

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Larissa Gabriela Ferreira De Carvalho

**Leptina sérica, calprotectina fecal e composição corporal em
pacientes com doença de crohn**

**Belo Horizonte
2022**

Larissa Gabriela Ferreira De Carvalho

**Leptina sérica, calprotectina fecal e composição corporal em
pacientes com doença de crohn**

Versão Final

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito Parcial à obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a Dra. Simone Odília Antunes Fernandes

Coorientador: Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso

Belo Horizonte

2022

C3311 Carvalho, Larissa Gabriela Ferreira de.
Leptina sérica, calprotectina fecal e composição corporal em pacientes com doença de Crohn [recurso eletrônico] / Larissa Gabriela Ferreira de Carvalho. – 2022.
1 recurso eletrônico (87 f. : il.) : pdf

Orientadora: Simone Odília Antunes Fernandes.
Coorientador: Valbert Nascimento Cardoso.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Doença de Crohn – Teses. 2. Doenças Inflamatórias Intestinais – Teses. 3. Biomarcadores – Teses. 4. Leptina – Teses. 5. Diagnóstico – Teses. 6. Inflamação – Teses. I. Fernandes, Simone Odília Antunes. II. Cardoso, Valbert Nascimento. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 616.34

Elaborado por Luciene Aparecida Costa – CRB-6/2811



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

*LEPTINA SÉRICA, CALPROTECTINA FECAL E COMPOSIÇÃO CORPORAL EM
PACIENTES COM DOENÇA DE CROHN*

LARISSA GABRIELA FERREIRA DE CARVALHO

Dissertação de Mestrado submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestra em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Luiz Gonzaga Vaz Coelho

Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Francisco Guilherme Cancela e Penna

Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Simone Odilia Antunes Fernandes - orientadora

Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso - coorientador

Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG



Documento assinado eletronicamente por **Simone Odilia Antunes Fernandes, Professora do Magistério Superior**, em 28/09/2022, às 20:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Valbert Nascimento Cardoso, Professor do Magistério Superior**, em 28/09/2022, às 20:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Gonzaga Vaz Coelho, Membro de comissão**, em 29/09/2022, às 14:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Francisco Guilherme Cancela e Penna, Professor Magistério Superior - Voluntário**, em 04/10/2022, às 09:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1771063** e o código CRC **FFAC465B**.

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Rosamélia, por sempre me incentivar e não medir esforços para me ajudar de todas as formas a conquistar meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Universidade Federal de Minas Gerais** pelo ambiente propício à evolução e crescimento, bem como a todas as pessoas que a tornam assim tão especial para quem a conhece.

Agradeço a **Professora Simone Odília Antunes Fernandes e Professor Valbert Nascimento Cardoso** pela paciência na orientação, pelo grande incentivo, por todos os ensinamentos passados, por toda a disponibilidade e receptividade para o meu trabalho. Obrigada por todas as conversas e conselhos que me ajudaram muito nessa caminhada.

Agradeço à **Professora Maria de Lourdes de Abreu Ferrari** por todos os ensinamentos e por não medir esforços em me ajudar no recrutamento de pacientes. A todos os médicos e residentes do Instituto Alfa de Gastrenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG por também contribuírem com a seleção de pacientes para o presente estudo.

À aluna de iniciação científica **Mariana Jacob** que foi uma pessoa fundamental para a realização deste trabalho. Agradeço pela sua disposição, seu entusiasmo pela pesquisa e por toda contribuição durante todas as etapas do trabalho. Assim, também agradeço à **Nayara, Camila e Katia Vital**. Agradeço à **Farmacêutica Katia Ravacini**, que é também uma amiga que a farmácia me deu, pela ajuda nas coletas de amostras dos pacientes e por sempre torcer por mim!

Agradeço à **Dra. Alessandra de Cássia Lovato**, pela contribuição no trabalho, pelas coletas e tratamentos de dados da composição corporal dos participantes deste estudo.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES**, pelo apoio financeiro.

Agradeço ao **Laboratório Lustosa** pela parceria e tratamento das amostras desse estudo.

Agradeço a minha **mãe Rosamélia, meus irmãos Laís e Danilo**, minha amiga **Lorrane Serafim** por todo incentivo, carinho e por torcerem tanto por mim.

Agradeço aos **voluntários** que aceitaram participar deste trabalho, aos pacientes, aos voluntários saudáveis.

E a **todos** que forma direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

As doenças inflamatórias intestinais (DII), como a doença de Crohn (DC) e a colite ulcerativa (CU), são doenças graves do trato digestivo. O diagnóstico e acompanhamento das DIIs permanece sendo um grande desafio na prática clínica. O objetivo deste estudo foi investigar os níveis séricos da adipocina leptina e calprotectina fecal nos pacientes portadores da doença de Crohn (DC). Os valores de leptina sérica e calprotectina fecal, considerado o “padrão-ouro”, foram analisados para identificar uma correlação entre essas proteínas com a atividade da doença (inflamação). Para título de comparação, um grupo controle contendo participantes (n = 8) sem a doença de Crohn, também foi avaliado seguindo os mesmos critérios de coleta e avaliação das amostras. Foram selecionados 15 pacientes com a doença de Crohn. Os níveis séricos de leptina e calprotectina não se mostraram influenciáveis pelo fator gênero em pacientes tão pouco para controles. A leptina não foi capaz de diferenciar a atividade da doença (8,1 (1,30 - 13,40) ng/mL – doença ativa ng/mL; 8 (3,125 - 15,35) ng/mL – doença ativa; $p = 0,614$), ao contrário da calprotectina que se mostrou mais alta nos pacientes com a doença ativa, 514 (224 - 1231) mcg/g (remissão 145,50 (59,50 - 387,50) mcg/g), $p = 0,039$. A leptina se mostrou positivamente influenciada pelos valores antropométricos (gordura corporal e circunferência abdominal). Este trabalho mostrou que a leptina tem baixa especificidade e seletividade para diferenciar as formas da doença de Crohn. Com relação ao estágio da doença, apenas a calprotectina mostrou ser eficiente na diferenciação de doença ativa de doença em remissão.

Palavras-chave: doença de Crohn; biomarcadores; leptina; calprotectina; Diagnóstico; doenças inflamatórias intestinais; inflamação.

ABSTRACT

Inflammatory bowel diseases (IBDs), such as Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), are serious diseases of the digestive tract. The diagnosis and follow-up of IBDs remains a major challenge in clinical practice. The aim of this study was to investigate the serum levels of the adipokine leptin and fecal calprotectin in patients with Crohn's disease (CD). Serum leptin and fecal calprotectin values, considered the "gold standard", were analyzed to identify a correlation between these proteins and disease activity (inflammation). For comparison purposes, a control group containing participants (n = 8) without Crohn's disease was also evaluated following the same criteria for collecting and evaluating the samples. Fifteen patients with Crohn's disease were selected. Serum levels of leptin and calprotectin were not influenced by the gender factor in patients, nor were they influenced by controls. Leptin was not able to differentiate the disease activity (8.1 (1.30 - 13.40) ng/mL – active disease; 8 (3.125 - 15.35) ng/mL – active disease; $p = 0.614$), unlike calprotectin, which was higher in patients with active disease, 514 (224 - 1231) mcg/g (remission 145.50 (59.50 - 387.50) mcg/g), $p = 0.039$. Leptin was positively influenced by anthropometric values (body fat and waist circumference). This work showed that leptin has low specificity and selectivity for differentiating forms of Crohn's disease. Regarding the stage of the disease, only calprotectin proved to be efficient in differentiating active disease from disease in remission.

Keywords: Crohn's disease; biomarkers; leptin; calprotectin; diagnosis; inflammatory bowel disease; inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de formação de fibrose e estenose na parede intestinal.	16
Figura 2. Classificação das fístulas perianais em DC pela American Gastroenterological Association (AGA).	16
Figura 3. Patogenia das doenças inflamatórias intestinais, susceptibilidade de genes.	19
Figura 4: Colonoscopia de um paciente com doença de Crohn íleo anal grave em atividade. As setas indicam ulcerações profundas típicas da doença.	20
Figura 5: Colonoscopia de um paciente com pancolite ulcerativa grave.	21
Figura 6: Cortes histopatológicos representativos de DIIs.	23
Figura 7: Representação dos <i>Creeping fat</i> na doença de Crohn por tomografia computadorizada (TC).	24
Figura 8: Ressecção com acometimento por Doença de Crohn.	28
Figura 9. Esquema representação da calprotectina lançamento na DI.	30
Figura 10: Representação esquemática da sinalização JAK/STAT, a qual é acoplada aos receptores de leptina.	34
Figura 11. Níveis séricos de leptina (ng/mL) e níveis fecais de calprotectina (mcg/mL) de pacientes portadores da doença de Crohn e controles saudáveis.	50
Figura 12. Níveis séricos de leptina de acordo com a farmacoterapia de pacientes com DC.	49
Figura 13. Níveis séricos de calprotectina de acordo com a farmacoterapia de pacientes com DC.	53
Figura 14. Perfil de leptina a calprotectina de acordo com a idade e composição corporal de pacientes com a doença de Crohn. (r) representa o coeficiente de <i>Spearman</i> .	57
Figura 15. Perfil de leptina a calprotectina de acordo com a idade e composição corporal do grupo controle. (r) representa o coeficiente de <i>Spearman</i> .	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Medicamentos biológicos utilizados em DII.	26
Tabela 2. Dados dos pacientes e níveis de leptina e calprotectina.	46
Tabela 3. Dados do grupo controle e níveis de leptina e calprotectina.	47
Tabela 4. Correlação entre os níveis séricos de leptina e os níveis fecais de calprotectina com a composição corporal.	55
Tabela S1. Dados dos pacientes DC e seus respectivos níveis de leptina e calprotectina.	91
Tabela S2. Dados de composição corporal dos pacientes DC e seus respectivos níveis de leptina e calprotectina.	92
Tabela S3. Dados dos participantes do grupo controle e seus respectivos níveis de leptina e calprotectina.	93
Tabela S4. Dados de composição corporal dos participantes do grupo controle e seus respectivos níveis de leptina e calprotectina.	93
Tabela S5. Níveis séricos de Leptina em estudos publicados.	94

LISTA DE ABREVIATURAS

ASAs - 5-aminossalicilatos

ABCD - Associação Brasileira de Colite Ulcerativa e Doença de Crohn

ADA - adalimumabe

AINEs - antiinflamatórios não esteróides

ANOVA - análise de variância unidirecional

ASCA - anticorpos anti-*saccharomyces cerevisiae*

AZA - azatioprina

CCK-B - receptor de colecistocinina B CCK-B

CPZ - certolizumab pegol

CF - Calprotectina fecal

CI - colite indeterminada

CU - Colite ulcerativa

DC - doença de Crohn

DIIs - doenças inflamatórias intestinais

DNA - ácido desoxirribonucleico

DP - desvio-padrão

DPOC - doença pulmonar obstrutiva crônica

ECCO - *European Crohn's and Colitis Organisation*

ELAM-1 - leucócitos endoteliais

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

GLM - golimumabe

IC - intervalo de confiança

ICAM-1 - molécula-1 de aderência intercelular

IFX - infliximabe

JAK - Janus cinase

LPS - lipopolissacarídeo

mgc - microgramas

MDC - doença de Crohn metastática

MEC - matriz extracelular

mRNA - (ácido ribonucleico) mensageiro - RNA mensageiro

MESA - mesalazina

MTX - metotrexato

ng - nanogramas

NEE - nutrição enteral exclusiva

NEP - nutrição enteral parcial

NK - *natural killers*

NO - óxido nítrico

pANCA - anticorpos anti-citoplasma perinuclear de neutrófilos

PCR - proteína C-reativa

ObR - receptor de leptina

RT-PCR - reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase

STATs - proteínas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição

SII - síndrome do intestino irritável

SBG - Sociedade Britânica de Gastroenterologia

TC - tomografia computadorizada

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TGI - trato gastrointestinal

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

VSE - velocidade de sedimentação eritrocitária

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Doença de Chron	17
2.2 Etiologia e Epidemiologia	21
2.3 Diagnóstico	23
2.4 Tratamentos	28
2.5 Biomarcadores no diagnóstico de DII	32
2.5.1 Calprotectina	32
2.5.2 Leptina	35
2.5.2.1 Aspectos bioquímicos da leptina	35
2.5.2.2 Papel da leptina na fisiologia e fisiopatologia intestinal	37
3 OBJETIVO	40
3.1 Objetivo Geral	40
3.2 Objetivos Específicos	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 Casuística	41
4.2 Critérios de Inclusão e Exclusão	42
4.3 Coleta das amostras	43
4.3.1 Amostras sanguíneas	43
4.3.2 Amostras fecais	43
4.3.3 Composição corporal	44
4.3.4 Dados dos prontuários	44
4.3.5 Questionário	44
4.4 Análise das amostras	45
4.4.1 Análise de leptina sérica	45
4.4.2 Análise da calprotectina fecal	46
4.5 Análise Estatística	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1 Níveis séricos de leptina no diagnóstico da doença de Crohn	48
5.2 Níveis fecais de calprotectina no diagnóstico da doença de Crohn	55
5.3 Níveis de leptina e calprotectina em relação em relação aos dados antropométricos	57
5.3.1 Pacientes com Doença de Crohn	58
5.3.2 Grupo controle	61
6 LIMITAÇÕES	65

7	CONCLUSÃO	67
8	PERSPECTIVAS	68

1 INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são desordens crônicas de natureza idiopática caracterizadas por intensa inflamação da mucosa intestinal, a qual envolve alterações estruturais e funcionais do intestino grosso e/ou delgado. Essas condições clínicas incluem primariamente a doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa ou colite ulcerativa (CU), as quais afetam cerca de 1 milhão de pacientes nos EUA e 1.5 milhões na Europa (Kelsen *et al.*, 2019). No Brasil, as doenças inflamatórias acometem 55 pessoas a cada 100 mil habitantes (GDIIIB, 2021). Clinicamente, a DC é caracterizada pelo aparecimento de lesões que podem ser transmurais ao longo de toda a extensão do trato gastrointestinal, sendo, no entanto, mais comum no cólon e no íleo terminal. Por sua vez, a CU se manifesta como úlceras superficiais contínuas que normalmente aparecem no reto e se estendem proximamente, sendo, portanto, restrito ao cólon. Em ambas as formas, a DII é frequentemente associada com grande comprometimento da qualidade de vida dos pacientes, uma vez que elas se manifestam normalmente em indivíduos mais jovens com períodos de atividade e remissão (Victoria *et al.*, 2009.).

Apesar dos avanços recentes sobre a epidemiologia e fisiopatologia das DIIs, existem ainda grandes esforços na tentativa de selecionar potenciais biomarcadores que possam ser empregados para o monitoramento clínico e terapêutico desses pacientes. Atualmente, o diagnóstico de DC e CU é feito utilizando-se uma combinação de exames de sangue e de fezes (sangue oculto e calprotectina), histologia, exames de imagem (endoscopia, colonoscopia, ressonância magnética e tomografia computadorizada), exames que apresentam um alto valor de custo operacional (Mowat *et al.*, 2011; Stange *et al.*, 2006).

As reações inflamatórias que afetam o intestino de pacientes com DIIs são conhecidas por aumentarem a translocação bacteriana para regiões adjacentes ao intestino, como o tecido adiposo. Esses microrganismos, bem como os seus subprodutos, são conhecidos por promoverem a proliferação e ativação de adipócitos e pré-adipócitos, induzindo assim a hiperplasia do tecido adiposo mesentérico. Nos exames de imagens de pacientes com doença de Crohn a hiperplasia dos adipócitos aparece como *creeping fat* (conjunto de adipócitos de

tamanho significativamente menor e densidade celular cerca de quatro vezes maiores que aqueles do tecido adiposo branco mesentérico adjacente, possuindo também grande quantidade de células imunes como linfócitos, macrófagos, neutrófilos e células NK), o qual é associado com segmentos inflamados do intestino e cobre mais de 50% da circunferência intestinal (Kruis *et al.*, 2013; Zulian *et al.*, 2013).

Os adipócitos presentes nos *creeping fat* e nos depósitos da submucosa intestinal secretam inúmeras citocinas e adipocinas capazes de modular funções gastrointestinais e o sistema imune. Entre as adipocinas secretadas pelos adipócitos viscerais, destaca-se a leptina. Nessa direção, estudos têm confirmado o envolvimento dessa adipocina nas DIIs (Karaskova *et al.*, 2021).

Deste modo, acredita-se que em pacientes portadores da doença de Crohn os níveis séricos de leptina possam apresentar elevados se comparados com indivíduos que não sejam portadores desta enfermidade. Sendo assim, pode-se pensar que a quantificação sérica da leptina possa auxiliar no prognóstico e diagnóstico da doença de Crohn.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Doença de Chron

As Doenças Inflamatórias Intestinais (DIIs) apresentam anormalidades na arquitetura da mucosa intestinal a qual se caracteriza por mudanças na topografia de superfície da mucosa entérica, diminuição da densidade das criptas, e anormalidades arquiteturais dos vilos como distorções, ramificações e encurtamento em consequência da presença de intenso processo inflamatório. São divididas em duas principais formas: Colite ulcerativa ou retocolite ulcerativa (CU) e a doença de Crohn (DC) (Jenkins *et al.*, 1997). A doença de Crohn é uma das formas das DIIs, com características clínicas e curso da doença variáveis, apresentando, também, sintomas evoluindo em uma forma recidivante e remitente, que pode comprometer

qualquer segmento do aparelho digestório, desde a boca até o ânus e a região perianal, porém os locais mais afetados são o íleo terminal e o cólon. As regiões inflamadas na DC podem ser descontínua, intercalando partes saudáveis do trato gastrointestinal (TGI) com partes que apresentam inflamações. Existe, ainda, uma classificação do comportamento da doença de acordo com as complicações intestinais apresentadas, sendo elas a forma estenosante, penetrante ou fistulante e a forma não estenosante, não penetrante (Gasche *et al.*, 1998; Thia *et al.*, 2010; Torres *et al.*, 2017). De acordo com a Classificação de Viena, alguns estudos mostram que as taxas cumulativas de complicações em pacientes com DC variam de 48% a 52% em 5 anos e de 69 a 70% em 10 anos após o diagnóstico, com aproximadamente metade dos pacientes desenvolvendo estenose (Cosnes *et al.*, 2002; Louis *et al.*, 2001). A forma estenosante se caracteriza pela ocorrência de estreitamento do lúmen. Esse estreitamento ocorre pelo fato de que na presença de uma úlcera intestinal, as células mesenquimais, como os fibroblastos, miofibroblastos e células musculares lisas, acumulam-se nesse local e secretam componentes da matriz extracelular (MEC), como colágenos e fibronectinas, a fim de reparar o dano existente. Quando a inflamação se torna crônica e grave, como acontece na DC, os mecanismos inflamatórios passam a impulsionar a produção excessiva de componentes da MEC podendo ter como consequência a redução do diâmetro do lúmen intestinal, estenose e, nos casos mais graves, obstrução do intestino. O mecanismo da iniciação e propagação da estenose ainda é pouco compreendido, sabe-se que ele envolve dois eventos paralelos principais: a expansão da camada de músculo liso e um processo de fibrose, figura 1 (Alfredsson & Wick, 2020; Rieder *et al.*, 2013).

O desenvolvimento de fístulas (forma fistulante ou penetrante) acomete aproximadamente um terço dos pacientes. As fístulas podem ser internas (por exemplo, intestino para intestino, intestino para bexiga ou retovaginal) ou enterocutâneas (estendendo-se através da parede abdominal ou no períneo), sendo as fístulas perianais mais comuns. Essas fístulas raramente cicatrizam espontaneamente ou com uso de medicamentos e, frequentemente, requerem

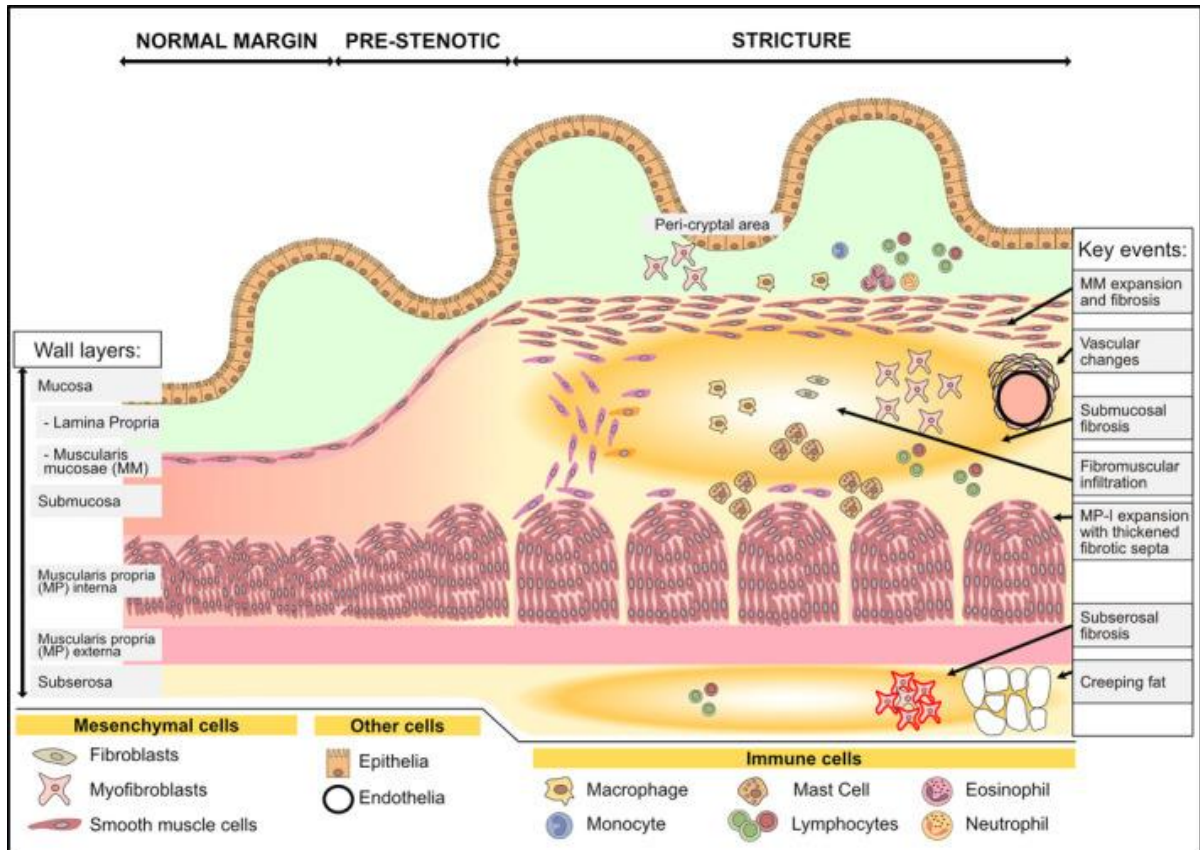


Figura 1. Esquema de formação de fibrose e estenose na parede intestinal. Fonte: Johannes Alfredsson, 2020.

cirurgia (Williams *et al.*, 1981). Em um estudo de base populacional foi observado que o risco cumulativo de um paciente com DC desenvolver fístulas perianais foi de 22% até 10 anos após o diagnóstico (Schwartz *et al.*, 2002). As fístulas perianais costumam ser mais prevalentes na doença localizada no reto e podem ser classificadas como simples ou complexas de acordo com sua extensão, presença de abscessos e ramificações, figura 2 (Kotze *et al.*, 2018).

