

# Fisiopatologia da doença inflamatória do intestino: Dos genes ao microbioma

## *Inflammatory bowel disease physiopathology: From genes to gut microbiome*

### RESUMO

A Doença Inflamatória Intestinal constitui uma doença crónica cuja a sua etiopatogenia parece resultar da interação entre susceptibilidade genética, fatores ambientais e da microflora intestinal, originando numa resposta imune anormal e compromisso da função da barreira epitelial. Revisitaremos de seguida os fatores etiológicos que nos parecem ser mais preponderantes à luz do conhecimento habitual.

### ABSTRACT

*The Inflammatory Bowel Disease constitutes a chronic disease whose etiopathogenesis results from the interaction between genetics, environmental factors and gut microbioma, originating an abnormal immune response and commitment of the epithelial mucosal barrier. We will revisit the most preponderant factors known until the actual moment.*

A Doença Inflamatória Intestinal (DII) constitui uma doença crónica que afeta aproximadamente 3,6 milhões de pessoas em todo o mundo. Outrora, era uma patologia pouco frequente, aumentando a sua incidência no século XX nos países desenvolvidos, em particular na Europa, Austrália, Nova Zelândia e América do Norte, onde neste último é estimado que a sua prevalência praticamente duplique durante a próxima década. Esta distribuição tem sofrido alterações, em particular nos últimos 20 anos, tendo-se expandido também para países em desenvolvimento.<sup>1,2</sup>

Os seus agentes etiológicos maiores parecem ter sido identificados, resultando da interação entre susceptibilidade genética, fatores ambientais e da microflora intestinal, originando numa resposta imune anormal

(desregulação da resposta imune inata e adaptativa) e compromisso da função da barreira epitelial.

Apesar de partilharem algumas características, a Doença de Crohn (DC) e Colite Ulcerosa (CU) são 2 entidades heterogéneas e possuem, para além das diferentes características clínicas, endoscópicas e histológicas, diferentes predisposições genéticas, fatores de risco e alterações do microbioma.

### FATORES AMBIENTAIS

Diversas alterações do comportamento humano têm sido empiricamente associadas ao aumento da incidência de DII. Este aumento nos países que têm vindo a adotar estilo de vida industrializado sugere que os fatores ambientais são cruciais como desencadeantes da doença.<sup>3,4</sup>



Gabriela Duque  
Hospital Distrital da Figueira da Foz

Francisco Portela  
Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

### Tabaco

O tabaco constitui um fator de risco importante na DII, diferindo o seu efeito na DC versus CU. Assim verifica-se que o consumo de tabaco está associado a um aumento de 2 vezes de risco de DC (OR 1.76; 95% Intervalo de Confiança (IC) 1.40-2.22) enquanto que na CU é a condição de ex-fumador (OR 1.79; 95% IC 1.37-2.34). O tabagismo



ativo tem um efeito protetor no desenvolvimento da CU em comparação com os controlos (OR 0.58; 95% IC, 0.45-0.75).<sup>5</sup> Desta forma, os doentes com CU e que fumam parecem ter um curso mais ligeiro da doença, menor necessidade de corticoterapia e menor necessidade de colectomia, estando a suspensão de hábitos tabágicos associada a incremento da sua atividade, nomeadamente o recrudescimento dos sintomas durante o primeiro ano após cessação. Pelo contrário, na DC, os fumadores necessitam mais frequentemente de terapêutica imunossupressora e de cirurgia, com aumento da recorrência após resseção ileocecal.<sup>6</sup>

### **Apendicetomia**

À semelhança do tabagismo, também os antecedentes de apendicetomia evidenciam efeitos antagónicos na DC e CU.

