

Francisco Guilherme Cancela e Penna

**“Perfil dos marcadores de atividade inflamatória intestinal e correlação com os diferentes graus de atividade endoscópica, avaliados pelo escore endoscópico simplificado na doença de Crohn (SES-CD)”.**

Universidade Federal de Minas Gerais

Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto

Belo Horizonte – MG

2017

Francisco Guilherme Cancela e Penna

**“Perfil dos marcadores de atividade inflamatória intestinal e correlação com os diferentes graus de atividade endoscópica, avaliados pelo escore endoscópico simplificado na doença de Crohn (SES-CD)”.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto,  
da Universidade Federal de Minas Gerais,  
como requisito parcial para obtenção do  
título de Doutor em Ciências Aplicadas  
à Saúde do Adulto.

Orientadora: Professora Maria de Lourdes de Abreu Ferrari

Universidade Federal de Minas Gerais

Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto

Belo Horizonte – MG

2017

Penna, Francisco Guilherme Canela e.  
P412p Perfil dos marcadores de atividade inflamatória intestinal e correlação com os diferentes graus de atividade endoscópica, avaliados pelo escore endoscópico simplificado na doença de Crohn (SES-CD) [manuscrito]: Biomarcadores para avaliação da atividade inflamatória na doença de Crohn. / Francisco Guilherme Canela e Penna. - - Belo Horizonte: 2017.  
80f.: il.  
Orientador (a): Maria de Lourdes de Abreu Ferrari.  
Área de concentração: Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto.  
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Doenças Inflamatórias Intestinais. 2. Proteína C-Reativa. 3. Doença de Crohn. 4. Mucosa Intestinal. 5. Inflamação. 6. Dissertação Acadêmica. I. Ferran, Maria de Lourdes de Abreu. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: WH 400

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697

## **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Reitor:** Prof. Jaime Arturo Ramirez

**Vice-Reitora:** Profa. Sandra Regina Goulart Almeida

**Pró-Reitora de Pós-Graduação:** Profa. Denise Maria Trombert de Oliveira

**Pró-Reitora de Pesquisa:** Prof. Ado Jório

## **FACULDADE DE MEDICINA DA UFMG**

**Diretor:** Prof. Tarcizo Afonso Nunes

**Vice-Diretor:** Prof. Humberto José Alves

**Chefe do Departamento de Clínica Médica:** Profa. Valéria Maria Augusto

## **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO**

**Coordenadora:** Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

**Subcoordenadora:** Profa. Suely Meireles Rezende

### **Colegiado**

Profa. Sarah Teixeira Camargos

Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Profa. Gilda Aparecida Ferreira

Prof. Eduardo Garcia Vilela

Prof. Paulo Caramelli

Profa. Suely Meireles Rezende

Mônica Maria Teixeira (Discente Titular)



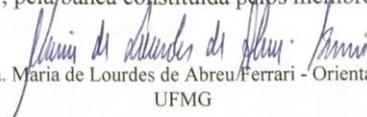
## FOLHA DE APROVAÇÃO

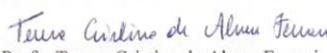
PERFIL DOS MARCADORES DE ATIVIDADE INFLAMATÓRIA INTESTINAL E CORRELAÇÃO COM OS DIFERENTES GRAUS DE ATIVIDADE ENDOSCÓPICA, AVALIADOS PELO ESCORE ENDOSCÓPICO SIMPLIFICADO NA DOENÇA DE CROHN (SES-CD)

### FRANCISCO GUILHERME CANCELA E PENNA

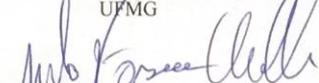
Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, como requisito para obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, área de concentração CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO.

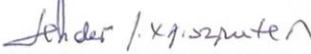
Aprovada em 26 de outubro de 2017, pela banca constituída pelos membros:

  
Prof.ª Maria de Lourdes de Abreu Ferrari - Orientadora  
UFMG

  
Prof.ª Teresa Cristina de Abreu Ferrari  
UFMG

  
Prof.ª Andreia Marja Camargos Rocha  
UFMG

  
Prof.ª Julio Maria Fonseca Chebli  
UFJF

  
Prof. Sender Jankiel Miszputen  
UNIFESP

Belo Horizonte, 26 de outubro de 2017.

## **DEDICATÓRIA:**

Dedico esta tese aos meus pais, estimuladores do meu trabalho e fonte de exemplo e inspiração. À minha amada esposa Maíra, que tanto me apoia, estimula e compreende a minha ausência. À minha pequena Luiza, que me ensinou o significado real da palavra amor e espero que compreenda futuramente os momentos em que não estive presente.

## **AGRADECIMENTOS:**

Agradeço à Professora Lourdinha, possuidora do espírito universitário, que estimula e permite o crescimento de todos ao seu redor, por ter me acolhido com muito carinho na Gastroenterologia e por acreditar no meu trabalho.

Ao Dr. Rodrigo de Macedo Rosa, que colaborou de forma brilhante com a realização das colonoscopias, com todo cuidado e zelo que lhe são peculiares.

Ao Professor Aloísio, pelo exemplo de sabedoria e dedicação ao serviço de Gastroenterologia do HC-UFMG.

À Professora Tereza, pela disponibilidade em ensinar sobre os testes diagnósticos e valiosa participação na qualificação para a defesa da tese.

À Professora Andreia Vieira, pela gentileza e colaboração durante a apresentação da qualificação, que muito contribuiu para o trabalho final.