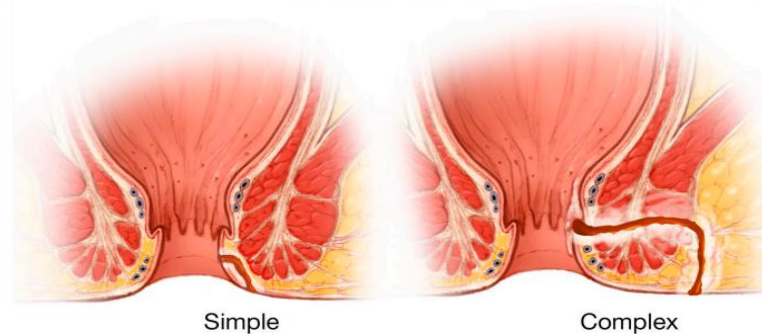


Figura 2. Classificação das fístulas perianais em DC pela American Gastroenterological Association (AGA). Adaptado de Sandborn *et al.*, 2010.

De acordo com a classificação de Montreal, a presença de fístula ou abscesso perianal sofreu uma reclassificação, passando a ser considerada um modificador do comportamento da doença, e não mais como uma inclusão na categoria de doenças penetrantes (Silverberg FRCPC *et al.*, 2005).

O fenótipo da doença de Crohn pode ser dividido em 30% de doença ileal (doença limitada ao intestino delgado, com ou sem o envolvimento do ceco), 40% doença ileocolônica (doença do íleo terminal e em qualquer lugar entre o cólon ascendente e o reto) e 30% doença colônica (qualquer local entre o ceco e o reto, sem envolvimento do trato digestivo superior) (Dulai *et al.*, 2019). A DC ileal está associada mais frequentemente ao desenvolvimento de doença perianal, e a DC colônica isolada está associada mais frequentemente a manifestações extra intestinais (Subramanian *et al.*, 2017; Vavricka *et al.*, 2015). Algumas dessas manifestações extra intestinais são a artrite e artralguas, além de manifestações oculares na DC colônica. Acredita-se que isso ocorra como resultado de um peptídeo compartilhado e único no cólon, olho e articulação humanos (Bhagat & Das, 1994). Uma coorte observou que, em relação ao envolvimento colônico isolado, a DC ileal isolada foi associada a um risco 7 vezes maior (razão de risco [HR], 7,76) de mudança no comportamento da doença e um risco 9 vezes maior (HR, 9,25) para desenvolver uma complicação intestinal (Thia *et al.*, 2010). Mostrou ainda que pacientes com DC com envolvimento ileocolônico apresentam risco de mudança no comportamento da doença (HR, 5,63) e complicação intestinal (HR, 5,74) mais próximo ao de pacientes com envolvimento ileal isolado.

Os sintomas mais presentes em pacientes portadores da DC são sintomas que estão intimamente associados à própria inflamação intestinal, como dor abdominal, diarreia, perda de peso e fadiga (Torres *et al.*, 2017). E, segundo as diretrizes para o manejo da doença inflamatória intestinal em adultos, (Iglesias-Rey *et al.*, 2014), sintomas sistêmicos como mal-estar, anorexia e febre também podem estar presentes nesses pacientes.

2.2 Etiologia e Epidemiologia

As DIIs afetam cerca de 1 milhão de pessoas nos Estados Unidos e cerca de 1.5 milhões na Europa (Ye *et al.*, 2015). Um estudo realizado na cidade de São Paulo mostrou uma estimativa de 14,8 casos de DIIs por 100.000 habitantes (Victoria *et al.*, 2009). No Brasil, as doenças inflamatórias acometem 55 pessoas a cada 100 mil habitantes (GDIIB, 2021). As DIIs se desenvolvem durante a infância ou adolescência em até 25% dos pacientes (Kelsen & Baldassano, 2008). Entretanto, a doença de Crohn pode se desenvolver ao longo da vida e se tornar clinicamente aparente em qualquer época, desde a primeira infância até o final da idade adulta (Freeman & Freeman, 2007; James & Md, 2001). Freeman *et al.*, mostraram em um estudo, através da análise de dados de um banco de dados contendo mais de 800 pacientes que, na maioria dos casos, a idade de detecção ou diagnóstico, geralmente foi durante o final da adolescência e início dos 20 anos. Mostrou, ainda, que durante as últimas duas ou três décadas, mais de 80% dos pacientes com doença de Crohn foram diagnosticados antes dos 40 anos (James & Md, 2001). Contudo, estudos mostram que a incidência de DC na infância tem aumentado significativamente em várias regiões do mundo, apontando um aumento dos números de novos casos em cerca de 8,7% ao ano (Benchimol *et al.*, 2011). Este crescimento da incidência das DIIs pode ser visto como uma consequência do impacto da urbanização, alimentação com fórmula em vez do aleitamento materno, bem como mudanças na tecnologia de alimentos, diminuição do consumo de verduras, frutas e vegetais e aumento no consumo de alimentos ricos em açúcar, gordura animal e emulsificantes (Piovani *et al.*, 2019).

Os mecanismos etiológicos e patogênicos que sustentam a patogênese das DIIs permanecem incertos. Porém, alguns achados e hipóteses ajudam a explicar e conhecer melhor a etiologia dessas doenças. Os fatores genéticos estão intimamente relacionados aos principais fatores que predisõem um indivíduo ao risco de desenvolver qualquer uma das formas das DIIs. Na região centromérica do cromossomo 16, o receptor *NOD2* foi identificado como o primeiro gene a ser associado à suscetibilidade à doença de Crohn. Três mutações principais de *NOD2*, p.Arg702Trp (rs2066844), p.Gly908Arg (rs2066845) e p.Leu1007fsX1008

Fatores individuais e ambientais também podem ser considerados como gatilhos para a manifestação das DIIs. Um estudo recente, por exemplo, sugere que a vitamina D é um indutor da função *NOD2*, sugerindo que a deficiência de vitamina D pode desempenhar um papel no desenvolvimento da doença (Wang *et al.*, 2010).

2.3 Diagnóstico

As definições e diagnóstico de CU e DC são cuidadosamente revistas nos documentos de consenso da *European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO)* (Stange *et al.*, 2006, 2008). Nesses documentos, as definições de CU e DC reconhecem a classificação de Montreal, que tenta caracterizar mais precisamente os padrões de DII (Mowat *et al.*, 2011). De acordo com o sistema Montreal de classificação, o diagnóstico de DII é confirmado por avaliação clínica e uma combinação de alterações hematológicas, endoscópicas, histológicas ou investigações baseadas em imagens (Mowat *et al.*, 2011). No caso de CU, o diagnóstico deve ser feito com base na suspeita clínica apoiado por achados macroscópicos apropriados em retossigmoidoscopia ou colonoscopia, achados histológicos típicos em biópsia e exames de fezes negativos para agentes infecciosos. Em se tratando da DC, por sua vez, o diagnóstico depende da demonstração de inflamação focal, assimétrica e frequentemente granulomatosa, mas as investigações selecionadas variam de acordo com as manifestações apresentadas e complicações (Sands, 2004; Stange *et al.*, 2006).

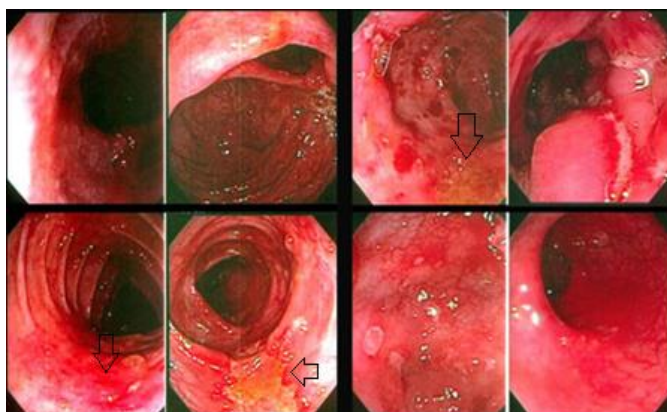


Figura 4: Colonoscopia de um paciente com doença de Crohn íleo anal grave em atividade. As setas indicam ulcerações profundas típicas da doença. Fonte: Arquivos do Dr. Rogério Serafim Parra.

Segundo os protocolos em vigor, a colonoscopia com múltiplas biópsias (pelo menos duas biópsias de cinco sítios, incluindo o íleo distal e reto) é a primeira linha de procedimento para o diagnóstico das DIIs (figura 4 e figura 5) (Mowat et al., 2011). Esse exame permite classificar a doença com base na extensão endoscópica, gravidade e características histológicas (Figura 6). Também permite a avaliação de suspeitas de estenoses no íleo distal ou cólon (Terheggen et al., 2008). Assim, deve haver um esforço na tentativa de definir o tipo de DII, mencionar outros diagnósticos ou complicações coexistentes e mencionar a ausência ou presença de qualquer displasia e seu grau Stange et al., 2006; Terheggen et al., 2008).

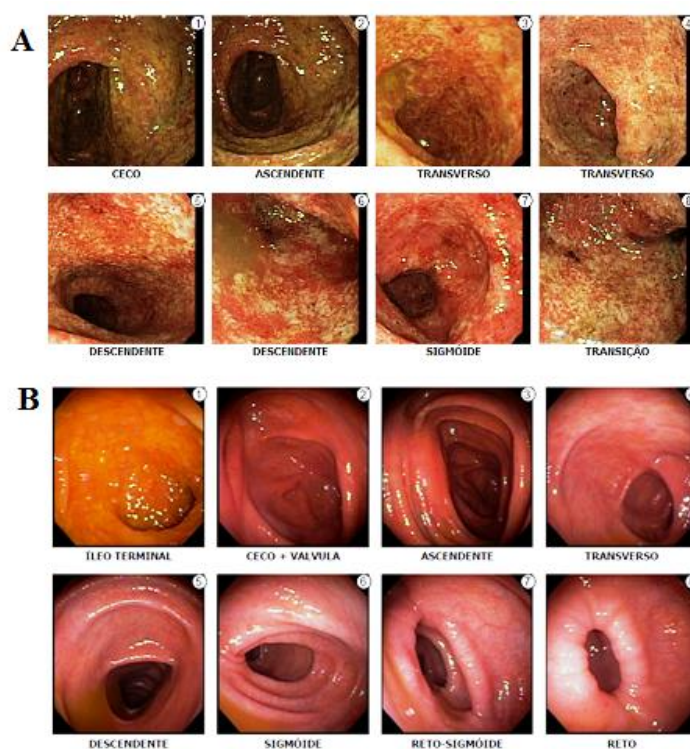


Figura 5: Colonoscopia de um paciente com pancolite ulcerativa grave, refratário a mesalazina e com dependência ao corticóide (A). Mesmo paciente com 1 ano após o tratamento com Azatioprina e Infliximabe, note a cicatrização completa da mucosa e resposta profunda sustentada (B). Fonte: Arquivos do Dr. Rogerio Serafim Parra.

Métodos de diagnóstico por imagem são muito úteis na avaliação da extensão e gravidade das DIIs, bem como para investigação de complicações suspeitas (Mowat et al., 2011). Cada modalidade de diagnóstico por imagem tem suas próprias vantagens e desvantagens, sendo, portanto, desejável que os médicos discutam a

escolha dos métodos de imagem com um radiologista para evitar exposição desnecessária do paciente à radiação ionizante (Brenner et al., 2007). Dentre os métodos empregados nesse contexto, o ultrassom pode avaliar o intestino quando usados isoladamente, além de ter alta sensibilidade para detectar a doença, particularmente no íleo terminal (Parente et al., 2002). Já o *hardware* e *software* da ressonância magnética facilitam a avaliação rápida e precisa das lesões do intestino delgado de portadores da DC (Brenner et al., 2007).

A radiografia abdominal é essencial na avaliação inicial dos pacientes com suspeita de DII grave: exclui dilatação colônica e pode ajudar a avaliar a extensão da doença na CU ou identificar constipação proximal. Na radiografia abdominal da DC pode dar uma impressão de uma massa na fossa ilíaca direita, ou mostrar evidência de dilatação do intestino delgado (Hall et al., 2008). Por sua vez, a tomografia computadorizada do intestino fornece informações similares à ressonância magnética, porém com capacidade de caracterização menor. As vantagens sobre a ressonância magnética incluem disponibilidade, aquisição rápida de imagens (alguns segundos) e resolução espacial. Outros exames de imagem podem ser utilizados para auxiliar o diagnóstico das DIIs de acordo com as diretrizes de Montreal como a fluoroscopia com bário varreduras marcadas com isótopos e os leucócitos radiomarcados os quais possuem a vantagem de avaliarem o intestino de maneira morfofuncional (Mowat et al., 2011; Mota et al., 2007).

Historicamente, o eritema nodoso tem sido considerado mais comum na DC do que na CU (Samitz et al., 1975). Entretanto, nos exames de imagem (especialmente a ressonância magnética e na tomografia computadorizada) tem sido comum o aparecimento de depósitos de gordura em torno da mucosa colônica inflamada conhecida como *creeping fat*, o qual é exclusivo da DC e pode ser um fator preponderante para o diagnóstico diferencial das DIIs (Figura 7).

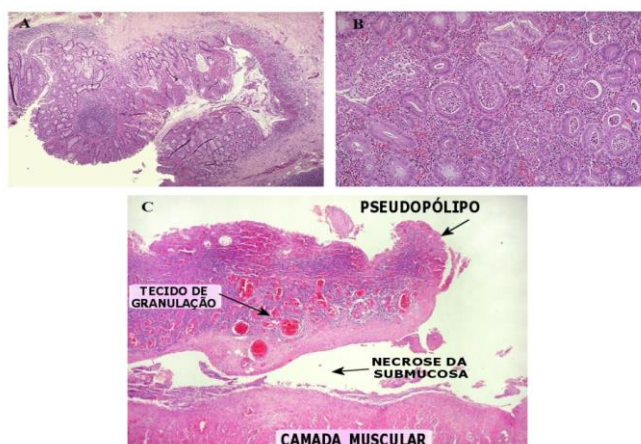


Figura 6: Cortes histopatológicos representativos de DIIs. Infiltrado inflamatório e erosão da mucosa (A) e abscessos das criptas com depleção de células caliciformes (B) em paciente com colite ulcerativa. Abscessos das criptas degeneram o epitélio glandular e comprometem a submucosa, podendo formar também "lesões em túnel", chegando a expor a camada muscular à luz do órgão e formando os pseudopólipos. Com o processo de cicatrização, surge tecido de granulação, que se mostra congesto (C). Fonte: Arquivos da Liga de Patologia da UFC.

No entanto, vale destacar que nem todos os casos de DC aparecem com esse sinal, e a sua identificação requer profissionais altamente capacitados em virtude do discreto sinal nas imagens (Ng et al., 2017). As reações inflamatórias que afetam o intestino de pacientes com DIIs são conhecidas por aumentarem a translocação bacteriana para regiões adjacentes ao intestino, como o tecido adiposo (Kruis et al., 2013b; Zulian et al., 2013). Esses microrganismos, bem como os seus subprodutos, são conhecidos por promoverem a proliferação e ativação de adipócitos e pré-adipócitos, induzindo assim a hiperplasia do tecido adiposo mesentérico (Zulian et al., 2013). Nos exames de imagens de pacientes com DC a hiperplasia dos adipócitos aparece como *creeping fat*, o qual é associado com segmentos inflamados do intestino e cobre mais de 50% da circunferência intestinal (Karaskova et al., 2021). Morfologicamente, os *creeping fat* são um conjunto de adipócitos de tamanho significativamente menor e densidade celular cerca de quatro vezes maiores que aqueles do tecido adiposo branco mesentérico adjacente, possuindo também grande quantidade de células imunes como linfócitos, macrófagos, neutrófilos e células natural killers (NK) (Peyrin-Biroulet et al., 2007). Esse conjunto especializado de adipócitos possui um papel ativo na DC, sendo responsável pela

inflamação transmural, fibrose, e hipertrofia muscular característica dessa DII. Adicionalmente, é frequente o relato de depósitos de gordura na submucosa intestinal de pacientes com DII (sinais de halos de gordura) (Fink et al., 2012).

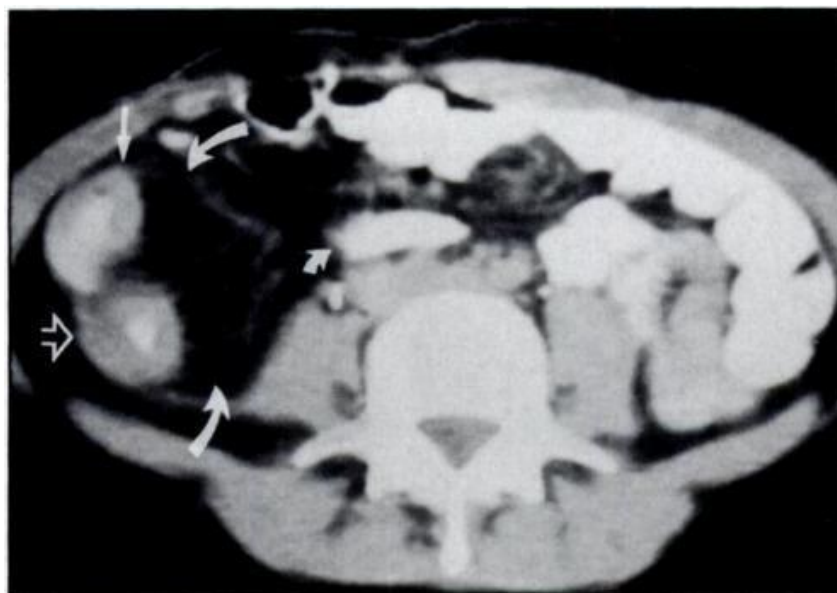


Figura 7: Representação dos *Creeping fat* na doença de Crohn por tomografia computadorizada (TC). A TC mostra as paredes do íleo, homogeneamente espessas (seta não preenchida) e cólon ascendente (seta sólida reta). Medialmente, observe grande quantidade de gordura mesentérica (em negro; setas curvas grandes). Observe também a separação da alça normal do intestino delgado (pequena seta curva) desses segmentos doentes. Fonte: GORGE et al. 1996.

Os adipócitos presentes nos *creeping fat* e nos depósitos da submucosa intestinal secretam inúmeras citocinas e adipocinas capazes de modular funções gastrointestinais e o sistema imune (Gonçalves et al., 2015). Entre as adipocinas secretadas pelos adipócitos viscerais, destaca-se a leptina. Esse hormônio (“leptos” palavra grega que significa “magra”) é produzido e secretado pelo tecido adiposo, estômago e músculo, e atua principalmente no hipotálamo regulando a ingestão de alimentos e o gasto de energia (Bell-Anderson et al., 2004; Marques-Oliveira et al., 2018).


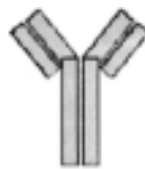

2.4 Tratamentos

O tratamento convencional das DIIs envolve o uso de 5-aminossalicilatos (5-ASAs) como terapia de primeira linha para indução e manutenção da remissão em pacientes com DII. Os 5-ASAs são seguros e geralmente bem tolerados (Hanauer & Strömberg, 2004). Seu mecanismo de ação ocorre através da inibição das vias da ciclooxigenase e lipoxigenase do metabolismo do ácido araquidônico, da síntese de citocinas inflamatórias e da proliferação dos linfócitos T. Os aminossalicilatos mais utilizados são a sulfassalazina, mesalazina, osalazina e a balsalazina, muitas vezes combinados com corticosteroides (Habr-Gama et al., 2011). Corticosteroides têm sido empregados quando os 5-ASAs se mostram ineficientes. Eles provavelmente agem pelas mesmas propriedades funcionais relativas dos processos inflamatórios. Parecem controlar a doença de uma maneira complexa, o que pode incluir a modulação de fosfolipase A2, interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), molécula-1 de aderência aos leucócitos endoteliais (ELAM-1) e molécula-1 de aderência intercelular (ICAM-1) e a lise dos linfócitos e dos eosinófilos. O uso tópico de corticosteroides, como enemas de hidrocortisona, podem ser usados como alternativa ao 5-ASA para doentes com proctite ulcerativa ou colite ulcerativa distal. Prednisona ou prednisolona oral são usadas em colites graves, sendo a administração intravenosa reservada para pacientes graves que requerem hospitalização (Aniel & Odolsky, 2002). São fármacos potentes para induzir remissão, porém apresentam diversos efeitos colaterais que os contraindicam como medicamento de manutenção, não sendo recomendado, por exemplo, seu uso acima de 3 meses (Aniel & Odolsky, 2002).