A apendicetomia realizada em doentes em contexto de apendicite (aguda não perfurada e perfurada) e linfadenite mesentérica está associada a um risco menor de CU (nos doentes com apendicite perfurada, hazard ratio (HR) 0.58 [95 % IC 0.38-0.87]; apendicite aguda não perfurada 0.76, IC 0.65-0.90); adenite mesentérica 0.57 [95 % IC, 0.36-0.89]). Contrariamente, os doentes submetidos a apendicetomia em contexto de dor abdominal inespecífica possuem o mesmo risco de CU que os controlos (HR, 1.06; 95 % IC, 0.74 -1.52). O efeito protetor da apendicetomia na CU está apenas patente em pacientes submetidos a cirurgia antes dos 20 anos.<sup>7</sup>

Pelo contrário, o mesmo coorte identificou risco aumentado de DC nos doentes submetidos a apendicetomia prévia, em contexto de apendicite perfurada, apendicite após dor abdominal inespecífica e linfadenite mesentérica (respetivamente taxa de incidência 1.85 (95% CI, 1.10-3.18); 2.15 (95% CI, 1.25-3.80), 2.52 (95% CI, 1.43-4.63). Apendicetomia em contexto de apendicite não perfurada apresentava risco aumentado mas apenas no sexo feminino.<sup>7</sup> Este aumento do risco persiste durante mais de 20 anos após apendicetomia, com exceção se o evento cirúrgico tiver ocorrido na primeira década de vida, acarretando menor risco desta patologia. Doentes com DC e antecedentes de apendicetomia em contexto de apendicite perfurada parecem ter pior prognóstico.<sup>8</sup>

### **Fármacos**

A ingestão de anticoncepcionais orais (ACO) parece estar associada ao desenvolvimento de DII, particularmente DC. O risco relativo (RR) para DC em mulheres sob ACO era 1.51 (95% IC 1.17-1.96, P= 0.002), e 1.46 (95% IC 1.26-1.70, P < 0.001), após ajuste de tabagismo. Na CU o RR era de 1.53 (95% IC 1.21-1.94, P= 0.001), e 1.28 (95% IC 1.06-1.54, P= 0.011), após ajuste consumo tabágico. O risco aumenta com o aumento do tempo de exposição aos ACO. Após a sua suspensão, o risco reverte para os mesmos da população não exposta.<sup>9</sup>

O consumo frequente de anti-inflamatórios não esteroides (AINES), pelo menos 15 dias/mês, parece estar associado a um aumento do risco de DII (CD incidência 6 casos/100.000 pessoas/ano [95% IC, 0-13]; HR 1.59 [IC, 0.99-2.56]); CU (incidência 7 casos/100.000 pessoas/ano [IC, 1-12]; HR 1.87 [IC, 1.16-2.99]). O risco é maior quanto maior for a dosagem, frequência e duração da terapêutica com AINES. A sua utilização esporádica e o consumo de ácido acetilsalicílico não evidenciam essa associação.<sup>10</sup>

O consumo de estatinas tem um efeito protetor no desenvolvimento de DII. A exposição a qualquer estatina está associada a uma diminuição significativa do risco de DII (OR 0.68, 95% IC 0.64-0.72), CD (0.64, 95% IC 0.59-0.71), UC (OR 0.70, 95% IC 0.65-0.76). Esta diminuição parece ser transversal em toda a esta classe de fármacos, independentemente da intensidade da terapêutica e é mais marcado nas pessoas de idade mais avançada e em particular na DC.<sup>11</sup>

### **Infeções/higiene**

Existem dados epidemiológicos que parecem evidenciar uma correlação estreita entre a diminuição das doenças infecciosas, vacinação e melhoria das condições sanitárias da população com o aumento da incidência de doenças auto-imunes e doenças inflamatórias crónicas.<sup>12</sup> Estas evidências parecem consubstanciar a importância do microbioma na modulação do sistema imunitário após o nascimento.