Ao Anderson, grande amigo, sempre disponível e que muito contribuiu com a formatação final desta tese.

Aos meus familiares, sempre presentes, agradeço o apoio e estímulo.

Ao Pedro, Stella, Gabriela, Talita, funcionários e residentes do Serviço de Gastroenterologia e Endoscopia do Instituto Alfa de Gastroenterologia: agradeço a contribuição de todos, cada um à sua maneira.

Aos pacientes do Ambulatório de Intestino do HC-UFMG, pela participação nesse projeto. Espero que o fruto desse trabalho seja revertido em um melhor cuidado desses pacientes, que muito sofrem com a doença de Crohn.

Por fim, agradeço a Deus, por tudo de bom que tem me dado ao longo da vida.

**EPIÍGRAFE:**

“Hoje me sinto mais forte  
Mais feliz, quem sabe  
Só levo a certeza  
De que muito pouco sei  
Ou nada sei”

Almir Sater

## Sumário:

1. Resumo:.....	9
2. Abstract:.....	10
3. Lista de Figuras:.....	11
3.1 Artigo 1:.....	11
3.2 Artigo 2:.....	11
4. Lista de Tabelas:.....	12
4.1 Artigo1:.....	12
4.2 Artigo 2:.....	12
5. Lista de abreviaturas e siglas:.....	14
1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS:.....	17
2. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA:.....	26
3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS:.....	30
3.1 Objetivo geral: .....	30
3.2 Objetivos específicos: .....	30
4. METODOLOGIA: .....	31
4.1 Pacientes .....	31
4.2 Calprotectina fecal:.....	34
4.3 Ileocolonoscopia: .....	34
4.4 Analise estatística: .....	35
5. Artigo 1:.....	37

5.1	Introduction: .....	39
5.2	Patients and Methods:.....	40
5.2.1	Sample: .....	40
5.2.2	Clinical and Laboratory Evaluation: .....	41
5.2.3	EndoscopicEvaluation: .....	41
5.2.4	Statistics: .....	42
5.3	Results: .....	43
5.3.1	Clinical characteristics .....	43
5.3.2	Correlation between endoscopic activity index and serologic and fecal markers for inflammation.....	45
5.3.3	Determination of cut-off values for noninvasive exams:.....	48
5.4	Discussion:.....	51
5.5	REFERENCES:.....	55
6.	Artigo 2:.....	58
6.1	Introdução: .....	60
6.2	Métodos: .....	61
6.2.1	Participantes:.....	61
6.2.2	Avaliação clínica e laboratorial: .....	62
6.2.3	Avaliação endoscópica: .....	62
6.2.4	Análise Estatística: .....	62
6.3	Resultados: .....	64
6.3.1	Características clínicas dos pacientes.....	64

6.3.2	Correlação entreo índice de atividade endoscópica e a PCR e fCal: ...	66
6.3.3	Determinação de valores de corte para PCR e fCal: .....	66
6.4	Discussão:.....	70
6.5	Referências Bibliográficas.....	74
7.	ANEXOS: .....	78

## 1. Resumo:

**Introdução:** O controle eficaz do processo inflamatório na doença de Crohn (DC) se reflete na cicatrização da mucosa intestinal, objetivo atual do tratamento, resultando em menores taxas de complicações. A investigação do desempenho de marcadores clínicos, laboratoriais e da calprotectina fecal (fCal) para avaliação da atividade inflamatória; a correlação desses com o escore endoscópico simplificado (SES-CD) e a avaliação conjunta da fCal e proteína C reativa (PCR) no diagnóstico da inflamação em pacientes com DC, são objetivos deste estudo.

**Métodos:** Pacientes com DC e indicação para realizar colonoscopia foram prospectivamente incluídos e alocados segundo o grau de atividade inflamatória endoscópica em: grupo 1 – remissão; grupo 2 – atividade leve e grupo 3 – atividade moderada a grave. Os diferentes graus da atividade endoscópica foram correlacionados aos seguintes índices: o Índice de Atividade Clínica da Doença de Crohn (IADC), fCal, PCR e hemograma. O grupo controle foi formado por indivíduos submetidos à colonoscopia com indicação para rastreio de câncer colorretal e sem doença intestinal.

**Resultados:** Foram realizadas 80 colonoscopias nos pacientes com DC e 21 no grupo controle. A mediana da fCal do grupo controle (59,7mcg/g) foi inferior à dos pacientes com DC (683mcg/g,  $p < 0,001$ ) e também daqueles com DC em remissão endoscópica (236,6mcg/g,  $p = 0,019$ ). Houve correlação moderada (correlação de Spearman) entre o SES-CD e a PCR ( $r = 0,525$ ), fCal ( $r = 0,450$ ), IADC ( $r = 0,407$ ) e fraca com a contagem de plaquetas ( $r = 0,257$ ). A PCR, fCal e contagem de plaquetas foram capazes de diferenciar os pacientes com a doença em remissão endoscópica daqueles em atividade, mas apenas a fCal distinguiu os pacientes em remissão daqueles em atividade leve (236,6mcg/g x 654,9mcg/g,  $p = 0,014$ ) ou moderada a grave (236,6mcg/g x 1128,0 mcg/g,  $p < 0,001$ ). Valor de corte de fCal de 155,0 mcg/g apresenta grande sensibilidade (96%) e acurácia (78%) para diagnóstico de atividade endoscópica. A avaliação conjunta e em série da fCal e PCR apresenta especificidade de 82%. De acordo com a probabilidade de atividade inflamatória, diferentes cenários foram utilizados para avaliar o rendimento desses marcadores e um fluxograma de acompanhamento de pacientes com DC foi proposto.