O controle do processo inflamatório característico das DIIs pode, ainda, ser realizado com o uso de outros medicamentos como imunossuppressores e imunomoduladores ou terapias biológicas anti-TNF. Os fármacos considerados imunossuppressores e imunomoduladores são substâncias que atuam através da inibição da proliferação e ativação dos linfócitos, diminuindo assim a resposta inflamatória, sendo os mais utilizados a azatioprina, a 6-mercaptopurina, o metotrexato, e ciclosporina A e o tacrolimus. Estes modificadores imunológicos são

utilizados como terapia de manutenção em pacientes com doença inflamatória intestinal em situação de intolerância ou falta de resposta aos aminossalicilatos, corticosteróides (dependentes ou resistentes) ou cirurgia, em doentes com DII grave ou com a doença com manifestações perianais, os que não responde antimicrobianos, e como tratamento de primeira linha em doentes que apresentem fístulas (Triantafillidis et al., 2011).

Tabela 1: Medicamentos biológicos utilizados em DII.

Anticorpo	Aplicação	Composição	Estrutura	Esquema
Infliximabe - IFX Remicade	CU e DC Intravenoso	Quimérico (25% murino, 75% humano) mAc	Domínios variáveis de origem murina e o restante, humana. Liga 2 moléculas de TNF.	
Adalimumabe – ADA, Humira	CU e DC Intradérmico	mAc Humano	Sequência única de aminoácidos. Liga 2 moléculas de TNF.	
Certolizumabe pegol – CZP, Cimzia	DC Intradérmico	Composto Monovalente Humanizado	Ligam covalentemente ao polietilenoglicol. Fc é ausente. Liga 1 molécula de TNF.	

Fonte: Adaptado de GUBERNATOROVA e TUMANOV, 2016.

O desenvolvimento de agentes biológicos e seu uso nas DIIs melhorou consideravelmente a qualidade de vida dos pacientes ao modificar o curso da doença e prevenir complicações e cirurgias. As terapias biológicas consistem em anticorpos monoclonais contra a citocina inflamatória TNF- α , e incluem os

medicamentos infliximabe (IFX), adalimumabe (ADA), Golimumabe (GLM) e certolizumabe pegol (CZP). Suas características estão representadas na tabela 1. O controle da inflamação pode ser alcançado com os três agentes biológicos disponíveis, que são eficazes tanto na indução quanto na manutenção da remissão. Para a cura da fístula, tanto o IFX quanto o ADA são eficazes. Pacientes com DC que foram tratados com IFX concomitante com azatioprina ou monoterapia com IFX são mais propensos a ter uma remissão clínica sem corticosteroides do que aqueles que recebem monoterapia com azatioprina (Triantafillidis et al., 2011). Os efeitos colaterais mais significativos relacionados a esses medicamentos são a ocorrência de infecções oportunistas e aparecimento de autoimunidade. As contraindicações incluem a presença de insuficiência cardíaca e doenças infecciosas agudas. Várias estratégias podem minimizar os riscos associados às terapias biológicas e incluem um exame cuidadoso da história pregressa e exame físico e triagem para tuberculose latente (Stallmach et al., 2010).

O tratamento cirúrgico nas DII's tem indicações relacionadas à falta de resposta aos tratamentos medicamentosos. Na doença de Crohn as indicações cirúrgicas são basicamente compostas por alterações funcionais como estreitamentos e perfurações, hemorragia no intestino, abscessos ou fístulas e megacólon tóxico. Aproximadamente 60% dos pacientes com DC serão abordados com ressecção intestinal (Bernell et al., 2000).

A observação macroscópica de uma amostra de ressecção na doença de Crohn (figura 8) mostra classicamente um padrão descontínuo de inflamação. Principalmente no intestino delgado, pode ser observado o tecido adiposo se expandindo em direção à superfície antimesentérica (envoltório de gordura – seta. Figura 8a). As primeiras lesões macroscópicas da mucosa são pequenas úlceras aftosas que tipicamente se desenvolvem sobre folículos linfóides (figura 8b). À medida que as úlceras aftosas aumentam, elas se aglutinam em úlceras serpiginosas ou lineares mais profundas, com bordas da mucosa edematosa salientes (figura 8c). Em locais de inflamação transmural com fibrose e proliferação fibromuscular, a parede intestinal pode tornar-se espessada e podem ocorrer estenoses. As reações inflamatórias que afetam o intestino de pacientes com DII's podem aumentar a translocação bacteriana para regiões adjacentes ao intestino,

como o tecido adiposo, promovendo a proliferação e ativação de adipócitos induzindo assim a hiperplasia do tecido adiposo mesentérico. O envoltório de gordura proeminente é visto como achado secundário (setas - figura 8d) (Langner et al., 2014).

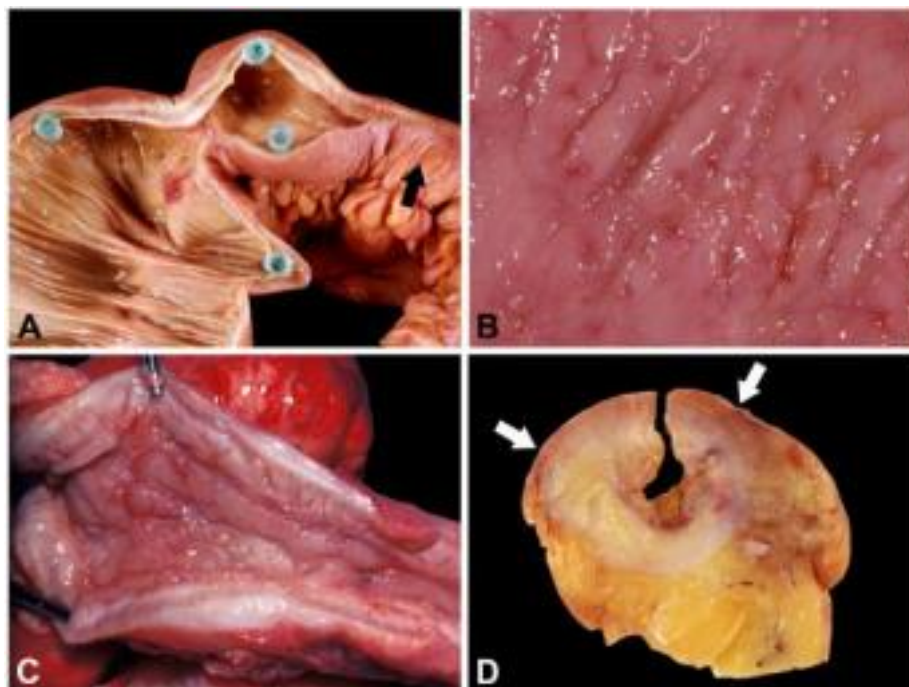


Figura 8: Ressecção com acometimento por Doença de Crohn. Fonte: LANGNER et al, 2014.

A suplementação nutricional e o uso de probióticos vêm sendo estudados no manejo de doenças inflamatórias intestinais. O déficit nutricional de macro e micronutrientes como cálcio, vitamina D, vitaminas lipossolúveis, zinco, ferro e vitamina B12 podem ser frequentemente notados nesses pacientes, necessitando de reposição. A nutrição enteral exclusiva (NEE), geralmente administrada de 3 a 6 semanas, é uma terapia de indução de remissão alternativa às terapias convencionais principalmente em pediatria e a nutrição enteral parcial (NEP) para tratamento de manutenção vem exibindo resultados promissores. As demais modificações de dietas orais ainda são inconclusivas a respeito de sua eficácia, sendo necessários mais estudos (de Souza et al., 2020).

2.5 Biomarcadores no diagnóstico de DIIs

2.5.1 Calprotectina

A calprotectina tem a vantagem de apresentar excelente estabilidade nas fezes à temperatura ambiente por até uma semana. A quantificação é feita usando a técnica ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), barata e fácil. Cinco gramas de fezes são suficientes para determinar com segurança este marcador (Poullis *et al.* 2002; Lundberg *et al.*, 2005; Angriman *et al.*, 2007). Embora a excreção de Calprotectina fecal (CF) nas fezes tenha sido relativamente consistente, alguns indivíduos têm concentração de calprotectina com maior variação dia-a-dia. Essa variabilidade pode ser devido a mudanças na dieta ou atividade física (Poullis *et al.*, *n.d.*; J. A. Tibble *et al.*, 2000). Dobrzanski *et al.* com 51 pacientes portadores de DIIs mostrou que houve variação diurna insignificante da CF em pessoas saudáveis, mas uma variação clinicamente aceitável DC (ativo e inativo), bem como CU inativo (Dobrzanski *et al.*, 2014). Estima-se que um volume de sangramento de pelo menos 100 mL por dia pode causar uma concentração elevada de calprotectina fecal (Roseth *et al.*, 1992).

A calprotectina é uma proteína de 36 kDa ligada ao cálcio e ao zinco (heterodímero de S100A8/A9) abundantes no citoplasma dos neutrófilos e, em menor quantidade, também nos monócitos e macrófagos reativos (Frosch *et al.*, 2005; Judd *et al.*, 2011). Ela está presente em condições inflamatórias agudas e crônicas bem como patologias oncológicas, sendo abundante em vários fluidos corporais na mesma proporção que o grau de inflamação (Johne *et al.*, 1997). A ruptura e a morte celular desencadeiam a liberação de calprotectina, no entanto, parte dela também é ativamente secretada, figura 9 (Rammes *et al.*, 1997; Voganatsi *et al.*, 2001). A calprotectina é liberada nas fezes e adquire estabilidade ligando-se ao cálcio, antes de ser eliminada. Portanto, sua presença nas fezes indica migração de neutrófilos e infiltração no trato intestinal (Vermeire *et al.*, 2004, 2005). A calprotectina também é encontrada no sangue, mas sua concentração nas fezes é seis vezes maior que os

níveis plasmáticos normais (Roseth et al., 1992; Lorentzon Fagerberg et al., 2003). Concentrações significativamente maiores de calprotectina fecal têm sido reportadas nos pacientes com doença inflamatória intestinal, adultos e pediátricos, em comparação com pacientes com Síndrome do Intestino Irritável (SII) ou indivíduos saudáveis. Contudo, elevadas concentrações de calprotectina fecal não são específicas da DII. Estas podem ser encontradas também em neoplasias, na presença de pólipos, na enteropatia por antiinflamatórios não esteróides (AINEs), artrite reumatóide, espondilite anquilosante e lúpus eritematoso sistêmico, com o aumentar da idade, na doença celíaca, na colite microscópica e/ou alérgica e infecções (Roseth et al., 1992; Gaya et al., 2005).

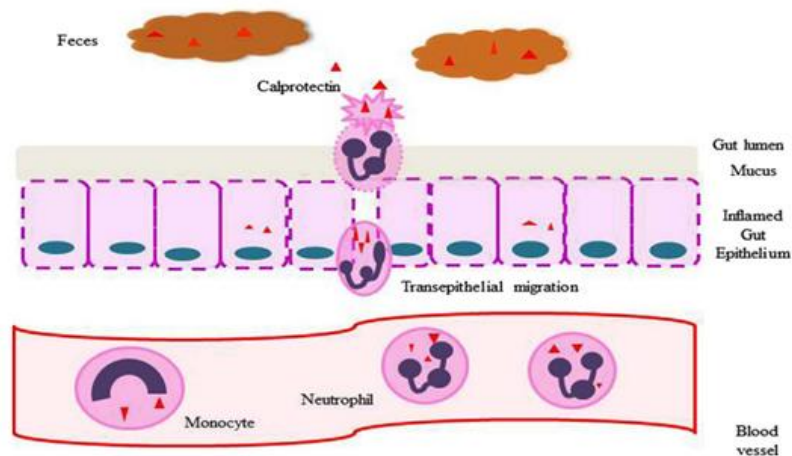


Figura 9. Esquema representação da calprotectina lançamento na DII. Adaptado de *Ikhtaire et al., 2016*

Diante disso, é importante definir um corte apropriado e padrão para o uso mais eficiente, preciso da medida dos níveis de calprotectina em pacientes com DIIs. A maioria dos estudos mencionaram um ponto de corte de 50 mcg/g g de fezes, mas um valor de corte mais alto para pacientes com DII diagnosticada e um corte mais baixo para indivíduos saudáveis quando usado para triagem é mais apropriado (Gisbert & McNicholl, 2009). Uma maior precisão foi encontrada quando usando um corte de 100 mcg/g em vez de 50 mcg/g de fezes no diagnóstico de DII (Dhaliwal et al., 2015; Von Roon, 2007). Penna *et al* (2021), realizou um estudo prospectivo comparativo da avaliação endoscópica e determinação conjunta da PCR e

Calprotectina no grupo de pacientes com doença de Crohn e avaliou a acurácia destes marcadores na inflamação. O ponto de corte de 155 mcg/g apresentou alta sensibilidade (96%) e acurácia de 78% no diagnóstico da atividade inflamatória à endoscopia. Em relação à PCR, o valor de 6,7 mg/L proporcionou sensibilidade de 75% e especificidade de 67%. A especificidade foi mais elevada (82%) quando mensurados em conjunto, comparando-se ao seu uso individual (Penna *et al.*, 2021). Os valores de referência de calprotectina utilizados para o auxílio no diagnóstico, prognóstico e acompanhamento da inflamação nas DIIs são: inferior a 50 mcg/g fezes consideradas níveis normais; 50 a 200 mcg/g fezes considerado duvidoso/alerta e para valores acima de 200 mcg/g fezes são consideráveis alterados (com sugestiva de inflamação) (Kopylov *et al.*, 2016; Naismith *et al.*, 2014; Walsham & Sherwood, 2016).

Apesar disso, estudos têm demonstrado que a precisão diagnóstica da CF é superior aos marcadores inflamatórios de rotina, como Proteína C reativa (PCR), velocidade de hemossedimentação (VSE), ou ambos (Tibble *et al.*, 2000; Tibble *et al.*, 2002). Por isso, tem sido sugerido que a CF poderia ser usada como um teste eficaz para evitar ileocolonoscopias desnecessárias em pacientes com distúrbios funcionais. Muitos estudos mostram que a calprotectina encontrada nas fezes é o melhor biomarcador, até o momento, para medir diferentes graus de atividade endoscópica nas DIIS (Angriman *et al.*, 2007; Desai *et al.*, 2007; E Penna *et al.*, 2020; Lin *et al.*, 2014). Alguns estudos demonstraram ainda que os valores de calprotectina fecal podem prever a recorrência em 12 meses (Sipponen *et al.*, 2010; Kallel *et al.*, 2010).

Entretanto, dados na literatura demonstram que a calprotectina possui maior capacidade diagnóstica para DC (sensibilidade de 83%, especificidade de 85%) do que para a CU (sensibilidade de 72%, especificidade de 74%) (Gisbert *et al.*, 2009). Por outro lado, um estudo de 79 pacientes com DII de Costa *et al.* demonstrou que a calprotectina fecal correlaciona-se melhor com a recorrência na CU do que na DC (Costa *et al.*, 2005). No mesmo sentido, outros estudos também demonstram a calprotectina como um biomarcador melhor para a atividade da doença em CU quando comparado a DC (Lin *et al.*, 2014). E, em geral, a calprotectina parece

associar-se melhor com a DC limitada ao cólon do que com a doença ileocólica ou ileal (Costa et al., 2005; Langhorst et al., 2005; Sipponen et al., 2010).

Diante desse cenário, a investigação por outros biomarcadores que auxiliem a realização do diagnóstico confirmatório da doença inflamatória intestinal, bem como a distinção entre a doença ativa e a remissão, torna-se importante no manejo desses pacientes. Além disso, aspectos como baixo custo, disponibilidade para unidades de saúde, fácil execução com praticidade para o paciente deve nortear a busca para esses novos biomarcadores. Neste contexto, destaca-se a importância de se explorar a leptina como biomarcador auxiliar no manejo da DII.

2.5.2 Leptina

2.5.2.1 Aspectos bioquímicos da leptina

A leptina (da palavra grega *leptos*, que significa “fina”) é derivada do gene *lep*, localizado no cromossomo 7, que transcreve um peptídeo de 167 aminoácidos com um peso molecular de 16kD. A sequência do gene *lep* é altamente preservada em mamíferos, e os ortólogos da leptina existem em anfíbios, répteis e peixes com considerável divergência em sequências de aminoácidos primários (Münzberg & Morrison, 2015).

Esse peptídeo é produzido e secretado predominantemente pelo tecido adiposo, fazendo com que o seja categorizado como uma adipocina. Os níveis circulantes de leptina refletem o tamanho do tecido adiposo e comunicam o estado de armazenamento de energia ao hipotálamo, sendo, portanto, um peptídeo anorexígeno (Marques-Oliveira et al., 2018). Alguns estudos demonstram que a leptina e seu receptor também são expressos e secretados por células epiteliais gástricas humanas (Mixture et al., 1999). Nesse caso, os hormônios gástricos, são conhecidos por regular em longo prazo a produção de leptina nos adipócitos por

meio da ativação dos receptores de receptor de colecistocinina B (CCK-B) e gastrina, os quais resultam em aumento dos níveis de RNA mensageiro (mRNA), de leptina e liberação para a corrente sanguínea dessa adipocina (Attoub et al., 1999). A leptina é, também, produzida pela placenta (Masuzaki et al., 1997).

Após ser secretada pelo tecido adiposo, a leptina atinge o hipotálamo pela transcitose mediada pelo receptor e não pelo sistema de barreira hematoencefálica (di Spiezio et al., 2018). Sua ação se dá pela sinalização no hipotálamo inibindo a ingestão de alimentos e aumentando o gasto energético. Sendo assim, ela é um importante regulador da massa do tecido adiposo e do peso corporal (Paracchini et al., 2005). A leptina também é reconhecida como hormônio semelhante à citocina em virtude de suas ações pleiotrópicas em modulação de respostas imunes (Graham M. Lord, 1998). Nessa direção, ela está envolvida nos processos de defesa e reparação da mucosa intestinal incluindo a regulação da extensão das respostas inflamatórias por infecção bacteriana e modulação da cicatrização de feridas (Ring et al., 2000; Jaworek et al., 2003). Estudos demonstram que a leptina tem resposta dependente do tempo a estímulos inflamatórios agudos. Os níveis de leptina podem aumentar rapidamente durante a infecção aguda e sepse, consistente com os achados de que a expressão do RNAm da leptina é estimulada por lipopolissacarídeo (LPS) e citocinas tais como TNF- α , IL-6 e IL-1 β durante reações inflamatórias (Sarraf et al., 1997; Peterson & Fry, 1988).

O receptor de leptina (ObR) é codificado pelo gene *db* em camundongos, sendo um membro da família de receptores de citocinas de classe I, semelhante à gp130 (Al-Qassab et al., 2009). O ObR consiste em seis isoformas (ObRa, ObRb, ObRc, ObRd, ObRe e ObRf), formadas a partir de *splicing* alternativo do mRNA do gene *db*. Essas isoformas têm um domínio comum de ligação à leptina e diferem em seus domínios intracelulares (Bjirbaek et al., 1997; Tartaglia et al., 1995). Tipicamente, a leptina se liga ao seu receptor induzindo alterações conformacionais que ativam Janus cinase (JAK) e (STATs), uma via clássica mostrada na figura 10 (Marques-Oliveira et al., 2018b).

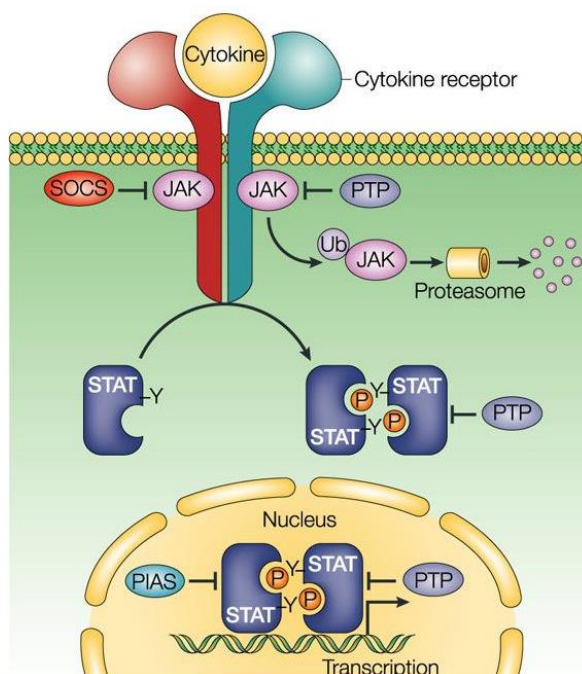


Figura 10: Representação esquemática da sinalização JAK/STAT, a qual é acoplada aos receptores de leptina. Fonte: Niswender et al. 2001.

2.5.2.2 Papel da leptina na fisiologia e fisiopatologia intestinal

Embora o intestino não seja um tecido alvo para a leptina, vários estudos experimentais apontam que a leptina determina efeitos fisiológicos importantes no crescimento intestinal, na diferenciação e maturação celular (Badman et al., 2005). A presença de expressão da leptina no líquido amniótico quando os fetos começam a deglutir e depois na mucosa gástrica, bem como a presença precoce do receptor de leptina (Ob-Rb) na mucosa intestinal sugere um possível papel da leptina no crescimento e na maturação da mucosa intestinal do trato digestivo humano já durante o desenvolvimento fetal (Aparicio et al., 2005). Além disso, a expressão do mRNA do receptor OB-Rb de leptina funcional foi detectada em células do epitélio humano de intestino delgado (CACO-2) pelo uso da reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), o que confirma que o enterócito tem a leptina como um potencial alvo de ação (Morton et al., 1998).

Adicionalmente a eventos fisiológicos da mucosa intestinal, alguns estudos já vêm relacionando essa adipocina a doenças gastroentéricas de grande importância clínica. Foi demonstrado em um experimento que a leptina induz a formação de óxido nítrico (NO) em vasos mesentéricos (Hacioglu et al., 2005) e que preserva significativamente índices de mucosa e histologia intestinal seguido de lesão de isquemia-reperfusão. *Sukhotnik et al.* (2009), por sua vez, demonstraram que a leptina tem forte efeito estimulante na recuperação intestinal de lesão da mucosa intestinal causada por metotrexato (MTX), fármaco utilizado para tratamento de câncer e doenças autoimunes. Os resultados da citometria de fluxo mostraram que a leptina aumenta a proliferação celular de uma forma dependente da dose. Os resultados demonstraram ainda que ratos tratados com metotrexato apresentaram diminuição significativa no peso total do jejuno, o qual foi revertido pelo uso da leptina. Esse aumento do jejuno em resposta à leptina se deu por preservação e regeneração das criptas e por um alto teor de proteína na mucosa em comparação com animais tratados com MTX, indicando uma tendência de diminuição da lesão intestinal (*Sukhotnik et al.*, 2007).

