [Internet]. 2011 Dec;60(12):1739–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21300624>

163. Marks DJB, Harbord MWN, MacAllister R, Rahman FZ, Young J, Al-Lazikani B, et al. Defective acute inflammation in Crohn's disease: a clinical investigation. *Lancet (London, England)* [Internet]. 2006 Feb 25;367(9511):668–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16503465>
164. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* [Internet]. 2006 Feb 24;124(4):783–801. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16497588>
165. Peyrin-Biroulet L, Chamaillard M. Invited review: NOD2 and defensins: translating innate to adaptive immunity in Crohn's disease. *J Endotoxin Res* [Internet]. 2007 Jun 1;13(3):135–9. Available from: <http://ini.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/0968051907080429>
166. Peyrin-Biroulet L, Neut C, Colombel J-F. Antimycobacterial therapy in Crohn's disease: game over? *Gastroenterology* [Internet]. 2007 Jun;132(7):2594–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17570230>
167. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* [Internet]. 2001 May 31;411(6837):603–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11385577>
168. Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, King K, Hampe J, Croucher PJP, et al. The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* [Internet]. 2002 Apr;122(4):867–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11910337>
169. Cario E. Toll-like receptors in inflammatory bowel diseases: a decade later. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2010 Sep;16(9):1583–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20803699>
170. Yamamoto-Furusho J-K, Podolsky D-K. Innate immunity in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2007;13(42):5577–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22513299>
171. Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* [Internet]. 2000 Dec;68(12):7010–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11083826>
172. Vora P, Youdim A, Thomas LS, Fukata M, Tesfay SY, Lukasek K, et al. Beta-defensin-2 expression is regulated by TLR signaling in intestinal epithelial cells. *J Immunol* [Internet]. 2004 Nov 1;173(9):5398–405. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15494486>

173. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schäffeler E, Schlee M, et al. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* [Internet]. 2004 Nov;53(11):1658–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15479689>
174. Sartor RB. Mechanisms of Disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol & Hepatol* [Internet]. 2006 Jul;3(7):390–407. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncpgasthep0528>
175. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* [Internet]. 2010 Mar 19;140(6):805–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303872>
176. Wehkamp J, Koslowski M, Wang G, Stange EF. Barrier dysfunction due to distinct defensin deficiencies in small intestinal and colonic Crohn's disease. *Mucosal Immunol* [Internet]. 2008 Nov;1 Suppl 1:S67–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19079235>
177. Wehkamp J, Stange EF. Is there a role for defensins in IBD? *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2008 Oct;14:S85–7. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=0054725-200810002-00044>
178. SKARNES RC, WATSON DW. Antimicrobial factors of normal tissues and fluids. *Bacteriol Rev* [Internet]. 1957 Dec;21(4):273–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13488885>
179. Fleming A. On a Remarkable Bacteriolytic Element Found in Tissues and Secretions. *Proc R Soc B Biol Sci* [Internet]. 1922 May 1;93(653):306–17. Available from: <http://rspb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rspb.1922.0023>
180. Hirsch JG. Phagocytin: A bacterial substance from polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* [Internet]. 1956;103(5):589–611. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2136631/>
181. ZEYA HI, SPITZNAGEL JK. ANTIBACTERIAL AND ENZYMIC BASIC PROTEINS FROM LEUKOCYTE LYSOSOMES: SEPARATION AND IDENTIFICATION. *Science* [Internet]. 1963 Nov 22;142(3595):1085–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14068232>



182. Friedberg D, Friedberg I, Shilo M. Interaction of Gram-Negative Bacteria with the Lysosomal Fraction of Polymorphonuclear Leukocytes II. Changes in the Cell Envelope of *Escherichia coli*. *Infect Immun* [Internet]. 1970 Mar;1(3):311–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16557734>
183. Friedberg D, Shilo M. Interaction of Gram-Negative Bacteria with the Lysosomal Fraction of Polymorphonuclear Leukocytes I. Role of Cell Wall Composition of *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* [Internet]. 1970 Mar;1(3):305–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16557733>
184. Weiss J, Franson RC, Beckerdite S, Schmeidler K, Elsbach P. Partial characterization and purification of a rabbit granulocyte factor that increases permeability of *Escherichia coli*. *J Clin Invest* [Internet]. 1975 Jan;55(1):33–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1088909>
185. Ganz T, Selsted ME, Lehrer RI. Defensins. *Eur J Haematol* [Internet]. 2009 Apr 24;44(1):1–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0609.1990.tb00339.x>
186. Duclohier H. Antimicrobial peptides and peptaibols, substitutes for conventional antibiotics. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2010;16(28):3212–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20687880>
187. Tecle T, Tripathi S, Hartshorn KL. Review: Defensins and cathelicidins in lung immunity. *Innate Immun* [Internet]. 2010 Jun;16(3):151–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20418263>
188. Underwood MA, Bevins CL. Defensin-barbed innate immunity: clinical associations in the pediatric population. *Pediatrics* [Internet]. 2010 Jun;125(6):1237–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20478936>
189. Zilbauer M, Jenke A, Wenzel G, Goedde D, Postberg J, Phillips AD, et al. Intestinal alpha-defensin expression in pediatric inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2011 Oct;17(10):2076–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21910169>
190. Ayabe T, Satchell DP, Wilson CL, Parks WC, Selsted ME, Ouellette AJ. Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat Immunol* [Internet]. 2000 Aug;1(2):113–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11248802>

191. Ferguson LR, Browning BL, Huebner C, Petermann I, Shelling AN, Demmers P, et al. Single nucleotide polymorphisms in human Paneth cell defensin A5 may confer susceptibility to inflammatory bowel disease in a New Zealand Caucasian population. *Dig Liver Dis* [Internet]. 2008 Sep;40(9):723–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18394979>
192. Shi J. Defensins and Paneth cells in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2007 Oct;13(10):1284–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17567878>
193. Zilbauer M, Jenke A, Wenzel G, Postberg J, Heusch A, Phillips AD, et al. Expression of Human Beta-Defensins in Children with Chronic Inflammatory Bowel Disease. Bereswill S, editor. *PLoS One* [Internet]. 2010 Oct 22;5(10):e15389. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0015389>
194. Kohlgraf KG, Pingel LC, Dietrich DE, Brogden KA. Defensins as anti-inflammatory compounds and mucosal adjuvants. *Future Microbiol* [Internet]. 2010 Jan;5(1):99–113. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20020832>
195. Bocchinfuso G, Palleschi A, Orioni B, Grande G, Formaggio F, Toniolo C, et al. Different mechanisms of action of antimicrobial peptides: insights from fluorescence spectroscopy experiments and molecular dynamics simulations. *J Pept Sci* [Internet]. 2009 Sep;15(9):550–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19455510>
196. Cunliffe RN. Alpha-defensins in the gastrointestinal tract. *Mol Immunol* [Internet]. 2003 Nov;40(7):463–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14568393>
197. Wehkamp J, Schmid M, Stange EF. Defensins and other antimicrobial peptides in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* [Internet]. 2007 Jul;23(4):370–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17545771>
198. Cunliffe RN. Human defensin 5 is stored in precursor form in normal Paneth cells and is expressed by some villous epithelial cells and by metaplastic Paneth cells in the colon in inflammatory bowel disease. *Gut* [Internet]. 2001 Feb 1;48(2):176–85. Available from: <http://gut.bmj.com/cgi/doi/10.1136/gut.48.2.176>
199. Ding J, Chou Y-Y, Chang TL. Defensins in viral infections. *J Innate Immun* [Internet]. 2009;1(5):413–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20375599>