**Conclusão:** A fCal apresentou a melhor acurácia diagnóstica de atividade endoscópica em pacientes com DC, moderada correlação com o SES-CD e capacidade de discriminar pacientes em remissão daqueles em atividade leve ou moderada a grave. O uso em série da fCal e PCR leva a uma maior especificidade no diagnóstico da atividade endoscópica.

## 2. Abstract:

**Introduction:** Effective control of the inflammatory process in Crohn's disease (CD) is reflected on intestinal mucosal healing, current treatment goal, resulting in less complication rates. The evaluation of the performance of clinical, laboratory, and fecal calprotectin (fCal) in inflammatory activity evaluation, as well as their correlation to the simple endoscopic score (SES-CD) and joint evaluation of fCal and serum C-reactive protein (CRP) in the diagnosis of inflammation in patients with CD, are the goals of this study.

**Methods:** Patients with CD referred for ileocolonoscopy were prospectively included and distributed according to the degree of endoscopic inflammatory activity into: group 1 – remission; group 2 – mild activity; and group 3 – moderate to severe activity. The different degrees of endoscopic activity were correlated to the following indexes: Crohn's disease activity index (CDAI), fecal calprotectin (fCal), serum C-reactive protein (CRP), and hemogram. The control group was composed of individuals referred to colorectal cancer screening without known intestinal disease.

**Results:** Eighty colonoscopies were performed in patients with CD and 21 in the control group. The control group had a lower median fCal (59.7mcg/g) than patients with CD (683mcg/g,  $p<0.001$ ) and patients with CD who were in endoscopic remission (236.6mcg/g,  $p=0.019$ ). Moderate Spearman correlation occurred between SES-CD and CRP ( $r=0.525$ ), fCal ( $r=0.450$ ), and CDAI ( $r=0.407$ ), while weak correlation was found with platelet count ( $r=0.257$ ). CRP, fCal, and platelet count were able to differentiate between patients in remission and those with mild activity; however, only fCal distinguished patients in remission from those with mild activity (236.6mcg/g x 654.9mcg/g,  $p=0.014$ ) or moderate to severe (236.6mcg/g x 1128mcg/g,  $p<0.001$ ). A fCal cut-off 155mcg/g is sensitive (96%) and accurate (78%) for diagnosis of endoscopic activity. The joint and serial evaluation of fCal and CRP has specificity of 82%. According to the probability of inflammatory activity, different scenarios were used to evaluate the performance of these markers and a follow-up algorithm of patients with CD was proposed.

**Conclusion:** Fecal calprotectin presented greatest diagnostic accuracy for endoscopic activity of patients with CD, moderate correlation to SES-CD, and capacity to discriminate patients in remission from those with mild or moderate to severe activity. Serial use of fCal and PCR leads to greater specificity in the diagnosis of endoscopic activity.

### **3. Lista de Figuras:**

Figura 1: Cartão de Índice de Atividade na Doença de Crohn para preenchimento pelo paciente.

#### **3.1 Artigo 1:**

Figure 1: ROC curves for non-invasive markers.

#### **3.2 Artigo 2:**

Figura 1: Fluxograma de acompanhamento dos pacientes com doença de Crohn a partir da probabilidade clínica de atividade da doença:

#### 4. Lista de Tabelas:

Tabela 1: Escore Endoscópico Simplificado para doença de Crohn

Tabela 2: Índice de atividade de doença de Crohn.

##### 4.1 Artigo 1:

Table 1: Clinical characteristics of patients with Crohn's disease and control group.

Table 2: Medians and 25 and 75 percentiles ( $P_{25-75}$ ) of fecal calprotectin (mcg/g) of patients with Crohn's disease as well as subgroups in remission and endoscopic activities, compared to control group.

Table 3: Value of medians of non-invasive markers of patients in endoscopic remission (SES-CD = 0-2) and those with endoscopic activity (SES-CD  $\geq$  3).

Table 4 – Values of medians and percentiles 25 and 75 ( $P_{25} - P_{75}$ ) of noninvasive markers according to degree of endoscopic activity (SES-CD).

Table 5 – Summary of results of comparison between medians of noninvasive markers according to degree of endoscopic activity (SES-CD).

Table 6: Accuracy of biomarkers.

Table 7: Sensitivity (Sens), specificity (Spec), positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) and accuracy (A) for each biomarker and their respective cut-offs and confidence intervals of 95% (CI 95%)

Table 8: Likelihood ratio for positive result (LR+), likelihood ratio for negative result (LR-) and its inverse (1/LR-), posttest odds ratio (posttest OR), and likelihood following tests (posttest L) of Crohn's disease activity for each noninvasive marker exams and their respective cut-offs.

##### 4.2 Artigo 2:

Tabela 1: Características clínicas dos pacientes com doença de Crohn

Tabela 2 – Valores das medianas da Proteína C Reativa (PCR) e Calprotectina fecal (fCal) de pacientes em remissão (SES-CD = 0-2) e atividade endoscópica (SES-CD  $\geq$  3).

Tabela 3: Acurácia da Proteína C Reativa (PCR) e Calprotectina Fecal (fcal).

Tabela 4: Sensibilidade (Sens) e especificidade (Espec) dos exames avaliados isoladamente e em conjunto.