Sukhotnik et al., mostraram em animais que o tratamento com leptina resulta em uma diminuição significativa na lesão induzida por quimioterápicos, diminuindo o dano intestinal. O aumento do DNA (ácido desoxirribonucleico) e das proteínas da mucosa após a administração de leptina aumenta o metabolismo celular, o que é consistente com o aumento da proliferação de células epiteliais. Em ratos que passaram por ressecção intestinal o tratamento com leptina teve um forte efeito estimulante no recrescimento intestinal (*Sukhotnik et al.*, 2007). Adicionalmente, a leptina acelera a cicatrização de anastomoses colônicas em vários modelos animais (*Tasdelen et al.*, 2004.). Em contrapartida, os adipócitos mostraram-se capazes de melhorar a proliferação de células de câncer de cólon *in vitro*, parcialmente via leptina (*Yoon et al.*, 2014).

Estudos demonstram ainda que os níveis de leptina são mais altos em pacientes com doença de Crohn ativa ou colite ulcerosa em comparação a pacientes controle (*Sitaraman et al.*, 2004). Entretanto, esses resultados são um tanto contraditórios. *De Carvalho et al.* (2020), demonstraram que os níveis de leptina são inversamente proporcionais à presença e ao grau de inflamação da DII, mostrando assim que este

peptídeo não possui apelo como um biomarcador para diferenciar entre pacientes saudáveis e doentes. No entanto, este mesmo trabalho foi hábil em mostrar que os níveis sanguíneos da leptina são significativamente maiores entre portadores da DC se comparados a pacientes com CU, indicando o seu potencial como um biomarcador para o diagnóstico diferencial entre essas DII's (De Carvalho et al., 2021). *Kim et al* (2017) demonstraram ainda que níveis séricos de leptina se correlacionaram significativamente com os níveis de PCR em pacientes com a doença de Crohn.

Mesmo com os biomarcadores utilizados na prática clínica atualmente e sua positiva capacidade de avaliar a atividade da doença, o biomarcador ideal para a DC ainda não foi encontrado (Plevy et al., 2013). E, existem casos em que ainda não é possível a identificação da atividade da doença sem a necessidade de um exame mais invasivo, como a endoscopia (Mowat et al., 2011). Esse tipo de exame gera desconforto e possível constrangimento ao paciente. Em entrevistas realizadas com pacientes com doença inflamatória intestinal pela Associação Brasileira de Colite Ulcerativa e Doença de Crohn - ABCD, há relatos de pacientes que se recusaram a realizar o exame por se tratar de uma enteroscopia, que teria a introdução de um tubo flexível pelo ânus (Machado et al., 2017). Muitos desses exames apresentam alto custo e isso dificulta seu acesso. Contudo, eles podem ser acessados também por meio do Sistema Único de Saúde (SUS) por toda a população. Entretanto, por se tratar de exames mais robustos e com um custo operacional maior, muitas unidades de saúde não são equipadas com aparelhos capazes de realizar tais exames. Isso também é um fator que prejudica o diagnóstico e acompanhamento da doença.

À vista disso, a descoberta por biomarcadores que possibilitem auxiliar o diagnóstico confirmatório e acompanhamento preciso da atividade da doença de Crohn com um baixo valor de custo operacional, capaz de ser realizado em qualquer unidade de saúde e que apresente um desconforto menor ao paciente é de extrema importância.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Determinar e avaliar os níveis séricos de leptina e de calprotectina fecal juntamente com a avaliação de composição corporal em pacientes portadores de doença de Crohn.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar os níveis de leptina sérica e de calprotectina fecal em amostras de pacientes com doença de Crohn e, também, no grupo controle.
- Avaliar a composição corporal (percentual de gordura corporal e circunferência abdominal) de pacientes e dos indivíduos do grupo controle.
- Identificar o percentual de gordura corporal de cada participante e avaliar se esse fator é modificador da concentração sérica de leptina e calprotectina fecal.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Casuística

Projeto de caráter experimental cuja proposta é evidenciar o potencial valor diagnóstico da leptina sérica em pacientes com diagnóstico confirmatório para a doença de Crohn por meio da quantificação dessa adipocina no sangue dos pacientes e avaliação da composição corporal. Pacientes atendidos no Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) foram selecionados para participar do estudo, aplicando-se os critérios de inclusão e exclusão. E um grupo de funcionários da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais foram selecionados, também se adequando aos critérios inclusão e exclusão, para compor o grupo controle. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP/UFMG) (CAAE: 51088021.0000.5149).

Após a seleção dos participantes foram realizadas coletas de amostras de fezes e sangue e uma análise de avaliação corporal foi realizada. O estudo incluiu de 23 participantes (13 mulheres e 10 homens), sendo desses 15 compondo o grupo de pacientes e 8 no grupo controle. A idade variou entre 20 e 67 anos. Os dados clínicos dos pacientes, bem como laboratoriais, foram obtidos através de análises dos prontuários.

Os pacientes tiveram o diagnóstico confirmado para doença de Crohn por meio de exames sorológicos e endoscópicos e a atividade da doença por meio da avaliação clínica baseada no Índice de *Harvey-Bradshaw*. O Índice de *Harvey-Bradshaw* é um questionário-score ao qual o paciente informa sobre seu estado de bem-estar geral, dores e número de evacuações e a interpretação das respostas indicam se o paciente está em fase ativa ou remissiva (Harvey & Bradshaw, 1980). Juntamente com o Índice de *Harvey-Bradshaw*, a calprotectina fecal torna-se um parâmetro para a confirmação da atividade da doença nos pacientes atendidos no Instituto Alfa de Gastroenterologia do

Hospital das Clínicas.

4.2 Critérios de Inclusão e Exclusão

Os critérios de inclusão adotados foram pacientes com diagnóstico confirmatório para a doença de Crohn, através da Classificação de Montreal em suas diferentes formas (estenosante, não estenosante e inflamatória) e os controles selecionados foram participantes que não tinham a doença de Crohn nem qualquer outra doença inflamatória intestinal. Ambos os grupos atendendo a faixa etária estabelecida pelo estudo: de 18 a 70 anos. Enquanto os critérios de exclusão foram participantes com doenças da tireóide, doença cardíaca coronariana, hipertensão maligna ou insuficiência renal, grávidas, aqueles com cirrose hepática, pacientes que apresentam fístulas perianais ou que passaram por ostomia.

Para este estudo, foram coletadas amostras sanguíneas mediante jejum de 8 horas e amostras fecais (fezes de até 24 horas antes da coleta sanguínea). Os participantes também passaram por uma avaliação nutricional para determinação da composição corporal (percentual de massa magra e gordura, além de circunferência abdominal e de quadril) e responderam um questionário a fim de identificar hábitos de cada paciente (alimentação, atividade física, tabagismo, etc.). Para a seleção prévia dos pacientes elegíveis para o estudo foi realizada uma análise do prontuário dos pacientes que fazem acompanhamento no Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG. Após essa seleção prévia, os pacientes foram convidados pelos pesquisadores, no consultório médico durante a consulta, a participar da pesquisa através do fornecimento de amostras sanguíneas e fecais, análise nutricional e resposta a um questionário.

4.3 Coleta das amostras

A autorização e consentimentos fornecidos pelos pacientes foram devidamente registrados através do preenchimento e assinatura, pelos pacientes e pelo pesquisador responsável, do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), apêndice 10.1. Os participantes não tiveram custos para participar dessa pesquisa. Os frascos coletores para amostras fecais foram fornecidos pela equipe de pesquisa. Além disso, os participantes tiveram a liberdade para se recusar a participar do estudo ou se retirar do estudo a qualquer momento sem prejuízos ao seu atendimento médico.

4.3.1 Amostras sanguíneas

As amostras de sangue foram coletadas por profissionais qualificados e com experiência para minimizar o desconforto da coleta. Além disso, como a coleta sanguínea exigiu jejum noturno (8 horas) dos participantes, ao final da coleta, havia disponível para cada participante um lanche fornecido pela equipe de pesquisa. Foram coletados 2 tubos de sangue de cada paciente, totalizando 18 mL de amostra sanguínea.

4.3.2 Amostras fecais

Para as amostras de fezes, foram disponibilizados pela equipe de pesquisa potes coletores onde cada participante do estudo realizou a coleta das fezes com o prazo máximo de 24 horas antes do dia da coleta sanguínea. Para minimizar o constrangimento da entrega das amostras fecais, estas foram recolhidas individualmente e em um local reservado com apenas o pesquisador responsável pelo recebimento da amostra. Neste mesmo local reservado, os pacientes tiveram seus dados sobre a composição corporal coletados por uma profissional nutricionista que também compõe a equipe deste estudo.

Após as coletas, as amostras (sangue e fezes) foram acondicionadas em caixas

térmicas e transportadas sob refrigeração, imediatamente após término das coletas, e foram encaminhadas para um laboratório terceirizado, através de uma parceria técnico-científica com o Laboratório Lustosa, localizado na Rua dos Carijós, 150, 6º andar- Centro, Belo Horizonte-MG, para análise.

4.3.3 Composição corporal

Para a coleta de dados da composição corporal de cada participante, em especial os dados relacionados ao percentual de gordura corporal e circunferência abdominal, foram utilizados uma balança antropométrica e um adipômetro/plicômetro científico. As pregas utilizadas durante a medição com o adipômetro/plicômetro foram: bíceps, tríceps, subescapular, peitoral, suprailíaca, abdômen, coxa e panturrilha, todas em triplicata. Foram medidas também, por meio de uma fita métrica, as circunferências do: braço, punho, cintura, quadril, abdome, coxa e panturrilha. Os dados foram coletados por uma profissional nutricionista e foram tratados no *software* Dietbox.

4.3.4 Dados dos prontuários

Além das coletas de amostras biológicas e composição corporal, foi necessário o acesso às informações dos prontuários de cada paciente. Os principais dados acessados foram a farmacoterapia utilizada por cada um e o diagnóstico confirmatório da doença de Crohn, além de dados relacionados ao acompanhamento e evolução da doença. Para este último, foi necessário, também, acesso aos resultados dos exames de colonoscopia realizados pelos pacientes anteriormente a este estudo.

4.3.5 Questionário

Para ambos os grupos, controle e pacientes com DC, foram feitas entrevistas usando como base um questionário que tinha como intuito conhecer os hábitos de cada paciente como: uso de cigarro, medicamentos em uso, comorbidades e

presença ou ausência de dor no momento da entrevista.

4.4 Análise das amostras

Os resultados das análises das amostras sanguíneas coletadas foram comparados com o nível de calprotectina contida nas fezes (amostra de fezes) dos pacientes. A composição corporal, bem como os dados adquiridos através do questionário e auditoria de prontuários foram compilados em uma tabela para facilitar as análises e comparações.

4.4.1 Análise de leptina sérica

Para a análise da leptina sérica foi utilizada a técnica de *Enzyme immunoassay method* (ELISA) -CAN-L-4260DBC - *Diagnostics Biochem Canada Inc.*

O princípio do teste de imunoenensaio enzimático segue uma captura típica de duas etapas ou ensaio do tipo 'sanduíche'. O ensaio utiliza dois anticorpos monoclonais altamente específicos: Um anticorpo monoclonal específico para leptina é imobilizado na microplaca e outro anticorpo monoclonal específico para um epítipo diferente de leptina é conjugado com biotina.

Durante a primeira etapa, a leptina presente nas amostras e padrões está ligada ao anticorpo imobilizado e ao anticorpo biotilado, formando assim um complexo sanduíche. Excesso de anticorpo biotilado não ligado é removido na etapa da lavagem. Na segunda etapa, adiciona-se a estreptavidina-HRP, que se liga especificamente a qualquer anticorpo biotilado ligado. Novamente, a estreptavidina-HRP não ligada é removida por uma etapa de lavagem. Em seguida, adiciona-se o substrato enzimático (TMB), formando um produto colorido que é diretamente proporcional à quantidade de leptina presente. A reação enzimática é terminada pela adição da solução de parada, convertendo a cor azul em uma cor amarela. A absorbância é medida em um microtitulação

leitor de placas a 450 nm. Um conjunto de padrões é usado para traçar uma curva padrão a partir da qual a quantidade de leptina no paciente, amostras e controles podem ser lidos diretamente (Considine R., et al., 1996). Essa técnica requer o uso dos seguintes materiais:

- Separação Revestida de Anticorpo Monoclonal Anti-Leptina;
- Microplaca de Poço;
- Conjugado Monoclonal Anti-Leptina-Biotina;
- Concentrado de Conjugado de Estreptavidina-HRP;
- Calibradores de leptina;
- Controles;
- Concentrado de tampão de lavagem;
- Tampão de ensaio;
- Substrato TMB;
- Solução de parada.

4.4.2 Análise da calprotectina fecal

Para a análise da calprotectina fecal foi utilizada a técnica de fluorencimunoensaio, *EliA Calprotectin 2 Wells* - © Phadia GmbH, Freiburg, Germany.

Os *EliA Calprotectin 2 Wells* estão revestidos com anticorpos monoclonais contra a calprotectina. Se estiver presente nas amostras do paciente, a calprotectina liga-se aos anticorpos do revestimento. Após a lavagem dos componentes não ligados, são adicionados anticorpos anti-calprotectina humana marcados com enzima (*EliA Calprotectin 2 Conjugate*) formando um complexo calprotectina-conjugado. Após a incubação, o conjugado não ligado é eliminado por lavagem e o complexo ligado é incubado com a *Development Solution*. Após a paragem da reação, procede-se à leitura da fluorescência na mistura de reação. Quanto mais elevado for o valor da resposta, maior a concentração de calprotectina específica presente na amostra. Para avaliar os

resultados do teste, a resposta das amostras do paciente é comparada diretamente com a resposta dos calibradores. (Gaya et al., 2002).

Os reagentes EliA estão disponíveis em embalagens modulares, cada uma comprada separadamente. Sendo eles:

- o *EliA Calprotectin Positive Control 250* (Calprotectina humana em tampão fosfato salino (TFS=PBS), contendo albumina de soro bovino (ASB=BSA), detergente e azida de sódio (0,095 %); símbolo:pos);
- o *EliA Calprotectin Negative Control 250* (Calprotectina humana em tampão fosfato salino (TFS=PBS), contendo albumina de soro bovino (ASB=BSA), detergente e azida de sódio (0,095 %);
- o *EliA Stool Extraction Kit 2* (Calprotectin 2 Extraction Buffer 6 frascos (117 ml cada) (corado de vermelho); o tampão Tris-buffer contendo albumina de soro bovino (ASB=BSA), e azida de sódio (0,05 %);
- o *EliA Stool Extraction Kit plus* (*Stool Extraction Kit plus* tubos pré-cheios com 1800 µl de *EliA Stool Extraction Buffer plus*), para a realização de um teste *EliA Calprotectin 2*.

Os *EliA Calprotectin 2 Wells* são acondicionados em canetas, as quais são guardadas em sacos selados de folha de alumínio, contendo um exsicante. (GAYA et al., 2002).

4.5 Análise Estatística

A análise dos dados incluiu a estatística descritiva calculada para variáveis contínuas, incluindo médias, valores mínimos e máximos, bem como intervalos de confiança de 95% (ICs). O teste de *Shapiro-Wilk* avaliou a normalidade dos dados. Os dados normais foram avaliados pelo teste t. O *Mann-Whitney* foi realizado para comparar os resultados dos dados não normais (distribuição não paramétrica). Para a análise estatística não paramétrica da composição corporal foi usado o coeficiente de correlação não paramétrico através do teste *Spearman*. Todos os

dados foram analisados no *software GraphPad Prism 8.0.2*, e $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram incluídos no estudo 15 pacientes diagnosticados com a doença de Crohn (5 ativos e 10 em remissão), sendo 7 mulheres (47%) e 8 homens (53%), tabela S1. Os pacientes tiveram o diagnóstico confirmatório para doença de Crohn por meio de exames sorológicos e endoscópicos e a atividade da doença pela avaliação clínica baseada no Índice de *Harvey-Bradshaw*. Juntamente com o Índice de *Harvey-Bradshaw*, a calprotectina fecal torna-se um parâmetro para a confirmação da atividade da doença nos pacientes atendidos no Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas. A idade média entre os portadores de Crohn foi de 48 anos, tabela S1. Para o grupo controle foram selecionados 8 participantes, sendo 6 mulheres (75%) e 2 (25%) homens com idade média de 52 anos, tabela S3.

Este é o primeiro relato de uma avaliação conjunta entre os níveis da leptina sérica e os níveis de calprotectina fecal em pacientes com a doença de Crohn.

5.1 Níveis séricos de leptina no prognóstico da doença de Crohn

Os níveis de leptina encontrados no presente estudo, tanto para o grupo de pacientes quanto para controles estão de acordo com estudos publicados recentemente que dosaram essa mesma adipocina em pacientes portadores de Crohn e participantes saudáveis, tabelas S1 e S3, (Bannerman *et al.*, 2001; Kamiris *et al.*, 2006; Frivolt *et al.*, 2018; Rodrigues *et al.*, 2012; Trejo-Vazquez *et al.*, 2018; Y. Nishi *et al.*, 2005). Da mesma forma, a calprotectina se encontra em conformidade com os valores de referência utilizados na prática clínica e na literatura (Naismith *et al.*, 2014), tabela S5. O fator gênero não modificou os níveis de leptina sérica em pacientes portadores de Crohn. Apesar de apresentar uma mediana de 10,70 ng/mL para o sexo feminino enquanto para o sexo masculino uma mediana de 4,90 ng/mL, o valor de $p = 0,108$, indica que

não há diferença estatística, tabela 2. No mesmo sentido, no grupo controle a concentração de leptina sérica também foi maior para o sexo feminino com 17,75 ng/mL e para o sexo masculino 2,20 ng/mL, entretanto apresenta o valor de $p = 0,328$, também não indicando diferença estatística, tabelas 3.

Tabela 2. Dados dos pacientes e níveis de leptina e calprotectina. Níveis de leptina sérica e calprotectina fecal em pacientes portadores de doença de Crohn.

	<i>n</i>	Leptina (ng/mL)		Calprotectina (mcg/g)	
		Mediana	Valor <i>p</i>	Mediana	Valor <i>p</i>
Sexo					
Feminino	7	10,70 (5,95 - 28,5)	0,108	115 (61 - 328)	0,162
Masculino	8	4,90 (1,45 - 9,80)		351 (203 - 939,25)	
Atividade					
DC ativa	5	8,10 (1,30 - 13,40)	0,614	514 (224 - 1231)	0,039
DC remissão	10	8,00 (3,125 - 15,35)		145,50 (59,50 - 387,50)	
Localização					
Ileocolônica	9	3,80 (2,40 - 8,10)	0,324	212 (58 - 278)	0,425
Ileal	6	12,05 (9,13 - 20,08)		428 (238 - 424)	
Forma					
Estenosante	6	4,45 (1,35 - 9,88)	0,658	138 (59,50 - 371)	0,971
Não estenosante	7	8,10 (3,35 - 19,60)		278 (169,50 - 473)	
Farmacoterapia					
Azatioprina	4	7,45 (1,33 - 15,63)	0,638	469 (371 - 801,75)	0,818
Azatioprina + infliximabe	4	9,65 (12,13 - 21,85)		560 (223 - 939,25)	
Comorbidades					
Hipertensão	2	21,65 (15,13 - 28,18)	-	304 (240 - 368)	-
Dislipidemia	3	8,60 (4,70 - 15,45)		212 (194 - 363)	

Valores em médias e medianas (intervalo primeiro quartil e terceiro quartil). O teste de *Shapiro-Wilk* avaliou a normalidade dos dados. Os dados normais foram avaliados pelo teste t. O *Mann-Whitney* foi realizado para comparar os resultados dos dados não normais (distribuição não paramétrica). $p < 0,05$ indica diferenças estatisticamente significativas.

Esse resultado está em desacordo com alguns estudos que demonstram níveis de leptina maiores para o sexo feminino (Kasacka *et al.*, 2019; Nixon Andrasson *et al.*, 2010). Essa diferença entre os níveis de leptina ainda é pouco conhecida,

entretanto, pesquisadores sugerem que a secreção de leptina pode ser controlada por hormônios sexuais ou outros fatores desconhecidos. A produção de leptina difere entre visceral e tecido adiposo subcutâneo (Liuzzi *et al.*, 1999) e é suprimida por testosterona (Luukkaa *et al.*, 1998), fornecendo uma possível explicação para as maiores concentrações séricas de leptina relatadas em mulheres em comparação com homens nos estudos publicados (Lieb *et al.*, 2009; Luukkaa *et al.*, 1998; Rubin *et al.*, 2002). A explicação para a divergência apresentada entre os resultados do presente estudo e a literatura pode ser o reduzido número de pacientes.

Tabela 3. Dados do grupo controle e níveis de leptina e calprotectina

	<i>n</i>	Leptina (ng/mL)		Calprotectina (mcg/g)	
		Mediana	Valor <i>p</i>	Mediana	Valor <i>p</i>
Sexo					
Feminino	6	17,75 (13,40 - 263)	0,328	162 (81 - 190,50)	0,287
Masculino	2	2,20 (1,80 - 2,60)		68,65 (36,98 - 100,33)	
Comorbidades					
Hipertensão	2	4,3 (2,85 - 5,75)	-	144 (138 - 150)	-
Diabetes	2	2,20 (1,80 - 2,60)		68,65 (36,98 - 100,33)	

Valores em média e medianas (intervalo primeiro quartil e terceiro quartil). O teste de *Shapiro-Wilk* avaliou a normalidade dos dados. Os dados normais foram avaliados pelo teste t. O *Mann-Whitney* foi realizado para comparar os resultados dos dados não normais (distribuição não paramétrica). $p < 0,05$ indica diferenças estatisticamente significativas.

Observa-se pela tabela 2 que os níveis de leptina sérica (mediana) entre os grupos de doença ativa (8,10 ng/mL) e remissão (8,00 ng/mL) não mostraram diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,614$). Do mesmo modo, as diferentes formas da doença parecem não apresentar influência estatisticamente significativa na concentração sérica de leptina (estenosante: 4,45 ng/mL e não estenosante não penetrante: 8,10 ng/mL, $p = 0,658$), figura 11.