Assim, a tese da higiene tem sido postulada também como agente etiológico na DII. O número de irmãos, famílias alargadas, a ingestão de leite não pasteurizado e exposição a animais precocemente na infância tem

sido associado inversamente ao risco de DII.<sup>2,1</sup>

A infecção por *Helicobacter pylori* (Hp) está inversamente associada à incidência da DII, corroborando o seu efeito protetor no desenvolvimento de doenças autoimunes. A infecção por Hp é menor em doentes com DII, em comparação com os controlos (27,1% versus 40,9%). Esse efeito de proteção parece ser superior na DC (RR: 0.60, 95% CI: 0.49–0.72) quando comparada com CU (RR: 0.75, 95% CI: 0.62–0.90).<sup>13</sup> No entanto, apesar de terem sido descritos alguns casos clínicos de primeiros episódios de DII após erradicação de Hp, esta associação não é consistente.<sup>14</sup>

O risco de DII está marcadamente aumentado em crianças expostas repetidamente a antibióticos precocemente no seu desenvolvimento<sup>15</sup> e em adultos após episódios de gastroenterite aguda.<sup>16</sup> Episódios prévios de gastroenterite aguda aumentam o risco de DII (OR 1.40; 95% IC 1.19-1.66). O risco é superior na DC e durante o primeiro ano após o evento infeccioso.<sup>17</sup>

A exposição prévia a antibióticos está associada a maior risco de DC (OR 1.74, 95% CI 1.35-2.23) mas sem significância na CU (OR 1.08, 95% CI 0.91-1.27). Este risco é maior quando a antibioterapia ocorre durante o primeiro ano de vida.<sup>18</sup> Todos os antibióticos parecem estar envolvidos, com especial enfoque para o metronidazol e as fluoroquinolonas que foram os antibióticos mais fortemente associados ao surgimento de novos casos de DII (respetivamente OR 5.01, 95% IC 1.65-15.25 e OR 1.79, 95% IC 1.03-3.12).<sup>19</sup> As terapêuticas múltiplas estão associadas a risco maior que um ciclo terapêutico único.<sup>20</sup>

## Dieta

Dieta rica em fibras está associada a menor risco de DC (mas não de CU).<sup>21</sup> Dietas ricas em gorduras saturadas estão associadas a aumento do risco de DII em pequenos estudos caso-controlo mas estudos prospectivos não corroboraram esta associação.<sup>2</sup> Também a ingestão de hidratos de carbono, açúcares refinados e proteína animal tem evidenciado resultados inconsistentes. Elevados consumos de ácidos gordos poliinsaturados omega-6 e baixos de ácidos gordos poliinsaturados omega-3 estão associados a aumento do risco de DII.<sup>22</sup>

Dados recentes apontam para um papel da vitamina D na patogénese e evolução da DII. É frequente a existência de valores deficitários de vitamina D nos doentes recém diagnosticados. Estudos apontam que a normalização dos níveis de vitamina D está associada a uma significativa redução do risco de DC, tendência esta evidente também na CU, embora sem significância. Assim, a vitamina D pode ser um mediador importante na patogénese da DC e possivelmente na CU.<sup>23</sup> Níveis baixos de vitamina D (< 20 ng/mL) estão associados a maior risco de cirurgia na DC e hospitalizações. A sua normalização (> 30 ng/mL) atenua esse risco.<sup>24</sup>

A ingestão de zinco está inversamente relacionada com o risco de DC mas não de CU.<sup>25</sup>

## Outros

Embora o parto influencie o microbioma na infância, as taxas de DII parecem estar apenas moderadamente aumentadas após parto por cesariana,<sup>26</sup> independente da existência ou não de doença nos progenitores. Vários estudos evidenciaram associação inversa entre a incidência de DII e amamentação.<sup>27,28,29</sup> Estes não são consistentes em todos os coortes de doentes.