Tabela 5 – Cenários hipotéticos de atividade da doença de Crohn e respectivos valores preditivos positivo, negativo e acurácia, com os intervalos de confiança de 95% de cada um dos exames.

## 5. Lista de abreviaturas e siglas:

DII: doenças inflamatórias intestinais;

RCU: retocolite ulcerativa;

DC: doença de Crohn;

ECCO: European Crohn's and Colitis Organisation;

IADC: Índice de atividade da doença de Crohn;

IHB: Índice de Harvey-Bradshaw

PCR: Proteína C reativa

CDEIS: Crohn's disease endoscopic index of severity

SES-CD: Simple endoscopic score for Crohn's disease

<sup>111</sup>In: Indium 111

fCal: calprotectina fecal

kDa: kilodalton

Anti-TNF-alfa: anticorpo monoclonal anti-fator de necrose tumoral alfa.

AMG: avaliação médica global.

DP: Desvio padrão.

ROC: Receiver Operating Characteristic Curve

CD: Crohn's disease

CDAI: Crohn's disease activity index

CRP: Serum C-reactive protein

SES-CD: Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease

IAG/HC/UFMG: Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais

SD: Standart deviation

P<sub>25</sub>: Percentile 25

P<sub>75</sub>: Percentile 75

A1: before 16 years of age

A2: between 17 and 40 years of age

A3: older than 40 years of age

L1: ileum

L2: colon

L3: ileocolonic

L4: upper gastrointestinal tract

B1: inflammatory

B2: stenosing

B3: penetrating

P: perianal

CI: confidence interval

Sens: Sensitivity

Spec: specificity

PPV: positive predictive value

NPV: negative predictive value

A: accuracy.

LR+: Likelihood ratio for positive result

LR-: Likelihood ratio for negative result

1/LR-: likelihood ratio in patients in remission

OR: *odds ratio*

Posttest L: Posttest likelihood of CD activity.

IAG-HC/UFMG: Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (IAG-HC/UFMG).

P<sub>25</sub>: percentil 25

P<sub>75</sub>: percentil 75

A1: antes dos 16 anos de idade

A2: entre 16 e 40 anos de idade

A3: após 40 anos de idade

L1: íleo terminal

L2: cólon

L3: íleo-colônico

L4: trato gastrointestinal superior

B1: inflamatório

B2: estenosante

B3: penetrante

P=perianal

IC 95%: intervalo de confiança de 95%

VPP: Valor preditivo positivo;

VPN: Valor Preditivo Negativo.

A: acurácia.

fCal + PCR: teste em série de fCal e PCR.

**“Perfil dos marcadores de atividade inflamatória intestinal e correlação com os diferentes graus de atividade endoscópica, avaliados pelo escore endoscópico simplificado na doença de Crohn (SES-CD)”.**

## **1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS:**

As doenças inflamatórias intestinais (DII) representadas principalmente pela retocolite ulcerativa (RCU) e doença de Crohn (DC), são doenças inflamatórias crônicas, que se originam da interação da microbiota intestinal, resposta imune exacerbada e fatores ambientais, em indivíduos geneticamente predispostos<sup>1-4</sup>.

A DC pode acometer qualquer segmento do tubo digestivo, da boca ao ânus, pode manifestar-se em outros órgãos do trato gastrointestinal, bem como, em outros sistemas do organismo<sup>5</sup>. A DC tem caráter recidivante, cursa com períodos de atividade e remissão, frequentemente manifesta-se por dor abdominal, febre, diarreia e emagrecimento e, sendo menos comum, a presença de muco e sangue nas fezes<sup>6</sup>. Acomete indivíduos de todas as idades e de ambos os sexos, sendo a maior incidência descrita na faixa de 20 a 40 anos. Está presente em todo o mundo, mas sua distribuição, tanto em incidência, quanto em prevalência não é homogênea. Apresenta grande variedade de fenótipos e não possui um exame padrão para diagnóstico. Assim, o diagnóstico baseia-se nos aspectos clínicos, laboratoriais, endoscópicos, histológicos, radiológicos, sorológicos e cirúrgicos<sup>3</sup>. A evolução clínica é variável e a atividade inflamatória crônica pode levar ao dano estrutural dos intestinos<sup>7</sup>. Cerca de 10% dos pacientes apresenta remissão prolongada livre de sintomas e, mesmo aqueles que evoluem assintomáticos, podem apresentar atividade inflamatória intestinal<sup>8</sup>. Aproximadamente metade dos pacientes é submetida a algum procedimento cirúrgico abdominal durante a vida<sup>9</sup>.

A cicatrização da mucosa em resposta à terapêutica é a meta a ser alcançada na DC. Em artigo publicado pela Organização Europeia de Crohn e Colite (ECCO) em 2011<sup>10</sup>, pacientes com mucosa intestinal cicatrizada apresentam menores taxas de recidivas clínicas, hospitalizações e necessidade de cirurgia. Dados que foram corroborados por Neurath et al<sup>11</sup> ao demonstrarem que a integridade funcional da barreira do epitélio intestinal, reduz os estímulos da luz intestinal sobre o sistema imunológico da mucosa e submucosa, com redução do processo inflamatório.

Recente metanálise publicada por Shah et al<sup>12</sup> confirma que a cicatrização da mucosa intestinal aumenta a taxa de remissão clínica sustentada em longo prazo. Entretanto, a correta abordagem terapêutica da DC visando à cicatrização de mucosa com melhora do prognóstico da doença, requer reavaliações efetivas, objetivas e regulares, devendo basear-se nos aspectos clínicos, laboratoriais, radiológicos e endoscópicos<sup>8, 13, 14</sup>.