Apesar da ausência de associação entre os níveis circulantes de leptina e a forma da doença, e também da presença de atividade das DII, diversos estudos têm apontado o envolvimento dessa adipocina na fisiopatologia desta condição clínica (Britta *et al.*, 2002; Sitaraman *et al.*, 2004; Frivolt *et al.*, 2018). O papel da leptina no desenvolvimento das DII é conhecido por envolver os enterócitos que constituem a mucosa intestinal (Bannerman *et al.*, 2001), a maquinaria imunológica da lâmina própria (em especial as células T) (Ballinger *et al.*, 1998), e os adipócitos mesentéricos (Karaskova *et al.*, 2021). Inicialmente, a leptina expressa é secretada em altos níveis pelos adipócitos mesentéricos inflamados comuns nas DII. A leptina se liga a receptores específicos presentes em células imunes residentes na lâmina própria e, também, nos enterócitos do cólon e do intestino delgado culminando na ativação do fator nuclear *kappa* B (NF- κ B) (Sitaraman *et al.*, 2004). Esse fenômeno induz ao dano do epitélio que recobre a mucosa intestinal, promove a apoptose de células dos vilos e criptas, indução da infiltração de neutrófilos, estimula a produção de espécies reativas do oxigênio, e regula a proliferação celular. Essas alterações na mucosa intestinal são frequentemente encontradas em biópsia de pacientes com DII, justificando a importância da leptina na fisiopatologia dessas condições (Trejo-Vazquez *et al.*, 2018). Contudo, os resultados encontrados no presente estudo encontram-se respaldados pela literatura, uma vez que alguns trabalhos mostram que os níveis séricos de leptina não apresentam diferenças em relação às características da DC e atividade da doença (Trejo-Vazquez *et al.*, 2018; Rodrigues *et al.*, 2007; De Carvalho *et al.*, 2022).

Em relação à localização da doença, apesar de observarmos um ligeiro aumento da concentração sérica de leptina na forma ileal, os dados não apresentaram diferenças significativas. Seis dos quinze pacientes apresentam a doença na região ileal com nível de leptina aproximadamente de 12,05 ng/mL enquanto que nove pacientes têm a doença ileocolônica com níveis de leptina de 3,80 ng/mL, porém com o valor de $p = 0,324$. Kredel *et al* (2019), compararam o tamanho dos adipócitos da gordura mesentérica adjacente ao intestino na doença de Crohn localizada no intestino delgado e a DC colônica. Foi possível perceber que a gordura rastejante (*creeping fat*) na DC localizada

no intestino delgado foi caracterizada por hiperplasia de adipócitos, forte infiltração de células imunes e fibrose. Por outro lado, a gordura mesentérica adjacente ao cólon não demonstrou presença de *creeping fat* nem hiperplasia e teve infiltração de células imunes menos proeminentes (Kredel *et al.*, 2019; *et al.*, 2019). Isso pode explicar os maiores níveis de leptina naqueles pacientes com a doença ileal, já que a leptina é altamente secretada pelos tecidos *creeping fat*. Mais uma vez, o número reduzido de pacientes pode ter influenciado na ausência dessa associação no presente estudo.

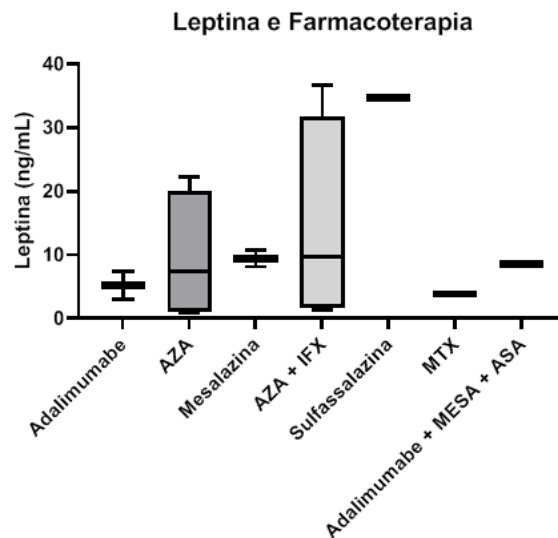


Figura 12. Níveis séricos de leptina de acordo com a farmacoterapia de pacientes com DC.

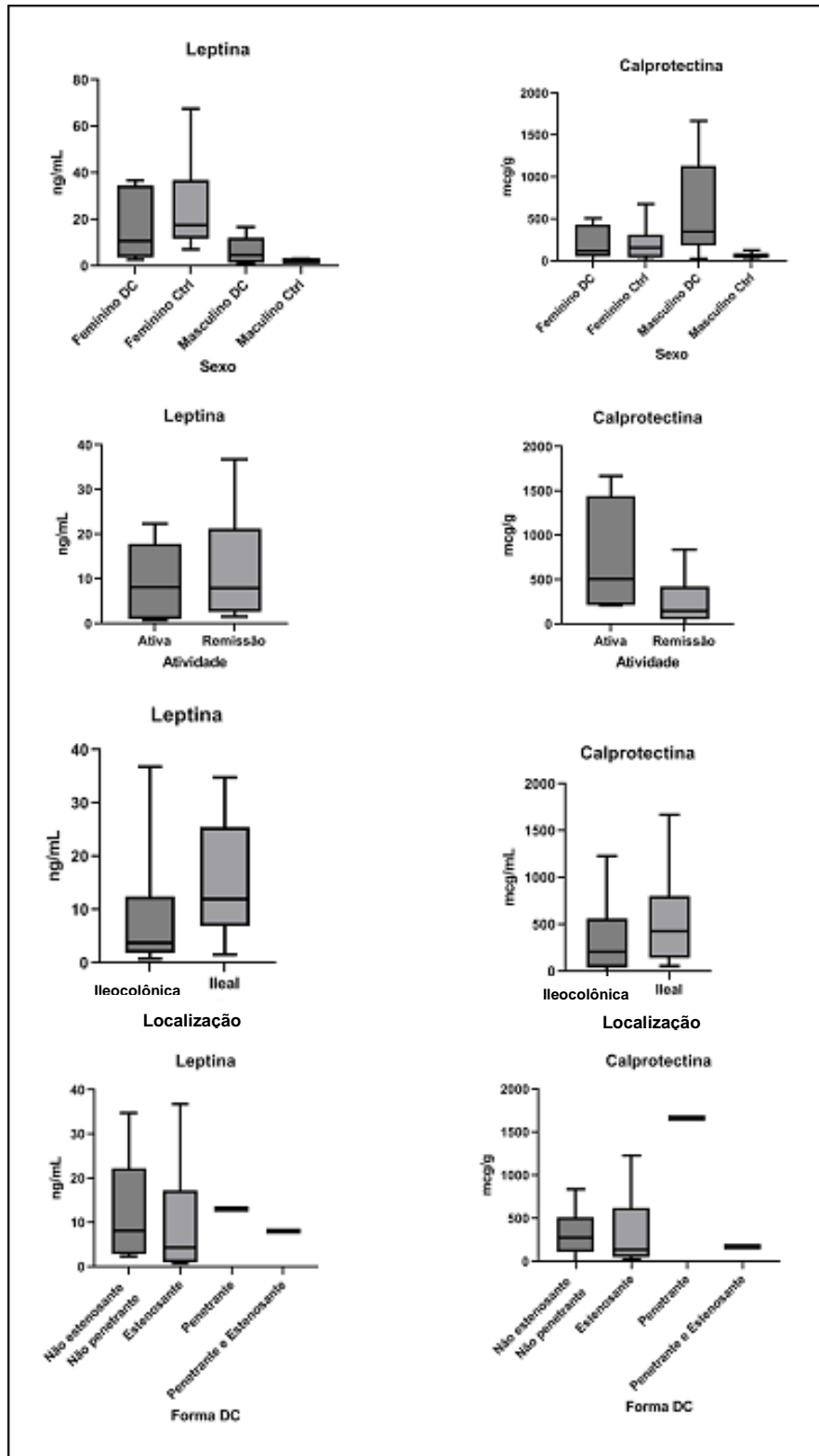


Figura 11 Níveis séricos de leptina (ng/mL) e níveis fecais de calprotectina (mcg/mL) de pacientes portadores da doença de Crohn e controles saudáveis. Dados apresentados como mediana, intervalo interquartilico, nível máximo e mínimo. **DC** = grupo de paciente com a doença de Crohn e **Ctrl** = grupo controle.

Ao analisarmos separadamente as farmacoterapias utilizadas pelos pacientes para o tratamento da doença de Crohn, não foi possível observar diferença estatisticamente significativa no nível sérico de leptina nos pacientes que utilizavam diferentes farmacoterapias (monoterapia de azatioprina 7,75 ng/mL; combinação azatioprina + infliximabe 9,65; $p = 0,638$), figura 12. Esses resultados estão de acordo com outros estudos que também avaliaram os níveis de leptina nas diferentes terapias da DC e, da mesma forma, não encontraram alteração estatística da leptina sérica (Trejo-Vazquez *et al.*, 2018; Rodrigues *et al.*, 2007).

Todavia, estudos mostraram que em condições de inflamação crônica e em modelos *in vitro* de tecido adiposo humano, a liberação de leptina é inibida pelo TNF, mas sugeriram que o efeito inibitório crônico do TNF na liberação de leptina é bloqueado pelo IFX e resulta em aumento dos níveis de leptina de maneira independente da massa gorda (Franchimont *et al.*, 2005). Outros estudos realizados tanto em camundongos quanto em seres humanos também sugeriram que, embora o TNF- α induza transitoriamente a liberação aguda de *pools* intracelulares de leptina, ele diminui a síntese de leptina durante uma inflamação crônica (Kirchgessner *et al.*, 1997; Fawcett *et al.*, 2000; Bruun *et al.*, 2002). É importante ressaltar que o aumento dos níveis de leptina foi associado a uma resposta clínica e biológica ao infliximabe e à diminuição das concentrações plasmáticas de outros mediadores regulados por TNF α , como os TNFRII e sICAM-1. (Denis *et al.*, 2005). Em relação à azatioprina, embora muito utilizada na prática clínica, são limitados os trabalhos que correlacionam o seu uso e o efeito sobre as citocinas em pacientes com DC. Todavia, um estudo de 2009 demonstrou que não houve diferença na expressão do TNF- α entre os grupos de portadores de Crohn que faziam uso de mesalazina, portadores de Crohn que faziam uso de azatioprina e controle (Moreira *et al.*, 2009). Até o momento também não há estudos que busquem avaliar o papel da azatioprina na regulação da leptina.

Os dados obtidos sobre as demais comorbidades apresentadas pelos pacientes

portadores da Doença de Crohn foram insuficientes para a realização da análise estatística devido ao reduzido número de pacientes. De modo que o único paciente portador de Doença de Crohn deste estudo, que também apresenta diabetes, demonstrou a leptina com níveis de 2,40 ng/mL, tabela S1, à medida que aqueles que possuem Crohn e concomitantemente dislipidemia apresentam 8,60 ng/mL de leptina e 21,65 ng/mL para aqueles que tinham além da DC a hipertensão. Enquanto no grupo controle, os níveis de leptina não foram influenciados pelas comorbidades dos participantes. Aqueles que eram portadores de hipertensão 4,30 ng/mL não tiveram grande diferença do nível de leptina circulante daqueles portadores de diabetes 2,20 ng/mL tabelas 3.

5.2 Níveis fecais de calprotectina no diagnóstico da doença de Crohn

Os níveis de calprotectina fecal não apresentaram diferença estatisticamente entre os sexos nos pacientes portadores de Crohn. Os resultados mostraram valores de 115 mcg/mL e 351 mcg/mL para o sexo feminino e masculino, respectivamente, $p = 0,162$, tabela 2. No que diz respeito ao grupo controle os valores encontrados foram 162 mcg/g e 68,65 mcg/g para feminino e masculino, respectivamente ($p = 0,287$), tabela 3. De maneira oposta à leptina, as características da doença de Crohn, demonstraram diferença na concentração da calprotectina. Pacientes em remissão revelaram níveis de calprotectina em torno de 145,50 mcg/g, enquanto os pacientes com a doença ativa apresentaram níveis de calprotectina de 514 mcg/g, com valor de p que indica significância estatística ($p = 0,039$), tabela 3. Esses dados estão em concordância com diversos estudos (Schoepferet *et al.*, 2008; Canani *et al.*, 2008; Langhorst *et al.*, 2008) que demonstram que a calprotectina fecal pode ser usada para avaliar de forma não invasiva a atividade da doença e está correlacionada com medidas endoscópicas, radiográficas e histológicas de inflamação (Penna *et al.*, 2020; e Schoepfer *et al.*, 2010).

Semelhante a leptina, as formas da doença também não apresentaram diferenças na alteração da concentração de calprotectina (estenosante: 138mg/g e não estenosante não penetrante: 278 mg/g; $p = 0,971$), porém sem diferença estatística significativa, figura 13. Denis *et al.* (2008) demonstraram que a calprotectina fecal traduz melhor a atividade na DC quando esta assume um comportamento eminentemente inflamatório do que quando esta apresenta um comportamento estenosante ou fistulizante.

Apesar de não ter sido observado diferenças estatisticamente significativas com relação à localização da doença, pacientes com doença na região ileal tiveram ligeiro aumento de calprotectina 428 mcg/g em comparação à 212 mcg/g para os pacientes com a doença ileocolônica ($p = 0,425$). Por outro lado, esses resultados estão em desacordo com outros estudos que mostram que os marcadores fecais da atividade da doença de Crohn, calprotectina e lactoferrina, foram mais altamente expressos no cólon do que na região ileal enquanto outros mostram que os pacientes com DC ileal podem não ter níveis de calprotectina fecal acentuadamente aumentados (Atreya *et al.*, 2021; Gecse *et al.*, 2015).

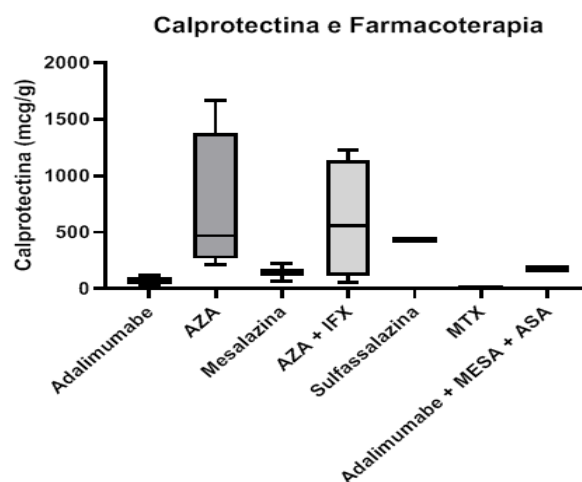


Figura 13. Níveis séricos de calprotectina de acordo com a farmacoterapia de pacientes com DC.

Observa-se pela figura 13, que os valores de calprotectina foram estatisticamente iguais para monoterapia azatioprina (469 mcg/g) e combinação

de azatioprina + infliximabe (560 mcg/g), $p = 0,818$. Um estudo recente mostrou que a calprotectina fecal se apresentou significativamente menor em pacientes em uso de monoterapia de azatioprina, indicando essa proteína como um promissor biomarcador para o monitoramento das terapias na DC (Essmann *et al.*, 2019). Contudo, o presente estudo apresenta um número reduzido de pacientes que pode ter influenciado na ausência dessa associação.

Em relação às comorbidades dos pacientes portadores de Crohn, também não foi possível a análise estatística devido ao número reduzido de pacientes e grupo controle. O único paciente que apresentava diabetes e Crohn teve o nível de calprotectina elevado, 842 mcg/g, tabela S1. Em relação à hipertensão associada à Crohn, o nível de calprotectina dos pacientes observado foi 304 mcg/g, mas também não foi observada diferença estatisticamente significativa, com os pacientes que além de Crohn, apresentavam dislipidemia (212 mcg/g), tabela 3. No grupo controle, a DC + hipertensão apresentou níveis de calprotectina fecal de 144 mcg/g, enquanto na DC + dislipidemia 68,65 mcg/g, tabela 2 e figura 12.

5.3 Níveis de leptina e calprotectina em relação aos dados antropométricos

Para a análise da influência da composição corporal nos níveis de leptina e calprotectina foi realizada a análise por correlação e teste *Spearman*. Onde foram classificadas como muito fraca aquelas correlações que apresentavam valores de 0,0 a 0,19; fraca para as que apresentavam valores de 0,2 a 0,39; moderada para valores entre 0,4 a 0,69; forte para 0,7 a 0,89 e muito forte para aquelas que apresentavam valores acima de 0,9. Os valores que apresentam sinal negativo são aqueles que tem uma relação inversamente proporcional, já aqueles valores positivos são os que apresentam correlação diretamente proporcional (Baba *et al.*, 2014).

5.3.1 Pacientes com Doença de Crohn

Observando as idades dos pacientes, nota-se que a correlação entre a leptina e idade sugere ser diretamente proporcional, ou seja, à medida que a idade do paciente aumenta, o nível de leptina também aumenta. Porém, o teste *Spearman* demonstrou um valor de 0,1644, indicando ser uma correlação muito fraca e não significativa ($p = 0,5553$). Por outro lado, a calprotectina se mostrou inversamente proporcional à idade dos pacientes, apresentando um coeficiente de *Spearman* de -0,3324, $p = 0,2246$ (correlação fraca), tabela 4.

Tabela 4. Correlação entre os níveis séricos de leptina e os níveis fecais de calprotectina com a composição corporal.

Correlação		Controle		Pacientes com DC	
		Leptina	Calprotectina	Leptina	Calprotectina
Idade	Spearman	-0,7306	-0,6228	0,1644	-0,3324
	<i>p</i> value	0,0467	0,105	0,5553	0,2246
Peso	Spearman	0,5238	0,3571	0,6107	-0,2036
	<i>p</i> value	0,1966	0,3894	0,0178	0,4657
Percentual de gordura	Spearman	0,8095	0,2381	0,6286	-0,2286
	<i>p</i> value	0,0218	0,5821	0,0141	0,4114
Circunferência abdominal	Spearman	0,5476	0,3095	0,6607	-0,3778
	<i>p</i> value	0,171	0,4618	0,0088	0,1647

Valores 0,0 a 0,19 = correlação muito fraca; 0,2 a 0,39 = correlação fraca; 0,4 a 0,69 = correlação moderada; 0,7 a 0,89 = forte; acima de 0,9 = correlação muito forte. Valores positivos = correlação diretamente proporcional; valores negativos = correlação inversamente proporcional.

Ao compararmos o peso dos pacientes e os níveis de leptina, podemos observar que eles apresentam uma correlação moderada (*Spearman* = 0,6107), e apresentando correlação estatisticamente significativa ($p = 0,0178$). Em contrapartida, a calprotectina indica uma correlação fraca e inversamente proporcional ao peso dos pacientes (*Spearman* = -0,2036, $p = 0,4657$), tabela 4. Em relação à composição de gordura corporal, aqueles com o percentual de gordura acima de 29,99% apresentaram níveis maiores de leptina, 29,5 ng/mL, ao passo que aqueles que apresentaram o percentual de gordura entre 10 - 19,99% mostraram um nível mais baixo de leptina sérica (2,9 ng/mL), tabela 2. Na análise de correlação realizada o coeficiente *Spearman* apresentou 0,6286, indicando uma correlação moderada entre o nível de leptina e a gordura corporal de forma diretamente proporcional ($p = 0,0141$). A calprotectina não apresentou valores estatisticamente diferentes quando relacionada ao percentual de gordura corporal, tabela 4. Isso se confirma com o teste *Spearman* que apresenta um valor de -0,2286 ($p = 0,4114$), indicando uma fraca correlação, inversamente proporcional, tabela 4.

A circunferência abdominal também parece exercer uma alteração da concentração de leptina. Os pacientes portadores de Crohn que apresentavam a circunferência abdominal maiores, entre 90-99 cm, apresentaram o nível de leptina maior (10,35 ng/mL) em comparação aos pacientes que tinham a circunferência abdominal entre 70-79 cm (2,10 ng/mL). O teste de *Spearman* indica uma correlação moderada (0,6607) e diretamente proporcional, com correlação estatisticamente significativa ($p = 0,0088$). Por outro lado, os valores de calprotectina mostram indiferentes com a circunferência abdominal (tabela 4), apresentando uma correlação fraca (*Spearman* = -0,3778, $p = 0,1647$), com ausência de diferença estatística. Os gráficos representados na figura 14 ilustram a correlação entre os níveis de leptina e calprotectina com a composição corporal dos pacientes com DC.