Aproximadamente 70% dos doentes com DII têm a percepção de *flare* em contexto de vida stressante, no entanto a sua associação em estudos tem sido inconsistente.<sup>18</sup> Já humor deprimido parece estar associado a risco de DC, mas não com CU, o que pressupõe que fatores psicológicos poderão contribuir para o desenvolvimento de DC.<sup>30</sup>

## GENÉTICA E HISTÓRIA FAMILIAR

A incidência da DII é sobreponível em ambos os géneros, mas é influenciada pela raça e etnia, sendo o risco 3-4 vezes superior na população judaica, em particular nos asquenazes.<sup>2</sup>

O papel da genética na patogénese da DII foi inicialmente sugerido em estudos de agregados familiares e em gémeos. A existência de história familiar constitui o fator de risco independente mais importante. Cerca de 5,5-22,5 % dos doentes com DII possuem outro familiar com a doença. Filhos de pais com essa patologia possuem maior risco de a desenvolverem. Esse risco é superior na DC e se ambos os pais forem afetados.



Desta forma, o risco para uma criança possuindo um pai com DII é 2-13 vezes maior que a população em geral. Para crianças com ambos os pais com DII, o risco desta se manifestar é superior a 30%. O RR de um irmão com DC é 13-36 vezes superior à população em geral, enquanto que um irmão de um doente com CU, o RR é 7-17 vezes superior. O risco é 2-3% em doentes com parentes de DC e 0,5-1% se CU. O risco é significativamente superior se na DC o parente afetado foi a mãe e se a descendente for do sexo feminino.<sup>31</sup>

Estudos envolvendo gémeos evidenciam essa herdabilidade: risco de DC em gémeos monozigóticos é de 20-50% enquanto que em dizigóticos é de 10%; na CU é de 16% e 4% respetivamente, atribuindo um menor componente hereditário a esta doença. Estes estudos evidenciam no entanto que pode existir discordância nesta população no tipo de DII e sua evolução influenciada em parte pelo ambiente.<sup>2</sup>

Diferentes fatores genéticos predispõem à DII, através de diferentes mecanismos inflamatórios. Pelo menos 201 loci foram identificados, a maioria associados a ambas as formas, indicando mecanismos comuns em ambas mas 37 específicos da DC e 27 específicos de CU.<sup>32,18</sup> Apesar da divergência no efeito no sistema imunitário, os putativos genes podem ser divididos naqueles que influenciam a imunidade inata, a autofagia, a barreira epitelial, respostas imunes adaptativas resposta ao stress oxidativo e a atividade antimicrobiana.

Se por um lado a DII na infância representa 10-25% de todos os casos, a DII pediátrica de surgimento muito precoce (<10 anos de idade), constitui uma proporção substancial de doença monogénica.<sup>33</sup>

De seguida elencam-se alguns dos genes identificados na etiologia da DII:

- NOD 2: foi o primeiro gene identificado cuja mutação aumenta de forma segura a susceptibilidade para a DC.<sup>34</sup> Codifica o receptor muranoil dipeptideo bacteriano (MDP) presente nas bactérias gram positivas e negativas, possuindo um papel importante na resposta imune inata e regulação do microbioma comensal, cujo defeito induz menor *clearence* bacteriana e consequente aumento inflamatório. Também está associado a dimi-

nuição da transcrição de IL-10, uma potente citocina pró-inflamatória. Os homocigotos estão associados a risco aumentado em 20-40 vezes de DC, enquanto que os heterocigotos estão associados um aumento de risco mais modesto, cerca de 2-4 vezes. Está associada a DC com comportamento fibro-estenotante mas está associada a grande variabilidade geográfica, encontrando-se maioritariamente em Europeus e de ascendência judaica e quase inexistente em asiáticos.<sup>35,36</sup>

- IL23 R: gene codificador de uma subunidade do receptor de citocina pró-inflamatória IL-23, associado a ambas DC e CU. Uma variante incomum (rs11209026, c.1142G>A, p.Arg381Gln) confere proteção 2-3 vezes no desenvolvimento de DII, parecendo este efeito ser superior na DC que na CU.<sup>37</sup>
- ATG16L1 e IRGM, dois genes envolvidos na autofagia, associados à DC.<sup>38,39</sup>
- ABCB1/MDR1 codifica proteína altamente expressada pelas células epiteliais, com efeito protetor na barreira intestinal, associada a CU.<sup>40</sup>

## MICROBIOMA

O microbioma intestinal constitui o maior reservatório de microorganismos do corpo humano, possuindo funções de extrema utilidade, nomeadamente digestivas, educação do sistema imunitário e repressão do crescimento de microorganismos nocivos.