A avaliação clínica é essencial e deve ser realizada a cada consulta, porém os sinais e sintomas observados nem sempre retratam a presença e o grau da atividade inflamatória intestinal<sup>14</sup>. A necessidade de se quantificar a resposta ao tratamento e padronizar a avaliação da atividade da doença fez com que fossem desenvolvidos escores clínicos apropriados, como o Índice de Atividade da Doença de Crohn (IADC) e o Índice Harvey-Bradshaw (IHB). O IADC publicado em 1976 avalia a atividade da doença tendo como base variáveis clínicas, laboratoriais, necessidade de uso de medicamentos sintomáticos e o bem estar do paciente<sup>15</sup>. Levaram-se em consideração oito itens que melhor atendiam aos objetivos propostos. Em 1980, Harvey e Bradshaw criaram novo escore (IHB), com o intuito de simplificar o IADC, tido como complexo para ser realizado na prática clínica<sup>16</sup>. O IHB não utiliza variáveis laboratoriais, sendo baseado apenas em critérios clínicos. Já no estudo inicial o IHB mostrou boa correlação com o IADC. Dados que foram posteriormente corroborados por outros autores<sup>17</sup>. No entanto, esses índices carregam alta subjetividade, tanto por parte do paciente que relata os sintomas quanto por parte do médico que realiza a avaliação. Impressões subjetivas podem corresponder a 40% do valor final do IADC<sup>18</sup>. Por fim, os índices clínicos apresentam baixa correlação com os escores endoscópicos<sup>19, 20</sup>. Assim, o manejo do paciente baseado apenas na avaliação clínica pode ocasionar a otimização desnecessária do tratamento ou manutenção de terapêutica insuficiente com as suas respectivas repercussões.

A dosagem sérica da proteína C reativa (PCR) tem se mostrado o exame laboratorial mais utilizado na avaliação da inflamação na DC. Trata-se de marcador de atividade inflamatória, infecção e dano tecidual, produzida quase que na sua totalidade pelo fígado por estimulação da interleucina-6. A PCR tem meia vida curta e é útil na avaliação seriada de processos inflamatórios e infecciosos<sup>21</sup>. Além disso, é amplamente disponível, por ser um teste sanguíneo facilmente realizado<sup>22</sup>. No entanto, é pouco específica, não sendo exclusiva do intestino, podendo elevar-se em qualquer processo inflamatório e infeccioso. Por outro lado, aproximadamente 15% da população não apresenta elevação desta proteína, mesmo em um quadro inflamatório vigente<sup>23</sup>.

Alterações do hemograma como anemia pode associar-se à inflamação na DC. Esta tem origem multifatorial, como anemia de doença crônica, carencial (por deficiência de vitamina B12, ácido fólico e/ou ferro), ou secundária ao efeito adverso da medicação<sup>24</sup>. O aumento na contagem de plaquetas é também marcador de atividade inflamatória e ocorre por estímulo da sua produção, induzida pela trombopoetina, que se encontra elevada em consequência ao aumento de interleucina-6<sup>3, 25</sup>. Seu aumento também pode refletir anemia ferropriva. As plaquetas participam da perpetuação do processo, uma vez que liberam mediadores pró-inflamatórios<sup>24</sup>.

A avaliação da atividade inflamatória pode também ser feita por meio dos exames seccionais de imagem do abdômen, especialmente aqueles que utilizam meios de contraste que ocasionam distensão das alças intestinais, conhecidos como enterografia, que podem ser realizados por tomografia computadorizada ou ressonância magnética. Esses exames são utilizados tanto para diagnóstico quanto para acompanhamento da atividade inflamatória intestinal e permitem avaliar as alterações na DC, quer sejam intestinais (ulcerações, fístulas, estenoses, espessamento de parede, inflamação da mucosa), vasculares (ingurgitamento de vasos mesentéricos), perianais (fistulas) ou em órgãos adjacentes (manifestações extraintestinais: colangite esclerosante primária, espondilite anquilosante)<sup>21,22</sup>. Embora sejam exames de grande utilidade por permitirem avaliação mais objetiva e ampla do trato gastrointestinal, com escores validados para quantificação da atividade inflamatória e boa correlação com os achados endoscópicos, ainda não são considerados como exames padrão<sup>26,27</sup>.

A colonoscopia continua sendo o método padrão no diagnóstico e acompanhamento dos pacientes com DC, pois permite avaliar a extensão da doença, a gravidade do processo inflamatório, a presença de complicações, bem como auxilia nos diagnósticos diferenciais, além de permitir a realização de biópsias<sup>3, 28</sup>. Os protocolos internacionais recomendam a colonoscopia, com estudo do segmento distal do íleo (ileocolonoscopia), ao diagnóstico e durante o acompanhamento para avaliação da atividade da DC. Durante o exame devem ser coletadas pelo menos duas espécimes de cada segmento examinado (íleo, cólon direito, cólon transversal, cólon esquerdo e sigmóide, reto). Estas devem ser coletadas tanto nas áreas poupadas, quanto naquelas macroscopicamente inflamadas. Em pacientes com sintomas relacionados ao trato gastrointestinal alto e em pacientes pediátricos, recomenda-se a realização de endoscopia digestiva alta<sup>14, 28</sup>. Nos casos de acometimento do intestino delgado a enteroscopia e/ou o estudo por cápsula endoscópica podem ser realizados, sendo que o primeiro

tem a vantagem de permitir a realização de biópsias e procedimentos terapêuticos. A avaliação dos espécimes de biópsia na DC caracteriza-se por processo inflamatório crônico, com linfócitos e plasmócitos, sendo este descontínuo, com áreas acometidas intercaladas por segmentos normais, sendo que a transição entre esses padrões é costumeiramente abrupta. Além da inflamação descontínua, a irregularidade de criptas e a presença de granulomas epitelióides não caseosos, embora infrequentes sejam característicos da DC. Quando há acometimento de intestino delgado, a irregularidade de vilosidades é um achado comum. No entanto, nenhum desses padrões histológicos é patognomônico da doença<sup>10, 29</sup>.