200. Simms LA, Doecke JD, Walsh MD, Huang N, Fowler E V, Radford-Smith GL. Reduced alpha-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. *Gut* [Internet]. 2008 Jul;57(7):903–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18305068>
201. Fu L-B, Yu J-L, Liu W-H. [Biological characteristics of defensin and its disease-resistance genetic engineering]. *Yi Chuan* [Internet]. 2011 May;33(5):512–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21586398>
202. Murphy KM. *Janeway's Immunobiology* [Internet]. Garland Science; 2011 [cited 2015 Oct 11]. 888 p. Available from: <https://books.google.com/books?id=WDMmAgAAQBAJ&pgis=1>
203. Pazgier M, Hoover DM, Yang D, Lu W, Lubkowski J. Human beta-defensins. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2006 Jun;63(11):1294–313. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16710608>
204. Ouellette AJ. Paneth cell  $\alpha$ -defensins in enteric innate immunity. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2011 Jul;68(13):2215–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21560070>
205. Chamailard M, Dessein R. Defensins couple dysbiosis to primary immunodeficiency in Crohn's disease. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2011 Feb 7;17(5):567–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21350705>
206. Wu Z, Ericksen B, Tucker K, Lubkowski J, Lu W. Synthesis and characterization of human alpha-defensins 4-6. *J Pept Res* [Internet]. 2004 Sep;64(3):118–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15317502>
207. Ghannam S, Dejou C, Pedretti N, Giot J-P, Dorgham K, Boukhaddaoui H, et al. CCL20 and  $\beta$ -defensin-2 induce arrest of human Th17 cells on inflamed endothelium in vitro under flow conditions. *J Immunol* [Internet]. 2011 Feb 1;186(3):1411–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21178014>
208. Biragyn A, Coscia M, Nagashima K, Sanford M, Young HA, Olkhanud P. Murine beta-defensin 2 promotes TLR-4/MyD88-mediated and NF-kappaB-dependent atypical death of APCs via activation of TNFR2. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2008 Apr;83(4):998–1008. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18192488>

209. Gersemann M, Wehkamp J, Stange EF. Innate immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *J Intern Med* [Internet]. 2012 May;271(5):421–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22324936>
210. Yadav PK, Chen C, Liu Z. Potential Role of NK Cells in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *J Biomed Biotechnol* [Internet]. 2011;2011:1–6. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2011/348530/>
211. Balducci E, Bonucci A, Picchianti M, Pogni R, Talluri E. Structural and Functional Consequences Induced by Post-Translational Modifications in  $\alpha$ -Defensins. *Int J Pept* [Internet]. 2011;2011:1–7. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/ijpep/2011/594723/>
212. You XJ, Bryant PJ, Jurnak F, Holcombe RF. Expression of Wnt pathway components frizzled and disheveled in colon cancer arising in patients with inflammatory bowel disease. *Oncol Rep* [Internet]. 2007 Sep;18(3):691–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17671721>
213. Wehkamp J, Wang G, Kübler I, Nuding S, Gregorieff A, Schnabel A, et al. The Paneth cell alpha-defensin deficiency of ileal Crohn's disease is linked to Wnt/Tcf-4. *J Immunol* [Internet]. 2007 Sep 1;179(5):3109–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17709525>
214. Kanmura S, Uto H, Numata M, Hashimoto S, Moriuchi A, Fujita H, et al. Human neutrophil peptides 1-3 are useful biomarkers in patients with active ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2009 Jun;15(6):909–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19107772>
215. Inaba Y, Ashida T, Ito T, Ishikawa C, Tanabe H, Maemoto A, et al. Expression of the antimicrobial peptide alpha-defensin/cryptidins in intestinal crypts decreases at the initial phase of intestinal inflammation in a model of inflammatory bowel disease, IL-10-deficient mice. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2010 Sep;16(9):1488–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20222124>
216. Yamaguchi N, Isomoto H, Mukae H, Ishimoto H, Ohnita K, Shikuwa S, et al. Concentrations of alpha- and beta-defensins in plasma of patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Res* [Internet]. 2009 Apr;58(4):192–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19184352>
217. Taylor K, Barran PE, Dorin JR. Structure-activity relationships in  $\beta$ -defensin peptides. *Biopolymers* [Internet]. 2008;90(1):1–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/bip.20900>

218. Ou G, Baranov V, Lundmark E, Hammarström S, Hammarström M-L. Contribution of intestinal epithelial cells to innate immunity of the human gut--studies on polarized monolayers of colon carcinoma cells. *Scand J Immunol* [Internet]. 2009 Feb;69(2):150–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19170965>
219. Zhang H, Yang X, Xie Q, Ma J, Luo Y, Cao Y, et al. The potent adjuvant effects of chicken beta-defensin-1 when genetically fused with infectious bursal disease virus VP2 gene. *Vet Immunol Immunopathol* [Internet]. 2010 Jul;136(1-2):92–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20334934>
220. Kocsis AK, Lakatos PL, Somogyvári F, Fuszek P, Papp J, Fischer S, et al. Association of beta-defensin 1 single nucleotide polymorphisms with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* [Internet]. 2008 Mar;43(3):299–307. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18938660>
221. Rahman A, Fahlgren A, Sitohy B, Baranov V, Zirakzadeh A, Hammarström S, et al. Beta-defensin production by human colonic plasma cells: a new look at plasma cells in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2007 Jul;13(7):847–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17387677>
222. Semple F, Webb S, Li H-N, Patel HB, Perretti M, Jackson IJ, et al. Human beta-defensin 3 has immunosuppressive activity in vitro and in vivo. *Eur J Immunol* [Internet]. 2010 Apr;40(4):1073–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20104491>
223. Chang Y-Y, Ouyang Q. [Expression and significance of mucosal beta-defensin-2, TNFalpha and IL-1beta in ulcerative colitis]. *Zhonghua nei ke za zhi* [Internet]. 2008 Jan;47(1):11–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18346318>
224. Salzman NH, Underwood MA, Bevins CL. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Semin Immunol* [Internet]. 2007 Apr;19(2):70–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17485224>
225. Aldhous MC, Noble CL, Satsangi J. Dysregulation of human beta-defensin-2 protein in inflammatory bowel disease. *PLoS One* [Internet]. 2009;4(7):e6285. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19617917>
226. Schneider JJ, Unholzer A, Schaller M, Schäfer-Korting M, Korting HC. Human defensins. *J Mol Med (Berl)* [Internet]. 2005 Aug;83(8):587–95. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15821901>

227. Bogefors J, Kvarnhammar AM, Höckerfelt U, Cardell L-O. Reduced tonsillar expression of human  $\beta$ -defensin 1, 2 and 3 in allergic rhinitis. *FEMS Immunol Med Microbiol* [Internet]. 2012 Aug;65(3):431–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22444247>
228. Carter JG, West SK, Painter S, Haynes RJ, Churchill AJ.  $\beta$ -Defensin 1 haplotype associated with postoperative endophthalmitis. *Acta Ophthalmol* [Internet]. 2010 Nov;88(7):786–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19706017>
229. Andresen E, Günther G, Bullwinkel J, Lange C, Heine H. Increased expression of beta-defensin 1 (DEFB1) in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One* [Internet]. 2011;6(7):e21898. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21818276>
230. Chen Q-X, Lv C, Huang L-X, Cheng B-L, Xie G-H, Wu S-J, et al. Genomic variations within DEFB1 are associated with the susceptibility to and the fatal outcome of severe sepsis in Chinese Han population. *Genes Immun* [Internet]. 2007 Jul;8(5):439–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17508030>
231. Joly S, Compton LM, Pujol C, Kurago ZB, Guthmiller JM. Loss of human beta-defensin 1, 2, and 3 expression in oral squamous cell carcinoma. *Oral Microbiol Immunol* [Internet]. 2009 Oct;24(5):353–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19702947>
232. Casalicchio G, Freato N, Maestri I, Comar M, Crovella S, Segat L. Beta defensin-1 gene polymorphisms and susceptibility to atypical squamous cells of undetermined significance lesions in Italian gynecological patients. *J Med Virol* [Internet]. 2014 Dec;86(12):1999–2004. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24435641>
233. Wilson TJ, Jobim M, Segat L, Bianco AM, Salim PH, Portela P, et al. DEFB1 gene 5' untranslated region (UTR) polymorphisms are marginally involved in inflammatory bowel disease in south Brazilians. *Int J Immunogenet* [Internet]. 2014 Apr;41(2):138–42. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/iji.12089>
234. Huang Y-P, Wang T-Y, Wang W, Sun H-Z. Association between Genetic Polymorphisms in DEFB1 and Susceptibility to Digestive Diseases. *Med Sci Monit* [Internet]. 2015;21:2240–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26232989>