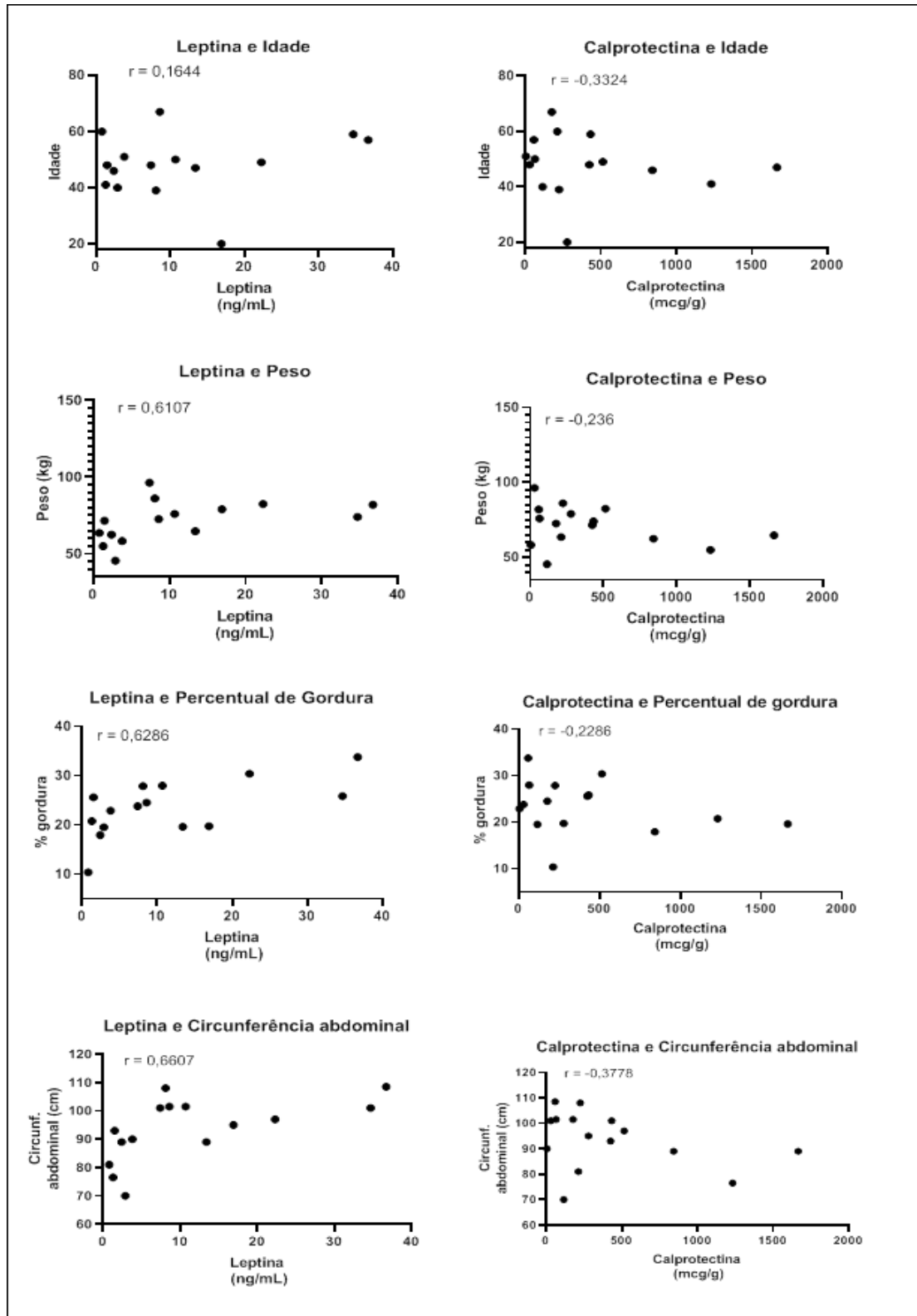


Figura 14. Perfil de leptina e calprotectina de acordo com a idade e composição corporal de pacientes com a doença de Crohn. Coeficiente de correlação não paramétrico através do teste *Spearman*. (r) representa o coeficiente de *Spearman*: quando negativo, significa relação inversamente proporcional; quando positivo, relação diretamente proporcional.

5.3.2 Grupo controle

No grupo controle, a correlação entre a leptina e idade é inversamente proporcional, ou seja, à medida que a idade do paciente aumenta, o nível de leptina diminui (Figura 15). O teste *Spearman* demonstrou um valor de $-0,7306$ ($p = 0,047$), indicando ser uma correlação forte, tabela 4. Para a calprotectina, o teste *Spearman* mostrou um valor de $-0,6228$ ($p = 0,105$) sugerindo uma correlação inversamente proporcional, moderada e sem associação estatisticamente significativa, tabelas 4.

Já em relação ao peso dos participantes do grupo controle e os níveis de leptina, podemos observar que eles apresentam uma correlação moderada (*Spearman* = $0,5238$), mas sem correlação estatisticamente significativa ($p = 0,197$). De forma semelhante, a calprotectina apresenta uma correlação fraca (*Spearman* = $0,3751$) e também sem correlação significativa ($p = 0,3894$), tabela 4.

Ao compararmos a composição de gordura corporal no grupo controle, notamos uma forte correlação no nível de leptina (*Spearman* = $0,8595$) estatisticamente significativa ($p = 0,0218$), indicando que, quanto maior a gordura corporal, maior será o nível de leptina. Analisando a calprotectina, essa apresenta uma fraca associação com a gordura corporal no grupo controle sem associação significativa (*Spearman* = $0,2381$, $p = 0,5821$), tabela 4.

Por fim, a leptina ao ser comparada com a circunferência abdominal no grupo controle apresenta fraca associação (*Spearman* = $0,5476$, $p = 0,171$). Da mesma forma, a calprotectina também apresenta fraca correlação com a circunferência abdominal (*Spearman* = $0,3095$, $p = 0,4618$), tabela 4. Os gráficos com a ilustração de correlação entre calprotectina e leptina com a composição corporal no grupo controle estão na figura 15.

Ao analisarmos a leptina em relação à composição corporal dos participantes

do estudo, pode-se notar que ela foi influenciada positivamente em todos os parâmetros (peso, percentual de gordura e circunferência abdominal) analisados tanto no grupo controle quanto no grupo de pacientes portadores de Crohn. Não foi possível mostrar alguma relação da leptina sérica com a idade no grupo dos pacientes. Contudo, o grupo controle apresentou uma relação inversa entre a idade e leptina sérica, indicando que, quanto maior a idade, menor a concentração de leptina observada nesse grupo.

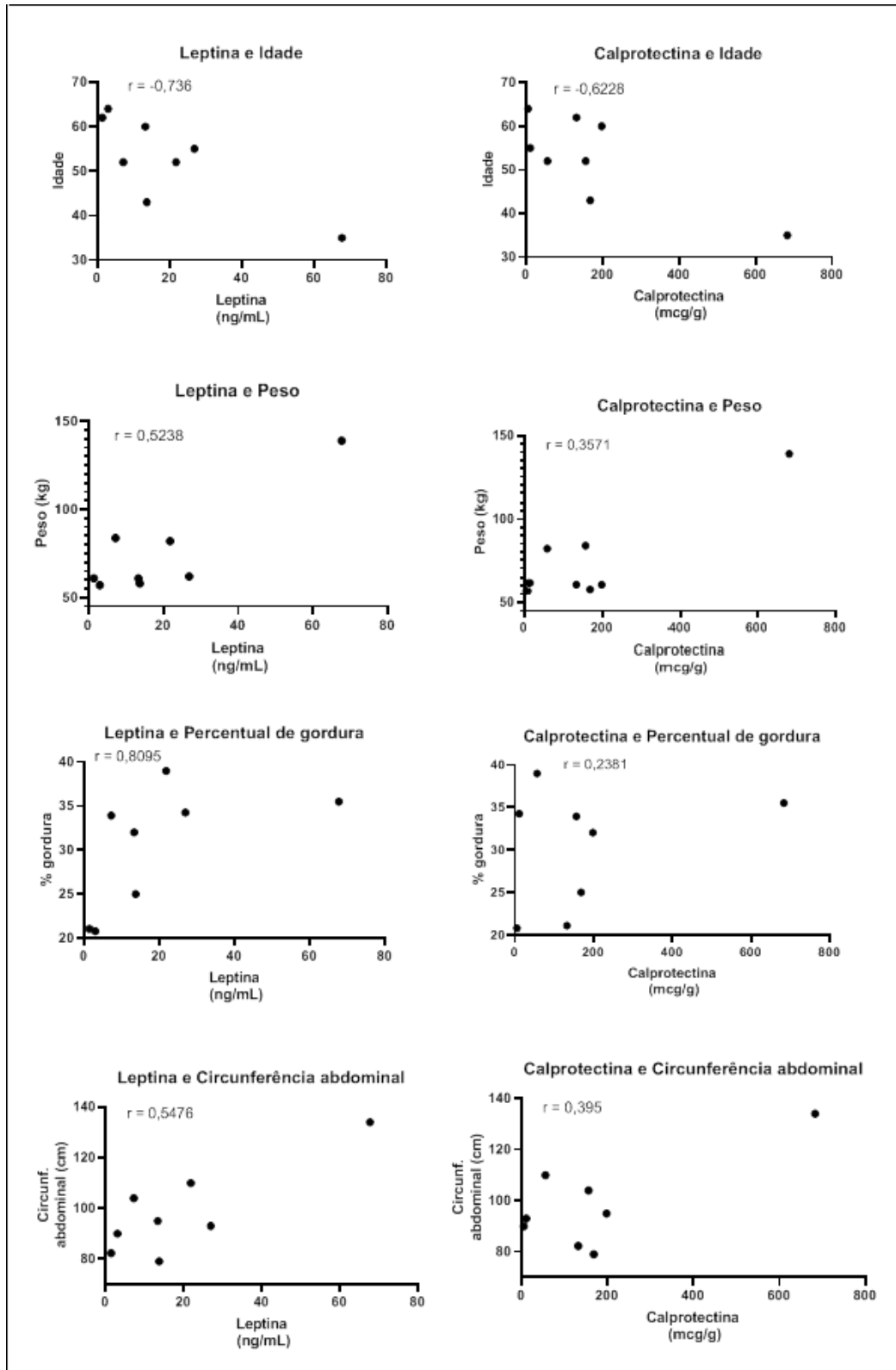


Figura 15. Perfil de leptina a calprotectina de acordo com a idade e composição corporal do grupo controle. Coeficiente de correlação não paramétrico através do teste *Spearman*.

(r) representa o coeficiente de *Spearman*. (r) representa o coeficiente de *Spearman*: quando negativo, significa relação inversamente proporcional; quando positivo, relação diretamente proporcional.

O nível de leptina no corpo humano depende de parâmetros antropométricos, como índice de massa corporal (IMC), peso, idade ou sexo, sendo estes preditores independentes das concentrações séricas de leptina (Ostlund *et al.*, 1996; Anusha *et al.*, 2017; WHO, 2004; Ganji *et al.*, 2009). Estes resultados do presente estudo estão respaldados mais uma vez pela literatura visto que estudos mostraram que embora a leptina plasmática seja associada ao percentual de gordura corporal, não está relacionada com a obesidade abdominal (aumento de tecido adiposo na região abdominal) (Ostlund *et al.*, 1996). Racette *et al* (1997), mostraram que as concentrações de leptina são altamente correlacionadas com medidas de adiposidade, incluindo IMC, massa de gordura corporal e porcentagem de gordura corporal.

Por não se tratar de uma adipocina, é esperado que a composição de gordura corporal não influencie na concentração da calprotectina fecal. Nesse sentido, o biomarcador apresentou valores contraditórios em relação aos parâmetros antropométricos, estabelecendo uma relação inversamente proporcional, porém fraca, no grupo de pacientes e uma relação direta e fraca com o grupo controle.

6 LIMITAÇÕES

Este trabalho apresenta algumas limitações. Principalmente pelo número reduzido de participantes no estudo, onde a estimativa inicial era de aproximadamente 60 pacientes. Isso aconteceu por alguns motivos. Primeiro, diante do momento pandêmico em que nos encontramos desde o início do ano de 2020, todos os procedimentos e estudos realizados em ambiente hospitalar foram prejudicados. Desse modo, este projeto sofreu com as sucessivas restrições pelo risco de contágio pelo *Sars Cov-2*, pelo surto de gripe na cidade, pelo aumento de casos positivos de *COVID-19* e, ainda, pelo surgimento da nova variante *Ômicron*, o que provocou grande apreensão na população. Seguido disso, o aumento de casos de gripe causada pelo vírus influenza *H3N2* também afastou os pacientes do ambiente hospitalar e provocou muitas desistências na participação do estudo. Frente a essas ocorrências, as coletas foram suspensas algumas vezes a fim evitar a exposição da equipe de pesquisa e também dos pacientes aos vírus circulantes na cidade (*Sars Cov-2* e influenza). Segundo, as coletas deveriam acontecer em jejum de, no mínimo, 8 horas. Os pacientes que participaram do estudo, fazem acompanhamento da doença no Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG, no período da tarde. Por conseguinte, as coletas não poderiam ser realizadas no momento da consulta médica. Sendo necessário o retorno dos pacientes ao hospital apenas para a realização da doação de amostras para o estudo. Por esse motivo, muitos pacientes desistiram ou não aceitaram participar da pesquisa, por não poderem comparecer à coleta por questões de mobilidade, trabalho ou estudo e isso contribuiu para uma amostra pequena no estudo. Terceiro, o presente estudo foi bem criterioso na seleção de participantes a fim de descartar ao máximo as interferências nos níveis de calprotectina fecal e leptina sérica, o que também contribuiu para um número baixo de pacientes aptos a participar do estudo.

Dentre as limitações estão também a qualidade das correlações encontradas entre os parâmetros avaliados neste trabalho, que foi majoritariamente fraca e,

em sua maioria, não mostrou evidência estatística. Isso também pode ter sido influenciado pelo número limitado de participantes.

Um outro fator limitador do presente estudo foi o método utilizado para definição da atividade da doença. Os pacientes tiveram suas atividades determinadas por um método clínico e não padrão, isso pode influenciar de maneira negativa o real diagnóstico da atividade da inflamação em que o paciente apresenta no momento.

7 CONCLUSÕES

- 1- Os níveis de leptina sérica assim como de calprotectina fecal não se mostraram influenciados para pelo gênero em pacientes portadores de Crohn, tão pouco no grupo controle;
- 2- Os resultados mostraram que tanto a calprotectina quanto a leptina tiveram baixa especificidade e seletividade para diferenciar as formas da doença de Crohn;
- 3- Com relação ao estágio da doença, apenas a calprotectina mostrou ser eficiente na diferenciação de doença ativa de doença em remissão;
- 4- A leptina correlacionou-se positivamente com os parâmetros antropométricos e apresentou níveis aumentados nos pacientes com maior percentual de gordura corporal.

8 PERSPECTIVAS

- Realizar um estudo com um número maior de pacientes e controles.
- Realizar um estudo prospectivo comparativo da avaliação endoscópica e determinação conjunta da leptina sérica e calprotectina fecal.
- Estratificar o estágio da doença com os seus respectivos tratamentos.
- Analisar se a leptina tem potencial para marcador de atividade da doença ou de diagnóstico da doença.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALFREDSSON J, WICK MJ. 'Mechanism of fibrosis and stricture formation in Crohn's Disease'. Scand J Immunol. 2020.
2. AL-QASSAB, H., et al. "Dominant Role of the p110 β Isoform of PI3K over p110 α in Energy Homeostasis Regulation by POMC and AgRP Neurons". Cell Metabolism.343–354, 2009.
3. ANGRIMAN, I., SCARPA, M., D'INCÀ, R., BASSO, D., RUFFOLO, C. POLESE, L., STURNIOLO, G. C., D'AMICO, D. F., & PLEBANI, M. "Enzymes in feces: Useful markers of chronic inflammatory bowel disease". In Clinica Chimica Acta. 63–68, 2007.
4. ANIEL, D., & ODOLSKY, K. P. "Inflammatory Bowel Disease". New England Journal of Medicine. 2002.
5. ANUSHA K., HETTIARATCHI U. P. K., ATHITHTHAN L. V., PERERA P. P. R. "Inter-relationship of serum leptin levels with selected anthropometric parameters among a non-diabetic population: a cross-sectional study". Eat. Weight Disord. 551-556, 2017.
6. APARICIO, T., KERMORGANT, S., DARMOUL, D., GUILMEAU, S., HORMI, K., MAHIEU-CAPUTO, D., & LEHY, T. "Leptin and Ob-Rb receptor isoform in K., human digestive tract during fetal development". Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 6177–6184, 2005.
7. ATREYA R, SIEGMUND B. "Location is important: differentiation between ileal and colonic Crohn's disease". Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology. 544-558, 2021.
8. ATTOUB, S., LEVASSEUR, S., BUYSE, M., GOI, N., LAIGNEAU, J., MOIZO, L., HERVATIN, F., MARCHAND-BRUSTEL, Y. LE, MIGUEL LEWIN, J. M., & BADO, A. "Physiological Role of Cholecystikinin B/Gastrin Receptor in Leptin Secretion". Endrocnology. 4406-4410, 1999.
9. BRUUN JM, PEDERSEN SB, KRISTENSEN K, RICHELSEN B. "Effects of pro-inflammatory cytokines and chemokines on leptin production in human adipose tissue *in vitro*". Molecular Cellular Endocrinology. 91-99, 2002.
10. BABA, R. K., VAZ, M. S. M. G., & DA COSTA, J. "Agrometeorological data correction using statistical methods". Revista Brasileira de Meteorologia 515-526, 2014.
11. BADMAN M, FLIER JS. "The gut and energy balance: visceral allies in the obesity wars". Science. 1909-1914, 2005.

12. BALLINGER, A., KELLY, P., HALLYBURTON, E., BESSER, R., & FARTHING, M. "Plasma leptin in chronic inflammatory bowel disease and HIV: implications for the pathogenesis of anorexia and weight loss". In *Clinical Science*, 1998.
13. BANNERMAN, E., DAVIDSON, I., CONWAY, C., CULLEY, D., ALDHOUS, M. C., GHOSH, S. "Altered subjective appetite parameters in Crohn's disease patients". *Clinical Nutrition*. 399–405, 2001.
14. BERNELL O, LAPIDUS A, HELLERS G. "Risk factors for surgery and postoperative recurrence in Crohn's disease". *Annals of Surgery*. 38-45, 2000.
15. BELL-ANDERSON K.S., J.M. BRYSON. "Leptin as a potential treatment for obesity: progress to date", *Treatments in Endocrinology*. 11–18, 2004.
16. BENCHIMOL, E. I., FORTINSKY, K. J., GOZDYRA, P., VAN DEN HEUVEL, M., VAN LIMBERGEN, J., & GRIFFITHS, A. M. "Epidemiology of pediatric inflammatory bowel disease: A systematic review of international trends". *Inflammatory Bowel Diseases*. 423–439, 2011.
17. BHAGAT, S., & DAS, K. M. "A shared and unique peptide in the human colon, eye, and joint detected by a monoclonal antibody". *Gastroenterology*. 103–108, 1994.
18. BOJRBAEK, C., UOTANI, S., DA SILVA, B., & FLIER, J. S. "Divergent Signaling Capacities of the Long and Short Isoforms of the Leptin Receptor". *Journal of Biological Chem*. 1997.
19. BRENNER, D. J., HALL, E. J., & PHIL, D. "Computed Tomography-An Increasing Source of Radiation Exposure". *New England Journal of Medicine*. 2007.
20. BRITTA, S., HANS ANTON, L., & GIAMILA, F. "Leptin: A pivotal mediator of intestinal inflammation in mice". *Gastroenterology*. 2011–2025, 2002.
21. CANANI RB, TERRIN G, RAPACCIUOLO L, MIELE E, SIANI MC, PUZONE C, COSENZA L, STAIANO A, TRONCONE R. "Faecal calprotectin as reliable non-invasive marker to assess the severity of mucosal inflammation in children with inflammatory bowel disease". *Digestive Liver Disease*. 547-553, 2008.
22. FRANCHIMONT D., ROLAND S., GUSTOT T., QUERTINMONT E., TOUBOUTI Y., GERVY M.C., DEVIERE J., VAN GOSSUM A. "Impact of Infliximab on Serum Leptin Levels in Patients with Crohn's Disease". *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 3510–3516, 2005.
23. DHALIWAL A, ZEINO Z, TOMKINS C, CHEUNG M, NWOKOLO C, SMITH S, HARMSTON C, ARASARADNAM RP. "Utility of faecal calprotectin in inflammatory bowel disease (IBD): what cut-offs should we apply?" *Frontline Gastroenterol*. 14-19, 2014.