Na avaliação endoscópica é de enorme utilidade o uso de escores para a quantificação da atividade inflamatória. No final da década de 1980, um grupo francês dedicado ao estudo de doenças intestinais, desenvolveu e validou um escore endoscópico para uso em pacientes com DC, chamado Índice Endoscópico de Gravidade da Doença de Crohn, conhecido pela sigla inglesa como CDEIS. Tal índice leva em consideração a presença ou ausência de quatro tipos de lesões: úlceras superficiais, úlceras profundas, estenose ulcerada e estenose não-ulcerada. Todas essas lesões devem ser avaliadas em cada um dos cinco segmentos examinados (íleo terminal, cólon direito, cólon transverso, cólon esquerdo, reto). Além disso, as porcentagens de mucosa ileocolônica que se apresentam ulceradas e afetadas por qualquer lesão da DC devem ser avaliadas e quantificadas através de uma escala visual de gravidade, que varia de 0-10<sup>30</sup>. No estudo inicial foi demonstrado que esse escore é reprodutível, porém, posteriormente, foi demonstrado que apresentava baixa correlação com o IADC, índice estabelecido como padrão para avaliação da atividade inflamatória na época<sup>31</sup>. Em seguida, com a importância dada à cicatrização de mucosa, o CDEIS passou a ser utilizado em estudos clínicos que avaliaram a resposta endoscópica a um determinado tratamento. Porém, devido à complexidade, o uso do CDEIS ficou restrito aos centros de pesquisa, sendo pouco utilizado na prática clínica.

Em 2004, Daperno et al criaram o Escore Endoscópico Simplificado da DC, conhecido pela sigla inglesa como SES-CD<sup>32</sup>. Tal índice leva em consideração quatro variáveis (presença de ulcerações, superfície intestinal ulcerada, superfície intestinal acometida, presença de estenoses) que devem ser pontuadas em cada um dos cinco segmentos intestinais a serem examinados (íleo terminal, cólon direito, cólon transverso, cólon esquerdo, reto), conforme apresentado na Tabela 1. Essas variáveis podem ser pontuadas com valores de 0 a 3, chegando a um valor máximo de 56 pontos. No trabalho inicial, no qual o SES-CD foi desenvolvido os autores realizaram a sua validação e mostraram que existe boa correlação deste com o CDEIS.

O SES-CD pela sua simplicidade e boa correlação com o CDEIS, passou então, ser mais utilizado nos ensaios clínicos e na prática endoscópica<sup>33</sup>.

**Tabela 1: Escore Endoscópico Simplificado para doença de Crohn**

Variáveis	0	1	2	3
Tamanho das úlceras	Nenhuma	Úlceras aftóides (0,5 a 0,5 cm)	Úlceras grandes (0,5 a 2 cm)	Úlceras muito grandes (maior que 2cm)
Superfície ulcerada	Nenhuma	Menor que 10%	10 - 30%	Maior que 30%
Superfície acometida	Segmento não acometido	Menor que 50%	50 - 75%	Maior que 75%
Presença de estenoses	Nenhuma	Simples, Pode ser transposta	Múltiplas, pode ser transposta	Não pode ser transposta

(Daperno et al., 2004) \*

Estudos recentes têm estabelecido valores de corte para o SES-CD e CDEIS visando à definição do grau de atividade inflamatória endoscópica. Valores de SES-CD entre 0 e 2 são considerados remissão endoscópica, entre 3 e 6 atividade leve, valores de 7-15 atividade moderada e valores igual ou superiores a 16 referem-se a atividade intensa<sup>34, 35</sup>.

\* Daperno, M.; D'Haens, G.; Van Assche, G.; Baert, F.; Bulois, P.; Maunoury, V.; Sostegni, R.; Rocca, R.; Pera, A.; Gevers, A.; Mary, J. Y.; Colombel, J. F.; Rutgeerts, P., Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD. *Gastrointest Endosc* **2004**,60 (4), 505-12.

No entanto, apesar da grande utilidade dos exames endoscópicos, eles apresentam uma série de inconvenientes: são invasivos, têm custos elevados, apresentam riscos relacionados ao procedimento anestésico, sangramento e perfuração intestinal<sup>2, 36</sup>. Ademais, nem sempre é exame bem aceito pelo paciente<sup>13</sup>. Por fim, no nosso meio, há grande dificuldade de acesso a esses exames.

Embora a colonoscopia com biópsias seriadas seja considerada método padrão de avaliação da atividade inflamatória na DC, ela não é o método ideal para essa finalidade, pelos inconvenientes apresentados acima. Assim, o método considerado ideal deve apresentar as seguintes características: ser pouco ou não invasivo, ter baixo custo, não oferecer riscos para o paciente ou examinador, ser reprodutível, apresentar boa correlação com o exame padrão e estar amplamente disponível, além de ser bem aceito pelo paciente<sup>2, 23</sup>.