235. Van Assche G, Dignass A, Panes J, Beaugerie L, Karagiannis J, Allez M, et al. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis* [Internet]. 2010 Feb;4(1):7–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21122488>
236. Dignass A, Lindsay JO, Sturm A, Windsor A, Colombel J-F, Allez M, et al. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 2: current management. *J Crohns Colitis* [Internet]. 2012 Dec;6(10):991–1030. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23040451>
237. Dignass A, Van Assche G, Lindsay JO, Lémann M, Söderholm J, Colombel JF, et al. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Current management. *J Crohns Colitis* [Internet]. 2010 Feb;4(1):28–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21122489>
238. Lewis JD. The utility of biomarkers in the diagnosis and therapy of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* [Internet]. 2011 May;140(6):1817–26.e2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21530748>
239. Iskandar HN, Ciorba MA. Biomarkers in inflammatory bowel disease: current practices and recent advances. *Transl Res* [Internet]. 2012 Apr;159(4):313–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22424434>
240. Bryant R V, Winer S, Travis SPL, Riddell RH. Systematic review: histological remission in inflammatory bowel disease. Is “complete” remission the new treatment paradigm? An IOIBD initiative. *J Crohns Colitis* [Internet]. 2014 Dec;8(12):1582–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25267173>
241. Lee SD, Cohen RD. Endoscopy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* [Internet]. 2002 Mar;31(1):119–32. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889855301000085>
242. Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J, D'Haens G, Hanauer SB, Irvine EJ, et al. A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2000 Feb;6(1):8–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10701144>
243. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel J-F. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* [Internet]. 2006 Jun;55(6):749–53. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16698746>

244. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott IDR, Bernstein CN, Brant SR, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* [Internet]. 2005 Sep;19 Suppl A:5A – 36A. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16151544>
245. Best WR, Beckett JM, Singleton JW, Kern F. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* [Internet]. 1976 Mar;70(3):439–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1248701>
246. Sandborn WJ, Feagan BG, Hanauer SB, Lochs H, Löfberg R, Modigliani R, et al. A review of activity indices and efficacy endpoints for clinical trials of medical therapy in adults with Crohn's disease. *Gastroenterology* [Internet]. 2002 Feb;122(2):512–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11832465>
247. Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, Mayer L, Present DH, Braakman T, et al. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N Engl J Med* [Internet]. 1997 Oct 9;337(15):1029–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9321530>
248. Harvey RF, Bradshaw MJ. Measuring Crohn's disease activity. *Lancet* (London, England) [Internet]. 1980 May 24;1(8178):1134–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6103463>
249. Irvine EJ. Usual therapy improves perianal Crohn's disease as measured by a new disease activity index. McMaster IBD Study Group. *J Clin Gastroenterol* [Internet]. 1995 Jan;20(1):27–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7884173>
250. Waye JD. The role of colonoscopy in the differential diagnosis of inflammatory bowel disease. *Gastrointest Endosc* [Internet]. 1977 Feb;23(3):150–4. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001651077736223>
251. Mary JY, Modigliani R. Development and validation of an endoscopic index of the severity for Crohn's disease: a prospective multicentre study. Groupe d'Etudes Thérapeutiques des Affections Inflammatoires du Tube Digestif (GETAID). *Gut* [Internet]. 1989 Jul;30(7):983–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2668130>



252. Landi B, Anh TN, Cortot A, Soule JC, Rene E, Gendre JP, et al. Endoscopic monitoring of Crohn's disease treatment: a prospective, randomized clinical trial. The Groupe d'Etudes Therapeutiques des Affections Inflammatoires Digestives. *Gastroenterology* [Internet]. 1992 May;102(5):1647–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1568574>
253. Daperno M, D'Haens G, Van Assche G, Baert F, Bulois P, Maunoury V, et al. Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD. *Gastrointest Endosc* [Internet]. 2004 Oct;60(4):505–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15472670>
254. Rutgeerts P, Geboes K, Vantrappen G, Beyls J, Kerremans R, Hiele M. Predictability of the postoperative course of Crohn's disease. *Gastroenterology* [Internet]. 1990 Oct;99(4):956–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2394349>
255. TRUELOVE SC, WITTS LJ. Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial. *Br Med J* [Internet]. 1955 Oct 29;2(4947):1041–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13260656>
256. Rutgeerts P, D'Haens G, Targan S, Vasiliauskas E, Hanauer SB, Present DH, et al. Efficacy and safety of retreatment with anti-tumor necrosis factor antibody (infliximab) to maintain remission in Crohn's disease. *Gastroenterology* [Internet]. 1999 Oct;117(4):761–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10500056>
257. Sands BE, Tremaine WJ, Sandborn WJ, Rutgeerts PJ, Hanauer SB, Mayer L, et al. Infliximab in the treatment of severe, steroid-refractory ulcerative colitis: a pilot study. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2001 May;7(2):83–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11383595>
258. Schroeder KW, Tremaine WJ, Ilstrup DM. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study. *N Engl J Med* [Internet]. 1987 Dec 24;317(26):1625–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3317057>
259. Elia PP, Tolentino YFM, Bernardazzi C, de Souza HSP. The Role of Innate Immunity Receptors in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2015;2015:1–10. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/mi/2015/936193/>
260. Scribano ML, Prantera C. Antibiotics and Inflammatory Bowel Diseases. *Dig Dis* [Internet]. 2013;31(3-4):379–84. Available from: <http://www.karger.com?doi=10.1159/000354704>

261. Lissner D, Siegmund B. Ulcerative colitis: current and future treatment strategies. *Dig Dis* [Internet]. 2013;31(1):91–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23797129>
262. Vermeire S, Ferrante M, Rutgeerts P. Republished: Recent advances: personalised use of current Crohn's disease therapeutic options. *Postgrad Med J* [Internet]. 2014 Mar;90(1061):144–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24534710>
263. Huppertz-Hauss G, Høivik ML, Langholz E, Odes S, Småstuen M, Stockbrugger R, et al. Health-related quality of life in inflammatory bowel disease in a European-wide population-based cohort 10 years after diagnosis. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2015 Feb;21(2):337–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25569735>
264. Toruner M, Loftus E V, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Orenstein R, Sandborn WJ, et al. Risk factors for opportunistic infections in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* [Internet]. 2008 Apr;134(4):929–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18294633>
265. Gorbach SL, Nahas L, Plaut AG, Weinstein L, Patterson JF, Levitan R. Studies of intestinal microflora. V. Fecal microbial ecology in ulcerative colitis and regional enteritis: relationship to severity of disease and chemotherapy. *Gastroenterology* [Internet]. 1968 Apr;54(4):575–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4385122>
266. Cominelli F, Nast CC, Duchini A, Lee M. Recombinant interleukin-1 receptor antagonist blocks the proinflammatory activity of endogenous interleukin-1 in rabbit immune colitis. *Gastroenterology* [Internet]. 1992 Jul;103(1):65–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1535326>
267. Shanahan F, Niederlehner A, Carramanzana N, Anton P. Sulfasalazine inhibits the binding of TNF alpha to its receptor. *Immunopharmacology* [Internet]. 1990;20(3):217–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1981213>
268. Craven PA, Pfanstiel J, Saito R, DeRubertis FR. Actions of sulfasalazine and 5-aminosalicylic acid as reactive oxygen scavengers in the suppression of bile acid-induced increases in colonic epithelial cell loss and proliferative activity. *Gastroenterology* [Internet]. 1987 Jun;92(6):1998–2008. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2883067>
269. Ahnfelt-Rønne I, Nielsen OH, Christensen A, Langholz E, Binder V, Riis P.