Alterações microbiológicas no microbioma intestinal estão presentes em ambas as formas de DII. A disbiose na DII traduz-se então numa alteração da sua composição, diversidade e quantidade.<sup>41</sup>

O microbioma fecal em ambas as comunidades de doentes com DC e CU difere dos indivíduos saudáveis. No entanto o microbioma dos doentes com CU inativa tende a ser semelhante ao dos indivíduos saudáveis.<sup>42</sup> Existe menor diversidade e menor quantidade bacteriana nas áreas de mucosa inflamada em comparação com as áreas de mucosa não inflamada no mesmo doente.<sup>43</sup>

Estudos recentes revelam que a recuperação do microbioma eubiótico é fundamental para a manutenção de remissão pós ressecção ileocecal na DC. A homogeneidade na composição bacteriana a nível da anastomose parece ser também de elevada importância.<sup>44</sup>



Muitos estudos identificam aumento da representação de Gamaproteobacteria e Bacteroidetes<sup>45</sup> redução da representação de Firmucutes phylum (reduzidas em 5-10 vezes),<sup>41</sup> em particular a família de *Clostridium*<sup>42</sup>, grupos XIVa e IV. *Faecalibacterium prausnitzii* apresenta-se subrepresentada nestes doentes, estando em depleção nas biopsias de DC ileal e está associada a maior risco de recorrência após cirurgia. Por outro lado, o seu incremento após um *flare* está associado a manutenção de remissão clínica na CU.<sup>45</sup>

As enterobactérias estão aumentadas em ambas as formas de DII. *Escherichia coli*, em particular a forma aderente-invasiva tem sido isolada em biopsias de DC ileal e em doentes com CU. A espécie fusobactéria tem sido identificada em maior abundância na mucosa cólica dos indivíduos com CU.<sup>45</sup>

O efeito do microbioma intestinal na DII não é restrito à disbiose bacteriana, podendo haver um papel importante de vírus e fungos.<sup>45,2</sup>

É problemático discernir se a modificação do microbioma fecal está já presente antes do início da doença ou se decorre do processo inflamatório. Estudos que evidenciam alterações do microbioma fecal (em particular a menor diversidade de *Clostridium*) na DC na fase inativa, aprecem corroborar que esta representa uma modificação primária.<sup>42</sup>

## CONCLUSÕES

A DII é uma patologia complexa, decorrendo da interação entre a genética, ambiente e microbioma intestinal. Nenhum dos fatores é, só por si, suficiente para o desenvolvimento da doença. O correto e completo conhecimento da patogénese na DC e CU poderão otimizar as respostas terapêuticas e mudar a sua história natural. ●●●