As limitações de cada um dos métodos de avaliação da atividade inflamatória na DC fez com que exames alternativos fossem estudados. Em pacientes com DII, o processo inflamatório intestinal ativo associa-se a uma reação de fase aguda e à migração de leucócitos para o intestino. Em consequência, um grande número de proteínas de fase aguda é produzido e o contato direto com a mucosa intestinal, faz com que o bolo fecal contenha marcadores específicos, condizentes com a presença e a intensidade da inflamação intestinal. Dentre as características da DC, observa-se infiltrado de leucócitos, com subsequente descamação celular e presença de seus produtos na luz intestinal. Como resultado desse processo, marcadores fecais como leucócitos, produtos leucocitários e proteínas séricas podem ser encontrados nas fezes de pacientes com DII.

Inicialmente, estudos com leucócitos marcados com indium 111 (<sup>111</sup>I) foram realizados com o intuito de se avaliar o grau de inflamação e a extensão da DC. Este exame consiste na marcação de leucócitos com <sup>111</sup>I e infusão dos mesmos no paciente e posterior análise em câmara gama, bem como coleta de fezes para sua pesquisa. Exames com <sup>111</sup>I demonstraram boa correlação com os marcadores de atividade inflamatória da DC, incluindo achados da colonoscopia e histologia. Entretanto, por serem exames laboriosos, envolverem coletas de fezes por vários dias seguidos e a necessidade de utilização de cintilografia, o <sup>111</sup>I ficou restrito basicamente aos centros de pesquisa. Posteriormente, estudos mostraram que proteínas dosadas nas fezes, como a calprotectina, poderiam ser utilizadas para mensurar a atividade inflamatória na DC, por possuírem boa correlação com o exame de <sup>111</sup>I e serem de execução mais simples<sup>37</sup>. Assim, surgiram os marcadores fecais, calprotectina e lactoferrina, que são úteis por apresentarem as seguintes características: não são invasivos, não apresentam riscos aos pacientes, têm baixo custo relativo, apresentam grande especificidade para processos inflamatórios intestinais e têm boa correlação com o exame endoscópico.

A calprotectina fecal, por possuir maior estabilidade que a lactoferrina, está sendo cada vez mais estudada e utilizada como marcador não invasivo de atividade inflamatória intestinal. É proteína ligadora de cálcio e zinco, com peso molecular de 36,5 kDa, com propriedades bacteriostática e fungistática e foi primeiramente extraída de granulócitos em 1980. É encontrada principalmente em neutrófilos, constituindo até 60% das proteínas citosólicas e 5% das proteínas totais dessas células. A calprotectina é extremamente estável, resistente à lise bacteriana, podendo ser determinada em amostras fecais armazenadas à temperatura ambiente, por até sete dias. Pequena quantidade de fezes, tal como cinco gramas, é suficiente para sua dosagem. Porém, a calprotectina fecal não é específica da DC, podendo estar aumentada em outras condições que determinam inflamação intestinal, tal como o câncer colorretal, e a inflamação causada pelo uso de anti-inflamatórios não-esteroidais<sup>23</sup>.

Alguns estudos foram publicados correlacionando os níveis da calprotectina nas fezes e a atividade inflamatória na DC. Em trabalho publicado em 2008, Sipponen et al<sup>38</sup>, estabeleceram faixas de SES-CD para definição de remissão endoscópica (SES-CD: 0-3), atividade de leve a moderada (SES-CD: 4-14) e atividade grave (SES-CD > 14). Os autores observaram que a calprotectina apresentou valores significativamente diferentes para cada uma das faixas de SES-CD, correlacionando-se melhor com o escore endoscópico do que os outros marcadores de atividade, como o IADC, PCR, dosagem de albumina, hemoglobina, contagem de leucócitos e plaquetas. De acordo com o critério de atividade endoscópica estabelecido pelos autores, pacientes em remissão apresentavam valores médios de calprotectina fecal significativamente menores (37mcg/g de fezes, para SES-CD menor ou igual a 3) do que aqueles com atividade endoscópica (686mcg/g de fezes, para SES-CD maior que 3). Posteriormente, em 2010, Schoepfer et al<sup>36</sup>, estratificaram o SES-CD em diferentes faixas: de 0 a 3 – remissão; de 4 a 10 - atividade leve; de 11 a 19- atividade moderada e valores maiores ou igual a 20 - atividade grave. Utilizando-se desta estratificação os autores mostraram que a calprotectina fecal foi o melhor marcador não invasivo de atividade inflamatória na DC apresentando maior correlação com o SES-CD e mostrando-se superior ao IADC, PCR e contagem de leucócitos. Este estudo estabeleceu valores médios de calprotectina fecal de acordo com as faixas do SES-CD. A sensibilidade e especificidade da dosagem da calprotectina foram calculadas levando-se em consideração diferentes níveis de corte (50mcg/g e 70mcg/g de fezes), e esta mostrou acurácia de 84 e 87% para a definição de atividade inflamatória ao exame endoscópico, respectivamente. Em estudo realizado por D’Haens et al<sup>39</sup> a calprotectina fecal também apresentou boa correlação com o SES-CD ( $r=0,490$ ). Os autores mostraram que valores de calprotectina

superiores a 250mcg/g de fezes apresentavam sensibilidade de 51,6% e especificidade de 81,6% para diagnosticar úlcera à ileocoloscopia.