- Clinical evidence supporting the radical scavenger mechanism of 5-aminosalicylic acid. *Gastroenterology* [Internet]. 1990 May;98(5 Pt 1):1162–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1969825>
270. Grisham MB, Granger DN. 5-Aminosalicylic acid concentration in mucosal interstitium of cat small and large intestine. *Dig Dis Sci* [Internet]. 1989 Apr;34(4):573–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF01536335>
271. Marteau P, Probert CS, Lindgren S, Gassul M, Tan TG, Dignass A, et al. Combined oral and enema treatment with Pentasa (mesalazine) is superior to oral therapy alone in patients with extensive mild/moderate active ulcerative colitis: a randomised, double blind, placebo controlled study. *Gut* [Internet]. 2005 Jul;54(7):960–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15951542>
272. Kruis W, Jonaitis L, Pokrotnieks J, Mikhailova TL, Horynski M, Bátorvský M, et al. Randomised clinical trial: a comparative dose-finding study of three arms of dual release mesalazine for maintaining remission in ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet]. 2011 Feb;33(3):313–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21138455>
273. Munkholm P, Loftus E V, Reinacher-Schick A, Kornbluth A, Mittmann U, Esendal B. Prevention of colorectal cancer in inflammatory bowel disease: value of screening and 5-aminosalicylates. *Digestion* [Internet]. 2006;73(1):11–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16410688>
274. Akobeng AK, Gardener E. Oral 5-aminosalicylic acid for maintenance of medically-induced remission in Crohn's Disease. *Cochrane database Syst Rev* [Internet]. 2005;(1):CD003715. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15674913>
275. Modigliani R, Colombel JF, Dupas JL, Dapoigny M, Costil V, Veyrac M, et al. Mesalamine in Crohn's disease with steroid-induced remission: effect on steroid withdrawal and remission maintenance, Groupe d'Etudes Thérapeutiques des Affections Inflammatoires Digestives. *Gastroenterology* [Internet]. 1996 Mar;110(3):688–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8608877>
276. Feagan BG. Oral budesonide therapy for ulcerative colitis: a topical tale. *Gastroenterology* [Internet]. 1996 Jun;110(6):2000–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8964430>
277. Lichtenstein GR, Bengtsson B, Hapten-White L, Rutgeerts P. Oral budesonide for maintenance of remission of Crohn's disease: a pooled safety analysis. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet]. 2009 Mar 15;29(6):643–53. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19035972>

278. Faubion WA, Loftus E V, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population-based study. *Gastroenterology* [Internet]. 2001 Aug;121(2):255–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11487534>
279. Munkholm P, Langholz E, Davidsen M, Binder V. Frequency of glucocorticoid resistance and dependency in Crohn's disease. *Gut* [Internet]. 1994 Mar;35(3):360–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8150347>
280. Franchimont DP, Louis E, Croes F, Belaiche J. Clinical pattern of corticosteroid dependent Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 1998 Oct;10(10):821–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9831401>
281. Naftali T, Novis B, Pomeranz I, Leichtman G, Maor Y, Shapiro R, et al. Cyclosporin for severe ulcerative colitis. *Isr Med Assoc J* [Internet]. 2000 Aug;2(8):588–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10979350>
282. Lichtiger S, Present DH, Kornbluth A, Gelernt I, Bauer J, Galler G, et al. Cyclosporine in severe ulcerative colitis refractory to steroid therapy. *N Engl J Med* [Internet]. 1994 Jun 30;330(26):1841–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8196726>
283. Prantera C, Lochs H, Grimaldi M, Danese S, Scribano ML, Gionchetti P, et al. Rifaximin-extended intestinal release induces remission in patients with moderately active Crohn's disease. *Gastroenterology* [Internet]. 2012 Mar;142(3):473–81.e4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22155172>
284. Harries AD, Danis VA, Heatley R V. Influence of nutritional status on immune functions in patients with Crohn's disease. *Gut* [Internet]. 1984;25(5):465–72. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=6425120](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6425120)
285. Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF, et al. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet* (London, England) [Internet]. 2002 May 4;359(9317):1541–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12047962>

286. Sands BE, Anderson FH, Bernstein CN, Chey WY, Feagan BG, Fedorak RN, et al. Infliximab Maintenance Therapy for Fistulizing Crohn's Disease. *N Engl J Med* [Internet]. 2004 Feb 26;350(9):876–85. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa030815>
287. Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, et al. Infliximab for Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. *N Engl J Med* [Internet]. 2005 Dec 8;353(23):2462–76. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa050516>
288. Colombel J-F, Sandborn WJ, Rutgeerts P, Enns R, Hanauer SB, Panaccione R, et al. Adalimumab for maintenance of clinical response and remission in patients with Crohn's disease: the CHARM trial. *Gastroenterology* [Internet]. 2007 Jan;132(1):52–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17241859>
289. Siegel CA, Marden SM, Persing SM, Larson RJ, Sands BE. Risk of lymphoma associated with combination anti-tumor necrosis factor and immunomodulator therapy for the treatment of Crohn's disease: a meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2009 Aug;7(8):874–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19558997>
290. Neurath MF, Travis SPL. Mucosal healing in inflammatory bowel diseases: a systematic review. *Gut* [Internet]. 2012 Nov;61(11):1619–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22842618>
291. Lichtenstein GR, Hanauer SB, Kane S V, Present DH. Crohn's is not a 6-week disease: lifelong management of mild to moderate Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2004 Jul;10 Suppl 2:S2–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15475770>
292. Henriksen M, Jahnsen J, Lygren I, Sauar J, Schulz T, Stray N, et al. Change of diagnosis during the first five years after onset of inflammatory bowel disease: results of a prospective follow-up study (the IBSEN Study). *Scand J Gastroenterol* [Internet]. 2006 Sep;41(9):1037–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16938716>
293. Solberg IC, Lygren I, Jahnsen J, Aadland E, Høie O, Cvancarova M, et al. Clinical course during the first 10 years of ulcerative colitis: results from a population-based inception cohort (IBSEN Study). *Scand J Gastroenterol* [Internet]. 2009;44(4):431–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19101844>
294. Bodger K, Ormerod C, Shackcloth D, Harrison M, IBD Control Collaborative. Development and validation of a rapid, generic measure of disease control

- from the patient's perspective: the IBD-control questionnaire. *Gut* [Internet]. 2014 Jul;63(7):1092–102. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24107590>
295. Guyatt GH, Feeny DH, Patrick DL. Measuring health-related quality of life. *Ann Intern Med* [Internet]. 1993 Apr 15;118(8):622–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8452328>
296. Henriksen M, Jahnsen J, Lygren I, Aadland E, Schulz T, Vatn MH, et al. Clinical course in Crohn's disease: results of a five-year population-based follow-up study (the IBSEN study). *Scand J Gastroenterol* [Internet]. 2007 May;42(5):602–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17454881>
297. Solberg IC, Cvancarova M, Vatn MH, Moum B, IBSEN Study Group. Risk matrix for prediction of advanced disease in a population-based study of patients with Crohn's Disease (the IBSEN Study). *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2014 Jan;20(1):60–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24280875>
298. Frei R, Akdis M, O'Mahony L. Prebiotics, probiotics, synbiotics, and the immune system: experimental data and clinical evidence. *Curr Opin Gastroenterol* [Internet]. 2015 Mar;31(2):153–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25594887>
299. Tomasello Giovanni, Tralongo Pietro, Jurjus Abdo, Hisham Daouk, Inaya Hajj Hussein, Matar Michel LA. Targeted Therapies for Inflammatory Bowel Disease and Colorectal Cancer: An Increasing Need for Microbiota-Intestine Mutualism. *J Int Transl Med* [Internet]. 2015 [cited 2015 Oct 11];3(2):123–9. Available from: <http://www.jitm.hk/CN/abstract/abstract150.shtml>
300. Zhang F-M. Fecal microbiota transplantation for severe enterocolonic fistulizing Crohn's disease. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2013;19(41):7213. Available from: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v19/i41/7213.htm>
301. Kump PK, Gröchenig H-P, Lackner S, Trajanoski S, Reicht G, Hoffmann KM, et al. Alteration of intestinal dysbiosis by fecal microbiota transplantation does not induce remission in patients with chronic active ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2013 Sep;19(10):2155–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23899544>
302. Heapy AM, Williams GM, Fraser JD, Brimble MA. Synthesis of a dicarba analogue of human  $\beta$ -defensin-1 using a combined ring closing metathesis--native chemical ligation strategy. *Org Lett* [Internet]. 2012 Feb 3;14(3):878–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22239540>