### Correspondência

**Nome:** Gabriela Duque

**e-mail:** gabrieladuquepena@gmail.com

**Nome:** Francisco Portela

**e-mail:** faspportela@gmail.com

## REFERÊNCIAS

1. Kaplan G, Jess T. The Changing Landscape of Inflammatory bowel disease: East meets West. *Gastroenterology* 2016;150(1):24-6.
2. Ananthakrishnan AN. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2015;12(4):205-17.
3. Torres J, Mehandru S, Colombel JF, Peyrin-Biroulet L. *Lancet*. Crohn's disease. 2017 29;389(10080):1741-1755.
4. Ordás I, Eckmann L, Talamini M, Baumgart DC, Sandborn WJ. Ulcerative colitis. *Lancet*. 2012;380(9853):1606-19.
5. Mahid SS1, Minor KS, Soto RE, Hornung CA, Galandiuk S. Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clin Proc*. 2006;81(11):1462-71.
6. Cosnes J. Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2004;18(3):481-96.
7. Roland E, Andersson, Gunnar Olaison, Curt Tysk, Anders Ekborn. Appendectomy and Protection against Ulcerative Colitis. *N Engl J Med* 2001
8. Andersson RE1, Olaison G, Tysk C, Ekborn A. Appendectomy is followed by increased risk of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2003 124(1):40-6.
9. Cornish JA1, 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*. 2008;103(9):2394-400.
10. Ananthakrishnan AN1, Higuchi LM, Huang ES, Khalili H, Richter JM, Fuchs CS, Chan AT. Aspirin, nonsteroidal anti-inflammatory drug use, and risk for Crohn disease and ulcerative colitis: a cohort study. *Ann Intern Med*. 2012; 156(5):350-9.
11. Ungaro R, Chang HL, Côté-Daigneault J, Mehandru S, Atreja A, Colombel JF. Statins Associated With Decreased Risk of New Onset Inflammatory Bowel Disease. *Am J Gastroenterol*. 2016;111(10):1416-1423.
12. Rook G. Hygienic hypothesis and autoimmune diseases. *Clin. Rev. Allergy Immunol*. 2012; 42, 5-15.
13. Luther J, Dave M, Higgins P, Kao J. Association Between *Helicobacter pylori* Infection and Inflammatory Bowel Disease: A Meta-analysis and Systematic Review of the Literature. *Inflamm Bowel Dis*. 2010; 16(6):1077-84.
14. Rosania R, Von Arnim U, Link A, Rajlic-Stojanovic M, Franck C, Canbay A, et al. *Helicobacter Pylori* Eradication therapy is Not Associated with the Onset of Inflammatory Bowel Diseases. A Case-Control Study. *J Gastrointest Liver Dis* 2018; 27(2):119-125.
15. Hviid A, Svanstrom H and Frish M. Antibiotic use and inflammatory bowel diseases in Childhood. *Gut* 2011; 60, 49-54.
16. Garcia-Rodriguez LA, Ruigomez A, Panes J. Acute gastroenteritis is followed by an increased risk of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2006;130, 1588-1554.
17. Garcia Rodriguez LA1, Ruigomez A, Panes J. Acute gastroenteritis is followed by an increased risk of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2006; 130(6):1588-94.
18. van der Sloot KWJ, Amini M, Peters V, Dijkstra G, Alizadeh BZ. Inflammatory Bowel Diseases: Review of Known Environmental Protective and Risk Factors Involved. *Inflamm Bowel Dis*. 2017; 23(9):1499-1509
19. Ungaro R, Bernstein CN, Geary R, Hviid A, Kolho KL, Kronman MP, et al. Antibiotics associated with increased risk of new-onset Crohn's disease but not ulcerative colitis: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2014;109(11):1728-38.
20. Kronman MP, Zaoutis TE, Haynes K, Feng R, Coffin SE. Antibiotic exposure and IBD development among children: a population-based cohort study. *Pediatrics*. 2012;130(4):e794-803.
21. Ananthakrishnan AN, Khalili H, Konijeti G, Higuchi L, Silva P, et al. A Prospective Study of Long-term Intake of Dietary Fiber and Risk of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Gastroenterology*. 2013 Nov;145(5):970-7.
22. Costea I, Mack DR, Lemaitre RN, Israel D, Marciel V, Ahmad A, Amre DK. Interactions between the dietary polyunsaturated fatty acid ratio and genetic factors determine susceptibility to pediatric Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2014 Apr;146(4):929-31.
23. Ashwin N, Ananthakrishnan, Hamed Khalili, et al. Higher Predicted Vitamin D Status Is Associated With Reduced Risk of Crohn's Disease. *Gastroenterology*. 2012 March ; 142(3): 482-489.
24. Ananthakrishnan AN, Cagan A, et al. *Inflamm Bowel Dis*. 2013; 19(9): 1921-1927. Normalization of Plasma 25-hydroxy Vitamin D is Associated with Reduced Risk of Surgery in Crohn's Disease