24. CONSIDINE RV, SINHA MK, HEIMAN ML, KRIAUCIUNAS A, STEPHENS TW, NYCE MR, OHANNESIAN JP, MARCO CC, MCKEE LJ, BAUER TL. "Serum Immunoreactive Leptin Concentration in Normal-Weight and Obese Humans". *New England Journal of Medicine*. 334:292–95., 1996.
25. COSNES J, CATTAN S, BLAIN A, BEAUGERIE L, CARBONNEL F, PARC R, GENDRE JP. "Long-term evolution of disease behavior of Crohn's disease". *Inflammatory Bowel Disease*. 244-50, 2002.
26. COSTA, F., MUMOLO, M. G., CECCARELLI, L., BELLINI, M., ROMANO, M. R., STERPI, C., RICCHIUTI, A., MARCHI, S., & BOTTAI, M. "Calprotectin is a stronger predictive marker of relapse in ulcerative colitis than in Crohn's disease". *Gut*. 364–368, 2005.
27. DE CARVALHO LGF, LIMA WG, COELHO LGV, CARDOSO VN, FERNANDES SOA. "Circulating Leptin Levels as a Potential Biomarker in Inflammatory Bowel Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis". *Inflammatory Bowel Disease*. 169-181, 2021.
28. DENIS MA, REENAERS C, FONTAINE F, BELAICHE J, LOUIS E. "Assessment of endoscopic activity index and biological inflammatory markers in clinically active Crohn's disease with normal C- reactive protein serum level". *Inflamm Bowel Disease*. 1100-110, 2008.
29. DE SOUZA, G. N., DRAGHI, P. F., & YONAMINE, G. H. "Oral and enteral nutrition therapy in inflammatory bowel diseases among the pediatric population: A literature review". *Revista Paulista de Pediatria*. 2020.
30. DESAI, D., FAUBION, W. A., & SANDBORN, W. J. "Review article: Biological activity markers in inflammatory bowel disease". In *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 247-255, 2007.
31. DI SPIEZIO, A., SANDIN, E. S., DORE, R., MÜLLER-FIELITZ, H., STORCK, S. E., BERNAU, M., MIER, W., OSTER, H., JÖHREN, O., PIETRZIK, C. U., LEHNERT, H., & SCHWANINGER, M. "The LepR-mediated leptin transport across brain barriers controls food reward". *Molecular Metabolism*. 13–22, 2018.
32. DOBRZANSKI, C., PEDERSEN, N., VOXEN HANSEN, V., FUGLSANG H., LENNERT, L. V., & MUNKHOLM, P. "P483 Faecal calprotectin exhibits diurnal variation in Inflammatory bowel disease patients but is not affected by time of day". *Journal of Crohn's and Colitis*. S268, 2014.
33. DOBRZANSKI, C., PEDERSEN, N., VOXEN HANSEN, V., FUGLSANG, H., LENNERT, L. V., & MUNKHOLM, P. "P483 Faecal calprotectin exhibits diurnal variation in Inflammatory bowel disease patients but is not affected by time of day". *Journal of Crohn's and Colitis*. S268, 2014.
34. DULAI, P. S., SINGH, S., VANDE CASTEELE, N., BOLAND, B. S., RIVERA-NIEVES, J., ERNST, P. B., ECKMANN, L., BARRETT, K. E., CHANG, J. T.,

- SANDBORN, W. J. "Should We Divide Crohn's Disease Into Ileum-Dominant and 2634–2643, 2019.
35. FAGERBERG UL, LÖÖF L, MERZOUG RD, HANSSON LO, FINKEL Y. "Fecal calprotectin levels in healthy children studied with an improved assay". *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 468-72, 2003.
 36. FAKHOURY, M., NEGRULJ, R., MOORANIAN, A., & AL-SALAMI, H. "Inflammatory Bowel disease: Clinical aspects and treatments". *Journal of Inflammation Research*. 113–120, 2014.
 37. FAWCETT RL, WAECHTER AS, WILLIAMS LB, ZHANG P, LOUIE R, JONES R, INMAN M, HUSE J, CONSIDINE RV. "Tumor necrosis factor- alpha inhibits leptin production in subcutaneous and omental adipocytes from morbidly obese humans". *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*. 530-535, 2000.
 38. FINK, C., KARAGIANNIDES, I., BAKIRTZI, K., & POTHOUKAKIS, C. "Adipose tissue and inflammatory bowel disease pathogenesis". *Inflammatory Bowel Diseases*. 1550–1557, 2012.
 39. FRANCHIMONT D, ROLAND S, GUSTOT T, QUERTINMONT E, TOUBOUTI Y, GERVY MC, DEVIERE J, VAN GOSSUM A. "Impact of infliximab on serum leptin levels in patients with Crohn's disease". *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*. 3510-3516, 2005.
 40. FREEMAN HJ. "Application of the Vienna Classification for Crohn's disease to a single clinician database of 877 patients". *Canadian Journal of Gastroenterology*. 89-93, 2001.
 41. FREEMAN HJ. "Application of the Montreal classification for Crohn's disease to a single clinician database of 1015 patients". *Canadian Journal Gastroenterology*. 363-366, 2007.
 42. FRIVOLT, K., SCHWERD, T., SCHATZ, S. B., FREUDENBERG, F., PRELL, C., WERKSTETTER, K. J., BUFLER, P., & KOLETZKO, S. "Hyperadiponectinemia during Infliximab Induction Therapy in Pediatric Crohn Disease". *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 915–919, 2018.
 43. FROSCH M, METZE D, FOELL D, VOGL T, SORG C, SUNDERKÖTTER C, ROTH J. "Early activation of cutaneous vessels and epithelial cells is characteristic of acute systemic onset juvenile idiopathic arthritis". *Experimental Dermatology*. 259-265, 2005.
 44. GANJI V, KAFAI MR, MCCARTHY E. "Serum leptin concentrations are not related to dietary patterns but are related to sex, age, body mass index, serum triacylglycerol, serum insulin, and plasma glucose in the US population. *Nutrition & Metabolism*. 2-13, 2009.
 45. GASCHE, C., SCHOLMERICH, TJ., BRYNSKOV, J., HANAUER, S. B., JAN IRVINE, E., JEWELL, D. P., RACHMILEWITZ, D., SACHAR, D. B., SANDBORN,

- W. J., & SUTHERLAND, L. R. "A Simple Classification of Crohn's I Disease: Report of the Working-Party for the World-congresses of Gastroenterology". Vienna, 1998.
46. GAYA DR, MACKENZIE JF. "Fecal calprotectin: a bright future for assessing disease activity in Crohn's disease". *Quarterly Journal of Medicine*. 557-558, 2002.
 47. GAYA, D. R., LYON, T. D. B., DUNCAN, A., NEILLY, J. B., HAN, S., HOWELL, J., LIDDELL, C., STANLEY, A. J., MORRIS, A. J., & MACKENZIE, J. F. "Faecal calprotectin in te assessment of Crohn's disease activity". *Monthly Journal of the Association of Physicians*.435–441, 2005.
 48. GECSE KB, BRANDSE JF, VAN WILPE S, LÖWENBERG M, PONSIOEN C, VAN DEN BRINK G, D'HAENS G. "Impact of disease location on fecal calprotectin levels in Crohn's disease". *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 841-847, 2015.
 49. GECSE, K. B., & VERMEIRE, S. "Differential diagnosis of inflammatory bowel disease: imitations and complications". *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*. 644-653, 2018.
 50. GISBERT, J. P., BERMEJO, F., PÉREZ-CALLE, J. L., TAXONERA, C., VERA, I., MCNICHOLL, A. G., ALGABA, A., LÓPEZ, P., LÓPEZ-PALACIOS, N., CALVO, M., GONZÁLEZ-LAMA, Y., CARNEROS, J. A., VELASCO, M., MATAÉ, J. Fecal calprotectin and lactoferrin for the prediction of inflammatory bowel disease relapse. *Inflammatory Bowel Diseases*. 1190–1198, 2009.
 51. GISBERT, J. P., & MCNICHOLL, A. G. "Questions and answers on the role of fecal calprotectin as a biological marker in inflammatory bowel disease". *Digestive and Liver Disease*. 56–66, 2009.
 52. GONÇALVES, P., MAGRO, F., & MARTEL, F. (2015). "Metabolic inflammation in inflammatory bowel disease: Crosstalk between adipose tissue and bowel". *Inflammatory Bowel Diseases*. 453–467, 2015.
 53. GRAHAM M. LORD, G. M. K. H. R. J. B. S. R. B. & R. I. L. "Leptin modulates the T-cellimmune response andreverses starvation- inducedimmunosuppression". *Nature* © Macmillan Publishers. 394, 1998.
 54. HABR-GAMA, A., THADEU SCHIMIDT CERSKI, C., PAULO TEIXEIRA MOREIRA, J., MÁRCIO CASERTA, N. G., OLIVEIRA JÚNIOR, O., & EDUARDO ALONSO ARAÚJO. "Doença de Crohn intestinal: manejo". *Revista da Associação Médica Brasileira*, 11-13, 2011.
 55. HACIOGLU A, ALGIN C, PASAOGLU O, PASAOGLU E, KANBAK G. "Protective effect of leptin against ischemia-reperfusion injury in the rat small intestine". *BMC Gastroenterol*. 5:37, 2005.

56. HALL EJ, BRENNER DJ. "Cancer risks from diagnostic radiology". *British Journal of Radiology*. 362-378, 2008.
57. HANAUER, S. B., & STRÖMBERG, U. "Oral pentasa in the treatment of active Crohn's disease: A meta-analysis of double-blind, placebo-controlled trials". *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 379–388, 2004.
58. HARVEY, R. F., & BRADSHAW, J. M. "A Simple Index of Crohn's Disease Activity". *The Lancet*, 315(8167), 514, 1980.
59. IGLESIAS-REY, M., BARREIRO-DE ACOSTA, M., CAAMAÑO-ISORNA, F., RODRÍGUEZ, I. V., FERREIRO, R., LINDKVIST, B., GONZÁLEZ, A. L., & DOMINGUEZ-MUNOZ, J. E. "Psychological factors are associated with changes in the health-related quality of life in inflammatory bowel disease". *Inflammatory Bowel Diseases*. 92–102, 2014.
60. JAWOREK J, BONIOR J, KONTUREK SJ, BILSKI J, SZLACHCIC A, PAWLIK WW. "Role of leptin in the control of postprandial pancreatic enzyme secretion". *Journal of Physiology and Pharmacology*. 591-602, 2003.
61. JENKINS, D., BALSITIS, M., DIXON, M. F., GILMOUR, H. M., SHEPHERD, N. A., THEODOSSI, A., & WILLIAMS, G. T. Guidelines for the initial biopsy diagnosis of suspected chronic idiopathic inflammatory bowel disease. The British Society of Gastroenterology Initiative. In *Journal of Clinical Pathology*. 93–105, 1997.
62. JOHNE B, FAGERHOL MK, LYBERG T, PRYDZ H, BRANDTZAEG P, NAESS-ANDRESEN CF, DALE I. "Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin". *Journal of Molecular Pathology*. 113-23, 1997.
63. JUDD, T. A., DAY, A. S., LEMBERG, D. A., TURNER, D., & LEACH, S. T. "Update of fecal markers of inflammation in inflammatory bowel disease". *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 1493–1499, 2011.
64. KARMIRIS K, KOUTROUBAKIS IE, XIDAKIS C, POLYCHRONAKI M, VOUDOURI T, KOUROUMALIS EA. "Circulating levels of leptin, adiponectin, resistin, and ghrelin in inflammatory bowel disease". *Inflammatory Bowel Disease*. 100-105, 2006.
65. KALLEL, L., AYADI, I., MATRI, S., FEKIH, M., MAHMOUD, N. BEN, FEKI, M., KAROUI, S., ZOUARI, B., BOUBAKER, J., KAABACHI, N., & FILALI, A. "Fecal calprotectin is a predictive marker of relapse in Crohn's disease involving the colon: A prospective study". *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 340–345, 2010.
66. KARASKOVA E, VELGANOVA-VEGHOVA M, GERYK M, FOLTENOVA H, KUCEROVA V, KARASEK D. "Role of Adipose Tissue in Inflammatory Bowel Disease". *International Journal of Sciences*. 2021.

67. KARRASCH, T., & SCHAEFFLER, A. "Adipokines and the role of visceral adipose tissue in inflammatory bowel disease". *Annals of Gastroenterology*. 424–438, 2016.
68. KASACKA, I., PIOTROWSKA, Ż., NIEZGODA, M., & ŁEBKOWSKI, W. "Differences in leptin biosynthesis in the stomach and in serum leptin level between men and women". *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 1922–1928, 2019.
69. KELSEN J, BALDASSANO RN. "Inflammatory bowel disease: the difference between children and adults". *Inflammatory Bowel Diseases*. 2008 Oct;14 Suppl 2:S9-11, 2008. Erratum in: *Inflammatory Bowel Diseases*. 1438-1447, 2009.
70. KIM, S. H., JANG, S. H., KIM, J. W., KIM, B. G., LEE, K. L., KIM, Y. S. "Serum Adipocytokine Levels as Surrogate Markers for Disease Activity of Crohn's Disease". *The American Journal of the Medical Sciences*. 439–444, 2017.
71. KIRCHGESSNER TG, UYSAL KT, WIESBROCK SM, MARINO MW, HOTAMISLIGIL GS. "Tumor necrosis factor-alpha contributes to obesity-related hyperleptinemia by regulating leptin release from adipocytes". *Journal of Clinical Investigation*. 2777-2782, 1997.
72. KOPYLOV, U., YUNG, D. E., ENGEL, T., AVNI, T., BATTAT, R., BEN-HORIN, S., PLEVRIS, J. N., ELIAKIM, R., & KOULAOUZIDIS, A. "Fecal calprotectin for the prediction of small-bowel Crohn's disease by capsule endoscopy: A systematic review and meta-analysis". *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 137–1144, 2016.
73. KORN, T., BETTELLI, E., OUKKA, M., & KUCHROO, V. K. "IL-17 and Th17 cells". In *Annual Review of Immunology*. 485–517, 2009.
74. KOTZE, P. G., SHEN, B., LIGHTNER, A., YAMAMOTO, T., SPINELLI, A., GHOSH, S., & PANACCIONE, R. "Modern management of perianal fistulas in Crohn's disease: Future directions". *Gut*. 1181–1194, 2018.
75. KREDEL LI, JÖDICKE LJ, SCHEFFOLD A, GRÖNE J, GLAUBEN R, ERBEN U, KÜHL AA, SIEGMUND B. "T-cell Composition in Ileal and Colonic Creeping Fat - Separating Ileal from Colonic Crohn's Disease". *Journal Crohn's and Colitis*. 79-91, 2019.
76. KRUIS T, BATRA A, SIEGMUND B. "Bacterial translocation - impact on the adipocyte Compartment". *Front Immunol*. 510, 2014.
77. KURTZMAN, D. J. B., JONES, T., LIAN, F., & PENG, L. S. "Metastatic Crohn's disease: A review and approach to therapy". *Journal of the American Academy of Dermatology*. 804–813, 2014.
78. LANGHORST J, ELSENBURCH S, MUELLER T, RUEFFER A, SPAHN G, MICHALSEN A, DOBOS GJ. "Comparison of 4 neutrophil-derived proteins in

- feces as indicators of disease activity in ulcerative colitis". *Inflammatory Bowel Diseases*. 1085-1091, 2005.
79. LANGHORST J, ELSENBURCH S, KOELZER J, RUEFFER A, MICHALSEN A, DOBOS GJ. "Noninvasive markers in the assessment of intestinal inflammation in inflammatory bowel diseases: performance of fecal lactoferrin, calprotectin, and PMN-elastase, CRP, and clinical indices". *American Journal of Gastroenterology*. 162-169, 2008.
 80. LANGNER, C., MAGRO, F., DRIESSEN, A., ENSARI, A., MANTZARIS, G. J., VILLANACCI, V., BECHEANU, G., BORRALHO NUNES, P., CATHOMAS, G., FRIES, W., JOURET-MOURIN, A., MESCOLI, C., DE PETRIS, G., RUBIO, C., A. SHEPHERD, N. A., VIETH, M., ELIAKIM, R., & GEBOES, K. "The v histopathological approach to inflammatory bowel disease: A practice guide". 511-527, 2014.
 81. LAPPAS M, YEE K, PERMEZEL M, RICE GE. "Sulfasalazine and BAY 11-7082 interfere with the nuclear factor-kappa B and I kappa B kinase pathway to regulate the release of proinflammatory cytokines from human adipose tissue and skeletal muscle *in vitro*". *Endocrinology*. 1491-1497, 2005.
 82. LIEB W, SULLIVAN LM, HARRIS TB, ROUBENOFF R, BENJAMIN EJ, LEVY D., FOX CS, WANG TJ, WILSON PW, KANNEL WB, VASAN RS. "Plasma leptin levels and incidence of heart failure, cardiovascular disease, and total mortality in elderly individuals". *Diabetes Care*. 612-616, 2009.
 83. LIN JF, CHEN JM, ZUO JH, YU A, XIAO ZJ, DENG FH, NIE B, JIANG B. "Meta-analysis: fecal calprotectin for assessment of inflammatory bowel disease activity". *Inflammatory Bowel Diseases*. 1407-1415, 2014.
 84. LIUZZI A, SAVIA G, TAGLIAFERRI M, LUCANTONI R, BERSELLI ME, PETRONI ML, DE MEDICI C, VIBERTI GC. "Serum leptin concentration in moderate and severe obesity: relationship with clinical, anthropometric and metabolic factors." *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1066-1073, 1999.
 85. LUNDBERG JO, HELLSTROM PM, FAGERHOL MK, WEITZBERG E, ROSETH AG. "Technology Insight: Calprotectin, Lactoferrin, and Nitric Oxide as New Markers of Inflammatory Bowel Disease." *Nature Clinical Practice Gastroenterology Hepatology*. 96-102, 2005.
 86. LOUIS E, COLLARD A, OGER AF, DEGROOTE E, ABOUL NASR EL YAFI FA, BELAICHE J. "Behaviour of Crohn's disease according to the Vienna classification: changing pattern over the course of the disease". *Gut*. 777-782, 2001.
 87. LUUKKAA V, PESONEN U, HUHTANIEMI I, LEHTONEN A, TILVIS R, TUOMILEHTO J, KOULU M, HUUPPONEN R. "Inverse correlation between serum testosterone and leptin in men". *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 3243-3246, 1198.

88. MACHADO M.B., VIEIRA A., STEINWURZ F., VASCONCELOS M.I.L., ZALTMAN C., QUINTILIANO PMENDES, GRANDE T.D. “Estudo quantitativo e qualitativo sobre a vida do paciente com DII no Brasil. Associação Brasileira de Colite Ulcerativa e Doença de Crohn (ABCD)”. *Guideline Jornada do Paciente com Doença Inflamatória Intestinal*, 2017.
89. MAO R, KURADA S, GORDON IO, BAKER ME, GANDHI N, MCDONALD C, COFFEY JC, RIEDER F. “The Mesenteric Fat and Intestinal Muscle Interface: Creeping Fat Influencing Stricture Formation in Crohn's Disease”. *Inflammatory Bowel Disease*. 421-426, 2019.
90. MARQUES-OLIVEIRA, G. H., SILVA, T. M., LIMA, W. G., VALADARES, H. M. S., & CHAVES, V. E. “Insulin as a hormone regulator of the synthesis and release of leptin by white adipose tissue”. *Peptides*. 106, 49–58, 2018.
91. MASUZAKI, H; OGAWA, Y.; SAGAWA, N; HOSODA, K; MATSUMOTO, T.; MISE, H; NISHIMURA, H; YOSHIMASA, Y.; TANAKA, ME. MORI, T. “Leptin production in non-adipose tissue: Leptin as a new placenta- derived hormone in humans”. *Nature Publishing Group*. 1029-1033, 1997.
92. MOREIRA, A. P. P., COY, C. S. R. “Estudo comparativo das expressões de TNF-alfa, IL1-beta e IL-8 na mucosa ileal de portadores da Doença de Crohn em uso de mesalazina ou azatioprina”. *Biblioteca Digital Brasileira de Tese e Dissertações*. 68, 2009.
93. MORTON NM, EMILSSON V, LIU YL, CAWTHORNE MA. “Leptin action in intestinal cells”. *Journal of Biological Chemistry*. 26194-26201, 1998.
94. Mota, L. G., Rodrigues, Cardoso, V.N., Coelho, L.G.N.V., C. J. S., Siqueira, C.F., Martin-Comin, J., Ferrari, M.R.A., Fernandes, S.O.A. “Avaliação da atividade inflamatória na doença de Crohn utilizando leucócitos autólogos marcados com tecnécio-99m-hexametilpropileno amina oxima”. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de Minas Gerais. 2007.
95. MOWAT, C., COLE, A., WINDSOR, A., AHMAD, T., ARNOTT, I., DRISCOLL, R., MITTON, S., ORCHARD, T., RUTTER, M., YOUNGE, L., LEES, C., HO, G. T., SATSANGI, J., & BLOOM, S. “Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults”. *Gut*. 571–607, 2011.
96. MÜNZBERG, H., & MORRISON, C. D. “Structure, production and signaling of leptina”. *Metabolism: Clinical and Experimental*. 13–23, 2015.
97. NAISMITH, G. D., SMITH, L. A., BARRY, S. J. E., MUNRO, J. I., LAIRD, S., RANKIN, K., MORRIS, A. J., WINTER, J. W., & GAYA, D. R. “A prospective evaluation of the predictive value of faecal calprotectin in quiescent Crohn's disease”. *Journal of Crohn's and Colitis*. 1022–1029, 2014.
98. NG, S. C., SHI, H. Y., HAMIDI, N., UNDERWOOD, F. E., TANG, W., BENCHIMOL, E. I., PANACCIONE, R., GHOSH, S., WU, J. C. Y., CHAN, F. K.L., SUNG, J. J. Y., & KAPLAN, G. G. “Worldwide incidence and prevalence of

inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *The Lancet*. 2769–2778, 2017.

99. NIXON ANDRASSON, A., JERNELV, S., SZULKIN, R., UNDN, A. L., BRISMAR, K., & LEKANDER, M. "Associations between leptin and self-rated health in men and Women". *Gender Medicine*. 261–269, 2010.
100. OSTLUND RE JR, YANG JW, KLEIN S, GINGERICH R. "Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age, and metabolic covariates". *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 3909–3913, 1996.
101. OZ HS, CHEN T, DE VILLIERS WJ. "Green Tea Polyphenols and Sulfasalazine have Parallel Anti-Inflammatory Properties in Colitis Models". *Front Immunology* 2013 Jun 5;4:132,2013.
102. PALAMARAS, I., EL-JABBOUR, J., PIETROPAOLO, N., THOMSON, P., MANN, S., ROBLES, W., & STEVENS, H. "Metastatic Crohn's disease: a review". *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 1033–1043, 2008.
103. PARACCHINI, V., PEDOTTI, P., & TAIOLI, E. "Genetics of leptin and obesity: A HuGE review". *American Journal of Epidemiology*. 101–114, 2005.
104. PARENTE F, MACONI G, BOLLANI S, ANDERLONI A, SAMPIETRO G, CRISTALDI M, FRANCESCHELLI N, BIANCO R, TASCHIERI AM, BIANCHI PORRO G. "Bowel ultrasound in assessment of Crohn's disease and detection of related small bowel strictures: a prospective comparative study versus x ray and intraoperative findings". *Gut*. 490-5, 2002.
105. PARENTE F, MACONI G, BOLLANI S, ANDERLONI A, SAMPIETRO G, CRISTALDI M, FRANCESCHELLI N, BIANCO R, TASCHIERI AM, BIANCHI PORRO G. "Bowel ultrasound in assessment of Crohn's disease and detection of related small bowel strictures: a prospective comparative study versus x ray and intraoperative findings". *Gut*. 490-5, 2002.
106. PENNA FGC, ROSA RM, PEREIRA FH, CUNHA PFS, SOUSA SCS, FERRARI TCA, CARA C, FERRARI MLA. "Combined evaluation of fecal calprotectin and C-reactive protein as a therapeutic target in the management of patients with Crohn's disease". *Gastroenterology & Hepatology*. 87-95, 2020.
107. PETERSON, B. J., & FRY, B. "Handbook of the Birds of. In Europe, the Middle East and North Africa". *Nature*. 1998.
108. PEYRIN-BIROULET, L., CHAMAILLARD, M., GONZALEZ, F., BECLIN, E., DECOURCELLE, C., ANTUNES, L., GAY, J., NEUT, C., COLOMBEL, J. F., & DESREUMAUX, P. "Mesenteric fat in Crohn's disease: A pathogenetic hallmark or an innocent bystander?". *Gut*. 577–583, 2007.