303. Ho S, Pothoulakis C, Koon HW. Antimicrobial peptides and colitis. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2013;19(1):40–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22950497>

## 7. ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS

(Publicado no Int J Immunogenet 2014 Apr;41(2):138–42)  
<http://doi.wiley.com/10.1111/iji.12089>

### DEFB1 GENE 5' UNTRANSLATED REGION (UTR) POLYMORPHISMS ARE MARGINALLY INVOLVED IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASE IN SOUTH BRAZILIANS

#### Authors

T. J. Wilson<sup>1</sup>, M. Jobim<sup>1</sup>, L. Segat<sup>2</sup>, A. M. Bianco<sup>2</sup>, P. H. Salim<sup>1</sup>, P. Portela<sup>1</sup>, L. F. Jobim<sup>1,3</sup>, D. C. Damim<sup>4,5</sup>, G. Schwartzmann<sup>3,6,7</sup>, R. Roesler<sup>6,7,8</sup>, S. Crovella<sup>9</sup>

#### Correspondence:

Mariana Jobim

Department of Immunology

Hospital de Clinicas

Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, Brazil.

Tel/fax: 55 51 3359 8020; E-mail: [mjobim@hcpa.ufrgs.br](mailto:mjobim@hcpa.ufrgs.br)

#### Author Information

<sup>1</sup>Department of Immunology, Hospital de Clínicas, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup>Institute for Maternal and Child Health—IRCCS “Burlo Garofolo”, Trieste, Italy

<sup>3</sup>Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>4</sup>Division of Coloproctology, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>5</sup>Department of Surgery, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>6</sup>Cancer Research Laboratory, University Hospital Research Center (CPE-HCPA), Porto Alegre, Brazil

<sup>7</sup>National Institute for Translational Medicine, Porto Alegre, Brazil

<sup>8</sup>Laboratory of Neuropharmacology and Neural Tumor Biology, Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil



<sup>9</sup>Department of Genetics, federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

## SUMMARY

The possible association of three DEFB1 gene polymorphisms with susceptibility to develop ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) was investigated in Brazilian patients and controls. Although a clear and strong association between functional 5'-UTR DEFB1 SNPs and susceptibility/protection to IBDs cannot be drawn, our results suggest a possible involvement of DEFB1 gene in inflammatory bowel diseases, especially with the colonic localization of Crohn's disease.

## INTRODUCTION

Ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) are the two main forms of chronic inflammatory bowel diseases (IBDs); although having an unknown aetiology, they are believed to result from a complex interaction of several genetic and environmental factors, leading to an inappropriate inflammatory response and disease development (Podolsky, [2002](#)).

Recent evidence suggests that innate immunity plays an important role in triggering the inflammatory cascade and the subsequent pathological adaptive immune responses, characteristics of IBD (Xavier & Podolsky, [2007](#)). The normal mucosal barrier on the bowel wall separates the host from immunological challenges represented by bacteria, viruses, fungi and food antigens within the lumen. While contributing to protection of host from invasion by establishing a rapid response to pathogens, innate immune mechanisms also allow the coexistence of commensal agents. In IBD, a break in the tolerance occurs and inflammation supervenes, driven by the intestinal microbial flora (Lakatos *et al.*, [2006](#); Sartor, [2008](#)).

Human  $\beta$ -defensins (HBDs) are small peptides that belong to the innate immune system and act in the first steps of human defence (Schneider *et al.*, [2005](#)). These peptides, produced by the epithelial cells of intestinal mucosa, are characterized by antimicrobial activities against a broad range of fungi, bacteria and viruses. In addition, HBDs are considered a link between innate and adaptive

immunity acting as 'microchemokine' (Yang *et al.*, [1999](#)). HBDs are encoded by two gene clusters located at 8p23.1 and 20p13 (Dork & Stuhmann, [1998](#); Rodríguez-Jiménez *et al.*, [2003](#)); the *DEFB1* gene (8p23), encoding for the human beta-defensin 1 (HBD-1), is constitutively expressed by epithelial cells of a wide variety of tissues, but its expression can vary between individuals and can be modified during the inflammatory process (Harder *et al.*, [1997](#); Bals, [2000](#)). Impaired production of defensins appears to contribute to the pathogenesis of IBDs, and a decrease in HBD-1 expression was reported in the mucosa of patients with CD and UC. Because a correlation between *DEFB1* expression and single nucleotide polymorphisms (SNPs) present in the regulatory region of the gene has been reported (Sun *et al.*, [2006](#); Milanese *et al.*, [2007](#)), we analysed the possible association of 5' untranslated region (UTR) *DEFB1* SNPs, namely -52G>A (rs1799946) -44C>G (rs1800972) and -20G>A (rs11362), with the susceptibility to inflammatory bowel diseases in a group of patients with IBD (CD and UC) and healthy controls from south Brazil.

## MATERIAL AND METHODS

### Patients and controls

A total of 149 patients with IBD from 'Hospital de Clínicas de Porto Alegre' (75 men and 74 women) and 200 healthy controls from the same geographical area (100 men and 100 women) were enrolled at the Brazilian bone marrow centre. Among the patients with IBD, 79 presented with CD and 70 with UC. The diagnosis of IBD was based on standard clinical, radiological and histological criteria, in accordance with the recent consensus on IBD published by the European Crohn's and Colitis Organization (ECCO) (Stange *et al.*, [2006](#), [2008](#)).

For 71 of the 79 patients with CD, a classification of the disease according to anatomical localization of the disease was also possible: 15 patients (21%) presented ileal CD, 42 (59%) presented ileocolonic CD and 14 (19%) presented colonic CD.

The 200 healthy controls were obtained from the bone marrow donor centre, in which they must disclose any ailment treated or under treatment, when registering. None of them had a record of IBD treatment.

The mean age was  $40.19 \pm 12.01$  ( $\pm$ SD) years for the patients and  $38.58 \pm 10.49$  years for the controls.

Informed consent was obtained from all patients and controls, and the study was approved by the Research Ethics Board of 'Hospital de Clínicas de Porto Alegre' (100033).

#### DEFB1 SNP genotyping

Blood samples were collected into tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid. DNA was extracted using a salting-out procedure. The three polymorphisms (rs1799946, rs1800972 and rs11362) in the 5'-UTR region of the *DEFB1* gene were genotyped by direct sequencing with Big Dye Terminator chemistry and an ABI 3130 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA) using primers and protocols previously described in the literature (Jurevic *et al.*, [2003](#); Braida *et al.*, [2004](#)). The sequences were analysed with the 4peaks software (<http://www.mekentosj.com/science/4peaks>).

#### Statistical analysis

Data were analysed using the SPSS 11.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Allele and genotype frequencies were compared using Fisher's exact test. The haplotype frequencies were obtained according to the EM algorithm using the Arlequin software (version 3.11) (Excoffier *et al.*, [2005](#)). *P*-values  $<0.05$  were considered as statistically significant; odds ratios (OR), with 95% confidence intervals, were calculated for statistically significant comparisons.

## RESULTS

SNP frequency distributions were in Hardy–Weinberg equilibrium for both patients and controls, with the exception of the -52G>A SNP in controls ( $P = 0.004$ ,  $\chi^2 = 8.29$ ) and -20G>A SNP in patients with UC ( $P = 0.018$ ,  $\chi^2 = 5.57$ ).