25. Ananthakrishnan AN, Khalili H, et al. Zinc intake and risk of Crohn's disease and ulcerative colitis: a prospective cohort study *International Journal of Epidemiology*, 2015;44(6):1995-2005.
26. Bager P, Simonsen J, Nielsen NM, Frisch M. Cesarean section and offspring's risk of inflammatory bowel disease: a national cohort study. *Inflamm Bowel Dis*. 2012 May; 18(5):857-62.
27. Klement E1, Cohen RV, Boxman J, Joseph A, Reif S. Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review with meta-analysis. *Am J Clin Nutr*. 2004 Nov; 80(5):1342-52.
28. Barclay AR1, Russell RK, Wilson ML, Gilmour WH, Satsangi J, Wilson DC. Systematic review: the role of breastfeeding in the development of pediatric inflammatory bowel disease. *J Pediatr*. 2009; 155(3):421-6.
29. Xu L, Lochhead P, Ko Y, Claggett B2, Leong RW, Ananthakrishnan AN. Systematic review with meta-analysis: breastfeeding and the risk of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2017; Nov;46(9):780-789.
30. Ananthakrishnan AN1, Khalili H, Pan A, Higuchi LM, de Silva P, Richter JM, Fuchs CS, Chan AT. Association between depressive symptoms and incidence of Crohn's disease and ulcerative colitis: results from the Nurses' Health Study. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013;11(1):57-62.
31. Woude C et al. The Second European Evidenced-Based Consensus on Reproduction and Pregnancy in Inflammatory Bowel Disease *Journal of Crohn's and Colitis*, 2015
32. de Souza HS, Fiocchi C. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2016;13:13-27.
33. McGovern DP, Kugathasan S, Cho JH. Genetics of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*. 2015;149(5):1163-1176.
34. Hugot JP, Chamaillard M, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411(6837):599-603.
35. Inoue N et al. Lack of common NOD 2 variants in japaneses patients with crohn,s cisease *Gastroenterology* 2002; 123(1):86-91.
36. Leong R. NOD2/card 15 gene polymorfism and Crohn,s disease in the Chinese population. *Alimn Pharmacol Ther* 2003; 17(12):1465-70.
37. Duerr R, et al. A Genome-Wide Association Study Identifies *IL23R* as an Inflammatory Bowel Disease Gene. *Science*. 2006; 314(5804):1461-3.
38. Hampe J et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in *ATG16L1*. *Nat Genet*. 2007.
39. Parkes M, et al. Sequence variants in the autophagy gene *IRGM* and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet*. 2007; 39(7):830-2.
40. Schwab M, et al. Association between the C3435T *MDR1* gene polymorphism and susceptibility for ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2003; 124(1): 26-33.
41. Bernstein CN, Forbes JD. Gut Microbiome in Inflammatory Bowel Disease and Other Chronic Immune-Mediated Inflammatory Diseases. *Inflamm Intest Dis*. 2017;2(2):116-123.
42. Andoh A, Imaeda H, Aomatsu T, Comparison of the fecal microbiota profiles between ulcerative colitis and Crohn disease using terminal restriction fragmente length polymorphism analysis. *J Gastroenterol* 2011; 46(4):479-86.
43. Sepehri et al. Microbial diversity of inflamed and noninflamed gut biopsy tissues un inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13(6):675-83.
44. S Mondot, et al. Structural robustness of the gut mucosal microbiota is associated with Crohn's disease remission after surgery *Gut* 2016;65:954-962
45. Kostic A, Ramnik X, Gevers D. The microbiome in inflammatory bowel diseases: current status and the future ahead. *Gastroenterology* 2014; 1 46(6):1489-99.