109. PIOVANI, D., DANESE, S., PEYRIN-BIROULET, L., NIKOLOPOULOS, G. K., LYTRAS, T., & BONOVAS, S. "Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Diseases: An Umbrella Review of Meta-analyses". *Gastroenterology*. 647-659, 2019.
110. PLEVY, S., SILVERBERG, M. S., LOCKTON, S., STOCKFISCH, T., CRONER, L., STACHELSKI, J., BROWN, M., TRIGGS, C., CHUANG, E., PRINCEN, F., & SINGH, S. "Combined serological, genetic, and inflammatory markers differentiate Non-IBD, Crohn's disease, and ulcerative colitis patients". *Inflammatory Bowel Diseases*, 1139–1148, 2013.
111. POULLIS A, FOSTER R, NORTHFIELD TC, MENDALL MA. "Review article: faecal markers in the assessment of activity in inflammatory bowel disease". *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 675-81, 2002.
112. POULLIS A, FOSTER R, SHETTY A, FAGERHOL MK, MENDALL MA. "Bowel inflammation as measured by fecal calprotectin: a link between lifestyle factors and colorectal cancer risk". *Cancer Epidemiology Biomarkers Prev.* 279-284, 2004.
113. RACETTE SB, KOHRT WM, LANDT M, HOLLOSZY JO. "Response of serum leptin concentrations to 7 d of energy restriction in centrally obese African Americans with impaired or diabetic glucose tolerance". *American Journal of Clinical Nutrition*. 33–37, 1997.
114. RADON et al. "Contact with farm animals in early life and juvenile inflammatory bowel disease: A case-control study". *Pediatrics*. 354–361, 2007.
115. RAGUSO C, MCCULLOUGH AJ. "Leptin and gastrointestinal tract". *Curr Opin in Gastroenterology*. 160-165, 2000.
116. RAMMES, A., ROTH, J., GOEBELER, M., KLEMPT, M., HARTMANN, M., & SORG, "Myeloid-related Protein (MRP) 8 and MRP14, Calcium-binding Proteins of the S100 Family, are Secreted by Activated Monocytes via a Novel Tubulin-dependent Pathway". *Journal of Biological Chemistry*. 9496–9502, 1997.
117. RIEDER, F., ZIMMERMANN, E. M., REMZI, F. H., & SANDBORN, W. J. "Crohn's disease complicated by strictures: A systematic review". *Gut*. 1072–1084, 2013.
118. RING BD, SCULLY S, & DAVIS C. "Systemically and topically administered leptin both accelerate wound healing in diabetic ob/ob mice". *Endocrinology*. 141–146, 2000.
119. RODRIGUES, V. S., MILANSKI, M., FAGUNDES, J. J., TORSONI, A. S., AYRIZONO, M. L. S., NUNEZ, C. E. C., DIAS, C. B., MEIRELLES, L. R., DALAL, S., COY, C. S. R., VELLOSO, L. A., & LEAL, R. F. "Serum levels and mesenteric fat tissue expression of adiponectin and leptin in patients with Crohn's disease". *Clinical and Experimental Immunology*. 358–364, 2012.

120. ROSETH AG, FAGERHOL MK, AADLAND E, SCHJONSBY H. "Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in feces. A methodologic study". *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 793-798, 1992.
121. RUBIN, R. T., RHODES, M. E., & CZAMBEL, R. K. "Sexual diergism of baseline plasma leptin and leptin suppression by arginine vasopressin in major depressives and matched controls. *Psychiatry Research*. 255–268, 2002.
122. SAMITZ, MH. "Cutaneous lesions of the lower limbs in the diagnosis of systemic disease". *Journal of the American Pediatric Association*. 556–567, 1975.
123. SARRAF P, FREDERICH RC, TURNER EM, Ma G, JASKOWIAK NT, RIVET DJ 3rd, FLIER JS, LOWELL BB, FRAKER DL, ALEXANDER HR." Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: potential role in inflammatory anorexia". *Journal of Experimental of Medicine*. 171-175, 1997.
124. SCHOEPFER AM, BEGLINGER C, STRAUMANN A, TRUMMLER M, VAVRICKA SR, AND BRUEGGER LE, SEIBOLD F. "Fecal calprotectin correlates more closely with the Simple Endoscopic Score for Crohn's disease (SES-CD) than CRP, blood leukocytes, and the CDAI". *American Journal of Gastroenterology*. 162-169, 2010.
125. SCHOEPFER AM, TRUMMLER M, SEEHOLZER P, SEIBOLD- SCHMID B, SEIBOLD F. "Discriminating IBD from IBS: comparison of the test performance of fecal markers, blood leukocytes, CRP, and IBD antibodies". *Inflammatory Bowel Disease*. 32-39, 2008.
126. SIPPONEN T, KOLHO KL. "Faecal calprotectin in children with clinically quiescent inflammatory bowel disease". *Scand J Gastroenterol*. 872-877, 2010.
127. SITARAMAN, X. LIU, L. CHARRIER, L.H. GU, T.R. ZIEGLER, A. GEWIRTZ, D. MERLIN. "Colonic leptin: source of a novel proinflammatory cytokine involved in IBD." *FASEB J*. 18:696–8, 2004.
128. SANDS, B. E. "From symptom to diagnosis: clinical distinctions among various forms of intestinal inflammation". *Gastroenterology*. 1518–1532, 2004.
129. SCHWARTZ, D. A., LOFTUS, E. V., TREMAINE, W. J., PANACCIONE, R., HARMSSEN, W. S., ZINSMEISTER, A. R., & SANDBORN, W. J. "The natural history of fistulizing Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota". *Gastroenterology*. 875–880, 2002.
130. SILVERBERG 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". *Canadian Journal of Gastroenterology*. 2005.
131. STALLMACH, A., HAGEL, S., & BRUNS, T. "Adverse effects of biologics used for treating IBD". *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 167–182, 2010.

132. STANGE, E. F., TRAVIS, S. P. L., VERMEIRE, S., BEGLINGER, C., KUPCINSKAS, L., GEBOES, K., BARAKAUSKIENE, A., VILLANACCI, V., VON HERBAY, A., WARREN, B. F., GASCHÉ, C., TILG, H., SCHREIBER, S. W., SCHÖLMEIRICH, J., & REINISCH, W. "European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis". *Gut*. 1-15 2006.
133. STANGE et al. "Effect of leptin on healing of colonic anastomoses in rats". *Hepatogastroenterology*. 994-997, 2004.
134. SUBRAMANIAN, S., EKBOM, A., & RHODES, J. M. "Recent advances in clinical practice: A systematic review of isolated colonic Crohn's disease: The third IBD?" *Gut*. 362-381, 2017.
135. SUKHOTNIK, I., HELOU, H., LURIE, M., KHATEEB, K., BEJAR, J., CORAN, A. G., MOGILNER, J. G., & SHILONI, E. "The effect of leptin on intestinal recovery following ischemia-reperfusion injury in a rat". *Pediatric Surgery International*. 473-478, 2007.
136. TERHEGGEN G, LANYI B, SCHANZ S, HOFFMANN RM, BÖHM SK, LEIFELD L, POHL C, KRUIS W. "Safety, feasibility, and tolerability of ileocolonoscopy in inflammatory bowel disease". *Endoscopy*. 656-663, 2008.
137. TARTAGLIA et al. "Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R". *Cell*. 1263-1271, 1995.
138. THIA, K. T., SANDBORN, W. J., HARMSSEN, W. S., ZINSMEISTER, A. R., & LOFTUS, E. V. "Risk factors associated with progression to intestinal complications of Crohn's disease in a population-based cohort". *Gastroenterology*. 1147-1155, 2010.
139. TIBBLE, J. A., SIGTHORSSON, G., BRIDGER, S., FAGERHOL, M. K., & BJARNASON, I. "Surrogate markers of intestinal inflammation are predictive of relapse in patients with inflammatory bowel disease". *Gastroenterology*. 15-2, 2000.
140. TIBBLE, J. A., SIGTHORSSON, G., FOSTER, R., FORGACS, I., & BJARNASON, I. Use of surrogate markers of inflammation and Rome criteria to distinguish organic from nonorganic intestinal disease. *Gastroenterology*. 450-460, 2002.
141. TIBBLE, J., TEAHON, K., THJODLEIFSSON, B., ROSETH, A., SIGTHORSSON, G., BRIDGER, S., FOSTER, R., SHERWOOD, R., FAGERHOL, M., & BJARNASON, I. "A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease". *Gut*. 506-513, 2000.
142. TORRES, J., MEHANDRU, S., COLOMBEL, J. F., & PEYRIN-BIROULET, L. Crohn's disease. *The Lancet*. 1741-1755, 2017.

143. TREJO-VAZQUEZ, et al. "Positive association between leptin serum levels and disease activity on endoscopy in inflammatory bowel disease: A case-control study". *Experimental and Therapeutic Medicine*. 3336–3344, 2018.
144. TRIANTAFILLIDIS, J. K., MERIKAS, E., & GEORGOPOULOS, F. "Current and emerging drugs for the treatment of inflammatory bowel disease". *Drug Design, Development and Therapy*. 185–210, 2011.
145. VERMEIRE S, VAN ASSCHE G, RUTGEERTS P. "The role of C- reactive protein as an inflammatory marker in gastrointestinal diseases." *Nature Clinical Practice Gastroenterology Hepatology*. 580–586, 2005.
146. VILLANACCI, V., & WARREN, B. F. "European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Definitions and diagnosis". *Journal of Crohn's and Colitis*. 1–23, 2008.
147. VAVRICKA, S. R., SCHOEPFER, A., SCHARL, M., LAKATOS, P. L., NAVARINI, A., & ROGLER, G. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. In *Inflammatory Bowel Diseases*. 1982–1992, 2015.
148. VERMEIRE, S., ASSCHE, G. VAN, & RUTGEERTS, P. "C-Reactive Protein as a Marker for Inflammatory Bowel Disease". 2004.
149. VICTORIA, C. R., SASSAKI, L. Y., RUBENS, H., & NUNES, C. "Taxas de incidência e prevalência de doenças inflamatórias intestinais. Centro-Oeste do Estado de São Paulo, Brasil". *Arquivos de Gastroenterologia*. 2009.
150. VOGANATSI A, PANYUTICH A, MIYASAKI KT, MURTHY RK. "Mechanism of Extracellular release of human neutrophil calprotectin complex". *Journal of Leukocyte Biology*. 130-134, 2001.
151. VON ROON AC, KARAMOUNTZOS L, PURKAYASTHA S, REESE GE, DARZI AW, TEARE JP, PARASKEVA P, TEKKIS PP. "Diagnostic precision of fecal calprotectin for inflammatory bowel disease and colorectal malignancy". *Am J Gastroenterol*. 803-813, 2007.
152. WALSHAM, N. E., & SHERWOOD, R. A. "Fecal calprotectin in inflammatory bowel disease". *Clinical and Experimental Gastroenterology*. 21–29, 2016.
153. WANG et al. "Direct and Indirect Induction by 1,25-Dihydroxyvitamin D3 of the NOD2/CARD15-Defensin β 2 Innate Immune Pathway Defective in Crohn Disease". *Journal of Biological Chemistry*. 2227–2231, 2010.
154. WILLIAMS DR, COLLER JA, CORMAN ML, NUGENT FW, VEIDENHEIMER MC. "Anal complications in Crohn's disease". *Diseases of Colon & Rectum*. 22-24, 1981.
155. WHO EXPERT CONSULTATION. Appropriate body-mass index for Asian populations and its implications for policy and intervention strategies. *Lancet*. 157-63, Jan 2004. Erratum in: *Lancet*. Mar 2004.

- 156.Y. NISHI Y, ISOMOTO H, UENO H, OHNITA K, WEN CY, TAKESHIMA F, MISHIMA R, NAKAZATO M, KOHNO S. "Plasma leptin and ghrelin concentrations in patients with Crohn's Disease". World Journal of Gastroenterology. 7314-7317, 2005.
- 157.YOON KIM HS, CHOI SK, REW JS. "Leptin-induced adhesion and invasion in colorectal cancer cell lines". Oncology Reports. 2493-2498, 2014.
- 158.ZULIAN A, CANCELLO R, RUOCCO C, GENTILINI D, DI BLASIO AM, DANELLI P, MICHELETTO G, CESANA E, INVITTI C. "Differences in visceral fat and fat bacterial colonization between ulcerative colitis and Crohn's disease. An *in vivo* and *in vitro* study". PLoS One. 2013.

10 APÊNDICE

10.1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Prezado (a) Senhor (a),

Estamos lhe convidando para participar da pesquisa: **“Leptina circulante como potencial biomarcador na doença de Crohn”**, a ser desenvolvida na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, sob responsabilidade da Professora Simone Odília Antunes Fernandes e de sua estudante Larissa Gabriela Ferreira de Carvalho.

Você está sendo convidado como participante da pesquisa porque você foi diagnosticado com doença de Crohn. O diagnóstico para essa doença ainda é muito difícil. Por isso, estamos estudando biomarcadores como leptina, que é uma proteína (substância) presente no sangue, e a calprotectina, que também é uma proteína, presente nas fezes, para fazer com que outras pessoas possam ser diagnosticadas mais facilmente se tiverem a doença de Crohn.

Se você concordar em participar deste estudo, deverá fornecer uma amostra de suas fezes em um potinho coletor que será fornecido pela equipe de pesquisa, e levá-la ao Hospital das Clínicas da UFMG no dia combinado com a equipe. Nesse mesmo dia, iremos também coletar uma amostra de 10mL de sangue, que será coletada em um tubo com ajuda de uma agulha e seringa descartáveis, para isso, você precisará fazer um jejum anterior de 8 horas. Você também passará por uma avaliação nutricional por uma profissional nutricionista. Também vamos acessar seu prontuário para conhecermos um pouco mais sobre seus exames e tratamentos realizados até aqui. As amostras de sangue e as informações que coletarmos do prontuário, também serão codificadas e não serão reveladas a ninguém, exceto à equipe de pesquisa.

Os riscos dessa pesquisa incluem você sentir um desconforto de uma picadinha e o local onde foi inserida a agulha ficar roxo. Porém, a coleta será feita por uma equipe qualificada, o que diminuirá a chance de dor e hematomas. Você pode sentir desconforto devido ao jejum, mas não se preocupe, no final da coleta será fornecido um lanche custeado pela equipe de pesquisa. Você também poderá sentir-se constrangido com o fornecimento da amostra de fezes, porém você mesmo fará a coleta em casa e ao receber o frasco com o material, iremos identificá-lo com códigos para preservar sua identidade.

Ao concordar em participar da pesquisa, solicitamos que autorize a coleta, transporte, armazenamento, utilização e descarte das amostras de sangue e fezes, que serão levadas ao Laboratório de Radioisótopos, sala 4026 na Faculdade de Farmácia, onde ficarão temporariamente armazenados por 5 anos em freezer sob a responsabilidade do pesquisador. O material será utilizado nesta pesquisa e se você permitir, em pesquisas futuras, mas você será consultado novamente, com outro TCLE para a nova pesquisa, para consentir. Pedimos que assinale uma das opções abaixo:

() Concordo que o meu material biológico seja utilizado somente para esta pesquisa.

() Concordo que o meu material biológico possa ser utilizado em outras pesquisas, mas serei comunicado pelo pesquisador novamente e assinarei outro termo de consentimento livre e esclarecido que explique para que será utilizado o material.

Os dados que obtivermos na pesquisa em nenhuma hipótese vão identificar você pessoalmente. Os resultados obtidos pela pesquisa, a partir de seu material biológico, estarão à sua disposição quando finalizada. Você não terá nenhum custo para participar da pesquisa e nem receberá qualquer vantagem financeira e tem garantido o direito de se recusar a participar ou se retirar do estudo a qualquer momento sem prejuízos ao seu atendimento médico, valendo a desistência a partir da data de formalização. Caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, o Sr. (a) tem assegurado o direito à indenização.

Se tiver qualquer dúvida, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável, Professora Simone Odília Antunes Fernandes (Campus UFMG Pampulha, Av. Antônio Carlos, 6627 - Faculdade de Farmácia, sala 4146 - (31) 34096893, simoneodilia@yahoo.com.br). A pesquisadora se compromete a obedecer os termos da Resolução CNS 446-12. A pesquisa foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP/UFMG), que também poderá ser consultada em caso de questões éticas (Campus UFMG Pampulha, Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005 - (31) 3409-4592, coep@prpq.ufmg.br).

Se estiver esclarecido quanto aos seus direitos como participante da pesquisa, solicitamos que assine o consentimento abaixo, em duas vias, sendo que uma ficará em sua posse e a outra, conosco.

AUTORIZAÇÃO

Eu, _____, portador (a) do documento de identidade nº _____ fui informado (a) dos objetivos do estudo e aceito participar da pesquisa **“Leptina circulante como um potencial biomarcador na doença de Crohn”**, realizada na Universidade Federal de Minas Gerais, sob responsabilidade da Professora Simone Odília Antunes Fernandes e da estudante Larissa Gabriela Ferreira de Carvalho. Declaro ter conhecimento das informações contidas neste documento e sei que minha participação é voluntária. Recebi uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas. Portanto, dou meu consentimento para a realização do estudo.

Belo Horizonte, _____ de _____ de 20____.

Assinatura do (a) participante

Assinatura da pesquisadora responsável

11 MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Dados dos pacientes DC e seus respectivos níveis de leptina e calprotectina.

Código	Idade	Fase	Forma	Localização	Farmacoterapia (DC)	Demais comorbidades	Leptina (ng/mL)	Calprotectina (mcg/g)
M3	39	Ativa	Não estenosante Não penetrante	Ileocolonica	Mesalazina	Bronquite Fibromialgia Transtornos psiquiátricos	8.10	224.0
M5	49	Ativa	Não estenosante Não penetrante	Ileal	Azatioprina	Doença ulceroça péptica Espondiloartrite axial Cefaléia crônica Dislipidemia Transtornos psiquiátricos	22.30	514.00
H3	41	Ativa	Estenosante	Ileocolonica	Azatioprina + Infliximabe	Nenhuma	1.30	1231.00
H5	47	Ativa	Penetrante	Ileal	Azatioprina	Nenhuma	13.40	1665.00
H6	60	Ativa	Estenosante	Ileocolonica	Azatioprina	Dislipidemia	0.80	212.00
M1	51	Remissão	Não estenosante Não penetrante	Ileocolonica	Metotrexato	Fibromialgia Espondilite	3.80	4.40
M2	40	Remissão	Não estenosante Não penetrante	Ileocolonica	Adalimumabe	Anemia ferropriva secundária Neurocisticercose Fibromialgia	2.90	115.00
M4	50	Remissão	Estenosante	Ileal	Mesalazina	Nenhuma	10.70	64.00
M6	59	Remissão	Não estenosante Não penetrante	Ileal	Sulfasalazina	Espondilite Hipertensão	34.70	432.00
M7	57	Remissão	Estenosante	Ileocolonica	Azatioprina + Infliximabe	Nenhuma	36.70	58.00
H1	48	Remissão	Estenosante	Ileal	Azatioprina	Deficiência B12	1.50	424.00
H2	20	Remissão	Não estenosante Não penetrante	Ileocolonica	Azatioprina + Infliximabe	Asma	16.90	278.00
H4	67	Remissão	Penetrante e Estenosante	Ileal	Adalimumabe + mesalazina + azatioprina	Hipertensão Dislipidemia	8.60	176.00
H7	48	Remissão	Estenosante	Ileocolonica	Adalimumabe	Nenhuma	7.40	29.00
H8	46	Remissão	Não estenosante Não penetrante	Ileocolonica	Azatioprina + Infliximabe	Diabetes Hipotireoidismo Hepatite autoimune Artrite Colangite Esclerose primária	2.40	842.00

Tabela S2. Dados de composição corporal dos pacientes DC e seus respectivos níveis de leptina e calprotectina.

Código	Fase	Idade	Peso (Kg)	% gordura	Circunferência abdominal	Leptina (ng/mL)	Calprotectina (mcg/g)
M3	Ativa	39	86,10	27,87	108	8.10	224.00
M5	Ativa	49	82,50	30,38	97	22.30	514.00
H3	Ativa	41	55	20,76	76,50	1.30	1231.00
H5	Ativa	47	64,80	19,62	89	13.40	1665.00
H6	Ativa	60	63,60	10,38	81	0.80	212.00
M1	Remissão	51	58,30	22,9	90	3.80	4.40
M2	Remissão	40	45,50	19,54	70	2.90	115.00
M4	Remissão	50	76	27,97	101,50	10.70	64.00
M6	Remissão	59	74,10	25,85	101	34.70	432.00
M7	Remissão	57	82	33,76	108,50	36.70	58.00
H1	Remissão	48	71,60	25,6	93	1.50	424.00
H2	Remissão	20	79	19,75	95	16.90	278.00
H4	Remissão	67	72,60	24,53	101,50	8.60	176.00
H7	Remissão	48	96,40	23,81	101	7.40	29.00
H8	Remissão	46	62,50	17,93	89	2.40	842.00

Tabela S3. Dados dos participantes do grupo controle e seus respectivos níveis de leptina e calprotectina.

Código	Idade	Comorbidades	Leptina (ng/mL)	Calprotectina (mcg/g)
CM1	55	Nenhuma	26.9	11.0
CM2	35	Nenhuma	67.7	683.0
CM3	52	Hipertensão	7.2	156.0
CM4	52	Nenhuma	21.8	56.0
CM5	60	Nenhuma	13.3	198.0
CM6	43	Nenhuma	13.7	168.0
CH1	64	Diabetes	3.0	5.3
CH2	62	Diabetes Hipertensão	1.4	132.0

Tabela S4. Dados de composição corporal dos participantes do grupo controle e seus respectivos níveis de leptina e calprotectina.

Código	Idade	Peso (Kg)	% gordura	Circunferência abdominal	Leptina (ng/mL)	Calprotectina (mcg/g)
CM1	55	62	34,25	93	26.9	11.0
CM2	35	139	35,51	134	67.7	683.0
CM3	52	83,80	33,94	104	7.2	156.0
CM4	52	82,10	38,99	110	21.8	56.0
CM5	60	60,90	32,02	95	13.3	198.0
CM6	43	58	25,01	79	13.7	168.0
CH1	64	57	20,79	90	3.0	5.3
CH2	62	61	21,09	82,3	1.4	132.0

Tabela S5. Níveis séricos de Leptina em estudos publicados.

Autor/ano	Média do nível de Leptina (ng/mL)	
	Pacientes DC	Controle saudáveis
Bannerman, 2001	28,60	9,40
Frivolt, 2018	3,20	3,60
Kamiris, 2006	12,50	15
Nishi, 2005	3,80	3,80
Rodrigues, 2012	26,3	28,90
Trejo-Vazquez, 2018	7,26	8,85
Waluga, 2014	8	16,50