No statistically significant differences were observed in the distribution of allelic frequencies for *DEFB1* -52G>A, -44C>G and -20G>A SNPs between the totality of patients with IBD and healthy controls (Table 1). When patients with CD were stratified according to the CD anatomical localization, the -20G>A A allele was more frequent in patients with colonic CD than controls (65% vs. 44%,  $P = 0.048$ ). Similarly, the A/A genotype was more frequent in patients with colonic CD than controls (36% vs. 16%), but in this case, the difference was not statistically significant ( $P = 0.07$ ).

**Table 1.** Allele, genotype and haplotype frequencies (and count) of the 5'-UTR DEFBI polymorphisms in healthy controls and patients with CD and UC

SNPs	Healthy Controls <i>n</i> = 200	Patients with IBD								Total IBD <i>n</i> = 149	<i>P</i> -value <sup>a</sup>		
		Patients with CD				Patients with UC		Total CD <i>n</i> = 79	<i>P</i> -value <sup>a</sup>				
		Ileal CD <i>n</i> = 15	<i>P</i> -value <sup>a</sup>	Ileo-colonic CD <i>n</i> = 42	<i>P</i> -value <sup>a</sup>	colonic CD <i>n</i> = 14	<i>P</i> -value <sup>a</sup>					Total UC <i>n</i> = 70	<i>P</i> -value <sup>a</sup>
<b>-52 (G/A)</b>													
Alleles													
G	(228/400) 0.57	(20/30) 0.67	0.342	(45/84) 0.54	0.629	(21/28) 0.75	0.075	(94/158) 0.59	0.635	(84/140) 0.60	0.552	(178/298) 0.60	0.486
A	(172/400) 0.43	(10/30) 0.33		(39/84) 0.46		(7/28) 0.25		(64/158) 0.41		(56/140) 0.40		(120/298) 0.40	
Genotypes													
G/G	(55/200) 0.28	(7/15) 0.47	0.242	(13/42) 0.31	0.152	(7/14) 0.50	0.128	(30/79) 0.38	0.049*	(27/70) 0.39	0.061	(57/149) 0.38	0.012*
G/A	(118/200) 0.59	(6/15) 0.40		(19/42) 0.45		(7/14) 0.50		(34/79) 0.43		(30/70) 0.43		(64/149) 0.43	
A/A	(27/200) 0.14	(2/15) 0.13		(10/42) 0.24		(0/14) 0.0		(15/79) 0.19		(13/70) 0.19		(28/149) 0.19	
<b>-44 (C/G)</b>													
Alleles													
C	(333/400) 0.83	(23/30) 0.76	0.325	(70/84) 0.83	1	(23/28) 0.82	0.798	(132/158) 0.84	1	(119/140) 0.85	0.691	(251/298) 0.84	0.757
G	(67/400) 0.17	(7/30) 0.24		(14/84) 0.17		(5/28) 0.18		(26/158) 0.16		(21/140) 0.15		(47/298) 0.16	
Genotypes													
C/C	(138/200) 0.69	(9/15) 0.60	0.380	(29/42) 0.69	1	(10/14) 0.72	0.349	(56/79) 0.71	0.748	(52/70) 0.74	0.420	(108/149) 0.72	0.452
C/G	(57/200) 0.28	(5/15) 0.33		(12/42) 0.29		(3/14) 0.21		(20/79) 0.25		(15/70) 0.21		(35/149) 0.23	
G/G	(5/200) 0.02	(1/15) 0.07		(1/42) 0.03		(1/14) 0.07		(3/79) 0.04		(3/70) 0.04		(6/149) 0.04	
<b>-20 (G/A)</b>													
Alleles													
G	(226/400) 0.56	(16/30) 0.53	0.849	(53/84) 0.63	0.277	(10/28) 0.35	0.048*	(88/158) 0.56	0.925	(75/140) 0.54	0.555	(163/298) 0.55	0.645
A	(174/400) 0.44	(14/30) 0.47		(31/84) 0.37		(18/28) 0.65		(70/158) 0.44		(65/140) 0.46		(135/298) 0.45	
Genotypes													
G/G	(58/200) 0.29	(5/15) 0.33	0.401	(17/42) 0.40	0.361	(1/14) 0.07	0.076	(24/79) 0.30	0.761	(25/70) 0.36	0.011*	(49/149) 0.33	0.077
G/A	(110/200) 0.55	(6/15) 0.40		(19/42) 0.45		(8/14) 0.57		(40/79) 0.51		(25/70) 0.36		(65/149) 0.44	
A/A	(32/200) 0.16	(4/15) 0.27		(6/42) 0.14		(5/14) 0.36		(15/79) 0.19		(20/70) 0.29		(35/149) 0.23	
Haplotypes													
ACG	(152/400) 0.38	(9/30) 0.30	0.653	(37/84) 0.44	0.628	(5/28) 0.18	0.131	(62/158) 0.39	0.980	(52/140) 0.37	0.817	(113/298) 0.38	0.314
GCA	(160/400) 0.40	(13/30) 0.43		(28/84) 0.33		(16/28) 0.57		(66/158) 0.42		(62/140) 0.44		(128/298) 0.43	
GGG	(64/400) 0.16	(7/30) 0.23		(15/84) 0.18		(5/28) 0.18		(25/158) 0.16		(21/140) 0.15		(48/298) 0.16	
Other	(24/400) 0.06	(1/30) 0.03		(4/84) 0.05		(2/28) 0.07		(8/158) 0.03		(6/140) 0.04		(9/298) 0.03	

CD, Crohn's disease; UC, ulcerative colitis; IBD, inflammatory bowel diseases.

<sup>a</sup>Fisher's exact test calculated vs. healthy controls.

\*Statistically significant *P*-values.

The A/A genotype was also more frequent in patients with UC than in healthy controls (A/A vs. G/G+G/A,  $P = 0.03$  OR = 2.09, 95%CI: 1.04–4.16), indicating an association with susceptibility to UC.

Statistically significant differences were also seen in genotype frequencies distribution for the -52G>A SNP. The -52G>A G/A genotype was more frequent in controls (59%) than patients with IBD and CD (43%) (G/A vs. G/G+A/A  $P = 0.003$ , OR = 0.52, 95% CI = 0.33–0.82, and  $P = 0.016$ , OR = 0.53, 95% CI = 0.30–0.92, respectively), suggesting an association with protection towards disease development, while the -52G>A G/G genotype was more frequent in patients with IBD than controls ( $P = 0.037$ , OR = 1.63, 95%CI 1.01–2.63) and thus associated with increased susceptibility.

Finally, we reconstructed *DEFB1* haplotypes and analysed their distribution in patients with IBD (CD and UC) and healthy controls. The three *DEFB1* SNPs were in linkage disequilibrium in the CD, UC and control subjects and combined into three major haplotypes (GCA, ACG and GGG, with frequency >5%) and three minor haplotypes (AGG, GCG and ACA, with frequency <5%, indicated as 'other' in Table 1). No statistically significant differences were observed, except for the ACG haplotype that was less frequent in patients with colonic CD than controls (18% vs. 38%; ACG vs. GCA  $P = 0.040$ , OR = 0.330, 95%CI 0.092–0.972).

## DISCUSSION AND CONCLUSION

A growing body of evidence has arisen in the recent years concerning the role of innate immunity in the development of IBD. The innate immune system maintains a defensive wall between the luminal microbes and the gut epithelium, thereby protecting the host against infections; there is a general agreement that these microorganisms are of particular relevance in the development and maintenance of CD and UC (Gersemann *et al.*, [2012](#)).

To our knowledge, few studies have previously investigated the role of *DEFB1* SNPs in IBD. Recently, Zanin *et al.* found no differences in *DEFB1* -

52G>A, -44C>G and -20G>A SNP alleles, genotype or haplotype frequency between Italian patients with IBD (108 CD and 37 UC) and controls, although some trends of association were evidenced for CD and especially for certain anatomical localization of the disease. In the Italian study, the -20G>A A allele was slightly more frequent in patients with CD (especially colonic patients) than in healthy subjects. Similarly, our findings showed that the -20G>A A allele was more frequent in patients with colonic CD than controls. In line with these results, Kocsis *et al.*, **2008** also reported that the -20 G/G genotype was more frequent in controls than in patients with colonic CD. In our study, the homozygous A/A genotype was also more frequent in patients with UC than in healthy controls.

The -44C>G SNP has been reported to be protective towards colonic CD development and to positively regulate the expression of *DEFB1* (Peyrin-Biroulet *et al.*, **2010**); in the Zanin *et al.* study, the -44C>G C allele was more frequent in patients with colonic localization (although not at a statistically significant level), and Kocsis *et al.* reported a significant increase in the -44 CC genotype in ileocolonic patients and to a lesser extent in colonic patients. Conversely we did not find any difference in the frequency distributions of the -44C>G polymorphisms.

Differently from Kocsis *et al.*, who did not evidence any association between -52G>A SNP and CD, in our study, significant differences were also seen in genotype frequencies distribution for the -52G>A SNP. In fact, the heterozygous -52G>A G/A genotype was more frequent in controls than patients with IBD and CD, and the G/G genotype was more frequent in patients with IBD than controls. Zanin *et al.* reported a slight increase in the -52G>A G allele frequency in patients with ileal localization of CD.

IBDs are multifactorial diseases, and many genetic loci (over 163) other than *DEFB1* have been already indicated as candidates for susceptibility to CD or UC in different association or GWAS (Brant, **2013**). In the case of *DEFB1*, a strong involvement in IBDs was not univocally found in independent association studies, but nonetheless it is not excluded that *DEFB1* gene could be one of the several factors in the 'Universe' of genetic variants involved in IBDs (already described and well characterized in the paper from Tommasini *et al.*, **2010**) that possibly act as modest modifiers of the susceptibility/protection phenotype.

When looking at our and the other results in the literature (Kocsis *et al.*; Zanin *et al.*, [2012](#); Peyrin-Biroulet *et al.*, [2010](#)), it appears that a clear strong association between functional 5'-UTR *DEFB1* SNPs and susceptibility/protection to IBDs cannot be drawn; nonetheless, some association does exist, especially with the colonic localization of CD.

The regional localizations of Crohn's disease, ileal or colonic disease, can be linked to different defensins profiles. In the colonic form of Crohn's disease, a diminished beta-defensin 1 expression in enterocytes has been reported, while HBD-1 shows a stable ileal expression, which remains unchanged in the case of disease, suggesting that this peptide does not play an important role in the case of ileitis, where instead ileal Paneth cell alpha-defensins HD5 and HD6 are supposed to play a major role (Wehkamp *et al.*, [2005](#)). A deficiency in the antimicrobial defence systems of defensins may be a reasonable and plausible explanation for the break of the antibacterial barrier function in IBDs. Polymorphisms in the regulatory region of a gene, such as *DEFB1*, could differently affect the transcriptional control and be detrimental in some cells or district (where the encoded protein has an pivotal role) and not in others, where different peptides are involved. Unfortunately, only DNA samples from the patients were available for this study, so an analysis of *DEFB1* expression level has not been possible.

All this considered, we think that the *DEFB1* gene and the encoded HBD-1 should be considered as possibly involved in IBDs, and further genetic as well as functional studies are recommended.

#### ACKNOWLEDGEMENT

This work was partially supported by a grant from Italian Ministry of Health RC 40/11 and 'Regione Friuli Venezia Giulia' (R3A2).



## REFERENCES

- Bals, R. (2000) Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respiratory Research*, **1**, 141.
- Braida, L., Boniotto, M., Pontillo, A., Tovo, P.A., Amoroso, A. & Crovella, S. (2004) A single-nucleotide polymorphism in the human beta-defensin 1 gene is associated with HIV-1 infection in Italian children. *AIDS*, **18**, 1598.
- Brant, S.R. (2013) Promises, delivery, and challenges of inflammatory bowel disease risk gene discovery. *Clin Gastroenterol Hepatol*, **11**, 22.
- Dork, T., Stuhmann, M. (1998) Polymorphisms of the human betadefensin-1 gene. *Molecular and Cellular Probes*, **12**, 171.
- Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S. (2005) Arlequin ver 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **1**, 47.
- Gersemann, M., Wehkamp, J. & Stange, E.F. (2012) Innate immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *M Review of J Internal Medicine*, **271**, 421.
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E. & Schröder, J.M. (1997) A peptide antibiotic from human skin. *Nature*, **387**, 861.
- Jurevic, R.J., Bai, M., Chadwick, R.B., White, T.C. & Dale, B.A. (2003) Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in human beta-defensin 1: high-throughput SNP assays and association with candida carriage in type 1 diabetics and nondiabetic controls. *Journal of Clinical Microbiology*, **41**, 90.
- Kocsis, A.K., Lakatos, P.L., Somogyva'ri, F., Fuszek, P., Papp, J., Fischer, S. *et al.* (2008) Association of beta-defensin 1 single nucleotide polymorphisms with Crohn's disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, **3**, 299.
- Lakatos, P.L., Fischer, S., Lakatos, L., Gal, I. & Papp, J. (2006) Current concept on the pathogenesis of IBD: crosstalk between genetic and microbial factors. Pathogenic bacteria, altered bacterial sensing or changes in mucosal integrity take "toll"? *World Journal of Gastroenterology*, **12**, 1829.
- Milanese, M., Segat, L. & Crovella, S. (2007) Transcriptional effect of DEFB1 gene 5' untranslated region polymorphisms. *Cancer Research*, **67**, 5997.
- Peyrin-Biroulet, L., Beisnerd, J., Wang, G., Nuding, S., Oommeng, S.T. & Kelly, D. (2010) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation is required for maintenance of innate antimicrobial immunity in the colon. *PNAS*, **107**, 8772.
- Podolsky, D.K. (2002) Inflammatory bowel disease. *New England Journal of Medicine*, **347**, 417.

Rodríguez-Jiménez, F.J., Krause, A., Schulz, S., Forssmann, W.G., Conejo-Garcia, J.R., Schreeb, R. & Motzkus, D. (2003) Distribution of new human beta-defensin genes clustered on chromosome 20 in functionally different segments of epididymis. *Genomics*, **81**, 175.

Sartor, R.B. (2008) Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, **134**, 577.

Schneider, J.J., Unholzer, A., Schaller, M., Schäfer-Korting, M. & Korting, H.C. (2005) Human defensins. *Journal of Molecular Medicine*, **83**, 587.

Stange, E.F., Travis, S.P.L., Vermeire, S., Beglinger, C., Kupcinkas, L., Geboes, K. *et al.* (2006) European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut*, **55**(suppl), i1.

Stange, E.F., Travis, S.P.L., Vermeire, S., Reinisch, W., Geboes, K., Barakauskiene, A. *et al.* (2008) European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: definitions and diagnosis. *Journal of Crohn's and Colitis*, **2**, 1.

Sun, C.Q., Arnold, R., Fernandez-Golarz, C., Parrish, A.B., Almekinder, T., He, J. *et al.* (2006) Human  $\beta$ -defensin-1, a potential chromosome 8p tumor suppressor: control of transcription and induction of apoptosis in renal cell carcinoma. *Cancer Research*, **66**, 8542.

Tommasini, A., Pirrone, A., Palla, G., Taddio, A., Martelossi, S., Crovella, S. & Ventura, A. (2010) The universe of immune deficiencies in Crohn's disease: a new viewpoint for an old disease? *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, **45**, 1141.

Wehkamp, J., Schmid, M., Fellermann, K. & Stange, E.F. (2005) Defensin deficiency, intestinal microbes, and the clinical phenotypes of Crohn's disease. *Journal of Leukocyte Biology*, **77**, 460.

Xavier, R.J. & Podolsky, D.K. (2007) Unraveling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, **448**, 427.

Yang, D., Chertov, O., Bykovskaia, S.N., Chen, Q., Buffo, M.J., Shogan, J. *et al.* (1999) Betadefensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science*, **286**, 525.

Zanin, V., Segat, L., Bianco, A.M., Padovan, L., Tavares, C.N. & Crovella, S. (2012) DEFB1 gene 5' untranslated region (UTR) polymorphisms in inflammatory bowel diseases. *Clinics (Sao Paulo)*, **67**, 395.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As DII são o resultado de uma interação complexa entre imunidade inata e adaptativa em indivíduos geneticamente suscetíveis, expostos ao meio ambiente e a uma flora intestinal ativa.

A avaliação de cada componente desta interação é fundamental para conhecermos a doença, em todas as suas apresentações, e atuarmos na prevenção e tratamento de forma mais efetiva.

A formação de biobancos está se tornando realidade nos centros médicos maiores, desta forma coletando grande quantidade de dados moleculares de ensaios genômicos, proteômicos e microbiômicos de pacientes com DII. A partir destes dados, espera-se que, em breve, assinaturas de cada aspecto analisado possam ser comparadas com informações de fenótipo de subgrupos de pacientes, possibilitando melhorar da sua classificação, oferecendo perspectivas de prever evolução clínica, selecionar a forma mais lógica de tratamento e prever resultados.

Um tratamento realmente efetivo deve abordar todos os elementos envolvidos.

Tendo em vista o fato de que a imunidade inata desempenha um papel fundamental na DII, acreditamos que este possa ser o foco de novos tratamentos num futuro próximo. Por fazer parte desta imunidade inata, acreditamos que as defensinas e os genes que os codificam, incluindo a *DEFB1*, devam ser objeto de interesse e pesquisa nestes próximos anos. A possibilidade de administrar defensinas, produzidas em laboratório, em ensaios clínicos em pacientes com DII é plausível num futuro próximo.

## 9. ANEXOS

### PROTOCOLO DE COLETA DE DADOS

#### Estudo do polimorfismo do gene *DEFB1* em pacientes com doença inflamatória intestinal e controles no sul do Brasil.

( ) Retocolite Ulcerativa ou ( ) Doença de Crohn ou ( ) Grupo Controle

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Número do paciente: \_\_\_\_\_

Número do prontuário: \_\_\_\_\_

Raça: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Tipagem SNP *DEFB1*: \_\_\_\_\_

## **TERMO DE CONSENTIMENTO DOS PACIENTES**

**TÍTULO: Estudo do polimorfismo do gene *DEFB1* em pacientes com doença inflamatória intestinal e controles no sul do Brasil.**

Nome:

Número do prontuário:

Fone:

Data:

### **INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA E OBJETIVO:**

A doença de Crohn e a retocolite ulcerativa são doenças inflamatórias intestinais crônicas de causa ainda desconhecida.

Devido ao forte componente imunológico das doenças citadas, o objetivo deste estudo será fazer uma análise da frequência dos genes *DEFB1* em pacientes com Doença de Crohn e retocolite ulcerativa e comparar os resultados com indivíduos sadios.

O estudo pretende, com esta comparação, saber mais sobre o funcionamento genético da doença, sendo de grande importância, pois ainda não existem pesquisas claras sobre o assunto.

### **MÉTODO:**

A coleta do exame é realizada por punção venosa, como num simples exame de sangue realizado de rotina. Após a coleta, a amostra de sangue é levada para o Laboratório da Imunologia no próprio hospital, onde por técnicas laboratoriais, se chega ao resultado desejado (a tipagem dos genes de cada indivíduo).

### **Tempo de permanência:**

Este estudo não necessita de tempo de permanência. Basta coletar o sangue.

Todas as informações sobre a pesquisa estão disponíveis.

Os participantes podem aceitar, assim como se recusar a participar do estudo. Também podem descontinuar a pesquisa a qualquer momento, sem prejuízo ou penalidade do seu atendimento na instituição.

Os participantes não recebem qualquer valor em dinheiro, mas terão a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade.

**CONFIDENCIALIDADE:**

O nome do participante não aparecerá em qualquer momento do estudo, pois será identificado com um número.

**RISCOS E DESCONFORTOS:**

O estudo não apresenta riscos. O único desconforto é a coleta de sangue, como num exame de rotina.

**BENEFÍCIOS:**

O benefício do estudo seria ter mais conhecimento genético sobre a doença de Crohn e retocolite ulcerativa.

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Eu, \_\_\_\_\_ pelo presente termo de compromisso compreendi para que serve o estudo e qual procedimento a que serei submetido. O termo que li, esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará meu atendimento e tratamento. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo.

Eu CONCORDO em fazer parte do estudo voluntariamente. Data:

\_\_\_\_\_  
Nome Legível

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Em caso de dúvida, for favor ligar para Dr Timothy Wilson, pesquisador que executará a técnica  
Fones: 33598020

Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Rua Ramiro Barcelos 2350- Serviço de Imunologia

**TERMO DE CONSENTIMENTO DO GRUPO CONTROLE (REDOME)**

REGISTRO BRASILEIRO DE DOADORES VOLUNTARIOS

DE MEDULA OSSEA – REDOME

***TERMO DE CONSENTIMENTO***

Eu, \_\_\_\_\_, abaixo assinado(a) e acima qualificado(a), pelo presente instrumento CONSENTIMENTO que os meus dados cadastrais, o resultado de minha tipificação HLA e os outros resultados dos exames de histocompatibilidade / Imunogenética sejam incluídos no REGISTRO BRASILEIRO DE DOADORES VOLUNTÁRIOS DE MEDULA OSSEA - REDOME, coordenado pelo Laboratório de Imunogenética do Instituto Nacional de Câncer — INCA, do Ministério da Saúde. A amostra coletada nesta ocasião poderá ser utilizada em possíveis testes genéticos futuros, desde que de maneira sigilosa.

Nesta data recebi as orientações sobre o que é o transplante de medula óssea e o transplante de células precursoras e estou ciente de que:

O candidato a doador de medula óssea e/ou tecidos hematopoéticos deve encontrar-se em bom estado de saúde.

Na oportunidade de ser selecionado, o doador deverá passar por exames clínicos e laboratoriais que atestem a inexistência de doença, especialmente as infectocontagiosas.

Na oportunidade de ser selecionado para doação de medula óssea, o doador passará por internação hospitalar (hospital/dia) sendo necessário submeter-se a procedimento sob anestesia geral para retirada de não mais que 10% de sua medula óssea. O procedimento consiste em punção glútea (4 a 8 punções). A medula óssea do doador é espontaneamente restaurada em poucas semanas.

Na oportunidade de ser selecionado para doação de precursores hematopoéticos, após utilizar por via subcutânea uma medicação estimulante de células hematopoiéticas, o doador será submetido a procedimento semelhante a doação de

sangue sendo este realizado em caráter ambulatorial, não sendo para isso necessários os procedimentos mencionados no segundo item deste termo.

Os riscos para doadores de medula óssea e/ou tecidos hematopoéticos é praticamente inexistente. Nos casos de doação de medula óssea, devido ao procedimento de punção, é comum haver queixa de discreta dor no local da punção.

Tenho, também ciência do propósito a que se destina o referido Registro e meu cadastramento nele.

Proponho-me, assim, a ser um eventual doador de medula óssea ou de células precursoras, sabendo que me é reservado o direito de decisão final para doação, mantendo-se a condição de sigilo acima especificada.

Porto Alegre, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Nome Legível

---

Assinatura

**Testemunhas:**

Nome legível: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome legível: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_



## TERMO DE COMPROMISSO PARA USO DE DADOS INSTITUCIONAIS



## Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

## Termo de Compromisso para Utilização de Dados

## Título do Projeto

<p>Estudo do polimorfismo do gene <i>DEFB1</i> em pacientes com doença inflamatória intestinal e controles no sul do Brasil.</p>	<p><b>Cadastro no GPPG</b></p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------

Os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar a privacidade dos pacientes cujos dados serão coletados em prontuários e bases de dados do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Concordam, igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente para execução do presente projeto. As informações somente poderão ser divulgadas de forma anônima.

Porto Alegre, 15 de outubro de 2015

Nome dos Pesquisadores	Assinatura
Timothy John Wilson	
Rafael Roesler	
Luiz Fernando Jobim	
Gilberto Schwartzmann	
Mariana Jobim	