Em recente estudo de metanálise<sup>23</sup> a calprotectina apresentou valores agrupados de sensibilidade de 87% e de especificidade de 67% para diagnóstico de atividade inflamatória em pacientes com DC. Há de se considerar a elevada heterogeneidade dos estudos incluídos na metanálise ( $I^2$ : 70,23). No entanto, entre os 17 trabalhos elegíveis, os autores encontraram valores de corte para o exame de calprotectina fecal extremamente variáveis. O mesmo pode ser observado em revisão publicada por Ikhtairet al<sup>2</sup> onde os valores de corte da calprotectina para definição de atividade inflamatória na DC variou de 50mcg/g a 250mcg/g de fezes, com diferentes valores para a acurácia, sensibilidade e especificidade nos diversos estudos analisados.

Com o objetivo de aumentar a acurácia diagnóstica utilizando marcadores não invasivos alguns autores criaram escores combinando exames laboratoriais e/ou índices clínicos. Em 2008, Langhorst et al combinaram marcadores fecais, PCR e IADC com intuito de aumentar a acurácia diagnóstica da atividade inflamatória. Entretanto, o objetivo não foi atingido, quando comparado ao uso isolado da calprotectina<sup>40</sup>. Posteriormente, Bjorkesten et al, criaram um escore utilizando o IHB e a fCal, criando um cálculo (fCal em mcg/g + 60 x IHB) cujo resultado apresentava uma boa sensibilidade (86%), especificidade (82%) e acurácia (88%). Tais valores eram superiores ao uso de qualquer marcador de forma isolada<sup>41</sup>. Em artigo publicado recentemente, Bodelier et al utilizaram a PCR e/ou o IHB para diagnosticar atividade inflamatória na DC, quando a fCal não estivesse positiva. Houve aumento da sensibilidade e o escore combinado foi especialmente útil entre os pacientes com valores intermediários de fCal (entre 100 e 250mcg/g)<sup>42</sup>.

No Brasil são poucos os estudos publicados referentes ao uso da calprotectina fecal na DII. Em 2009, Vieira et al<sup>43</sup> publicaram trabalho correlacionando a calprotectina fecal com achados endoscópicos e histológicos na DC e RCU, sendo que a histologia foi estabelecida como método padrão de avaliação da atividade inflamatória. Entre os 38 pacientes com DC estudados, 24 apresentavam atividade inflamatória à histologia, e 23 à colonoscopia. Os autores encontraram que valores de calprotectina acima de 200mg/kg de fezes apresentaram sensibilidade de 83,3% e especificidade de 100% para detecção de inflamação, quando comparada à histologia. Outro estudo publicado por Nogueira et al<sup>44</sup> em 2013, envolvendo 17 pacientes, a calprotectina foi

utilizada como um dos marcadores para avaliação de resposta ao tratamento com o anticorpo monoclonal anti-fator de necrose tumoral alfa (Anti-TNF alfa). Porém, não foi feita nenhuma correlação dessa proteína com outros marcadores de atividade inflamatória. Em 2015, Kotzet al<sup>45</sup> publicaram estudo em que a calprotectina fecal foi utilizada como biomarcador para diferenciar sintomas gastrointestinais de pacientes com DII e síndrome do intestino irritável (SII). Na análise do subgrupo de pacientes com DC, 73 pacientes foram estudados, 38 encontravam-se em atividade, sendo que o critério utilizado para tal definição foi a avaliação médica global (AMG). A calprotectina fecal estava de forma significativamente mais aumentada entre os pacientes com DC em atividade moderada a grave (979,5mcg/g), comparada ao grupo em remissão ou atividade leve (126mcg/g).

Percebe-se assim, que a calprotectina fecal tem importância na avaliação da atividade inflamatória intestinal em pacientes com DC. No entanto, apesar da correlação existente entre os escores endoscópicos e a calprotectina fecal, a definição de valor de corte que estabeleça a presença de atividade e os graus de gravidade ainda não existe. Diferentes estudos trazem diferentes valores. O uso de marcadores não-invasivos feito de forma conjunta, embora amplamente realizado na prática clínica, ainda não está bem estudado na literatura. Além disso, embora muito utilizada em nosso meio, não existem estudos de correlação da calprotectina fecal com escores endoscópicos no Brasil.

## 2. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA:

1. Cleynen, I.; Boucher, G.; Jostins, L.; Schumm, L. P.; Zeissig, S.; Ahmad, T.; Andersen, V.; Andrews, J. M.; Annese, V.; Brand, S.; Brant, S. R.; Cho, J. H.; Daly, M. J.; Dubinsky, M.; Duerr, R. H.; Ferguson, L. R.; Franke, A.; Gearry, R. B.; Goyette, P.; Hakonarson, H.; Halfvarson, J.; Hov, J. R.; Huang, H.; Kennedy, N. A.; Kupcinskis, L.; Lawrance, I. C.; Lee, J. C.; Satsangi, J.; Schreiber, S.; Théâtre, E.; van der Meulen-de Jong, A. E.; Weersma, R. K.; Wilson, D. C.; Parkes, M.; Vermeire, S.; Rioux, J. D.; Mansfield, J.; Silverberg, M. S.; Radford-Smith, G.; McGovern, D. P.; Barrett, J. C.; Lees, C. W.; Consortium, I. I. B. D. G., Inherited determinants of Crohn's disease and ulcerative colitis phenotypes: a genetic association study. *Lancet* **2016**,*387* (10014), 156-67.
2. Ikhtaire, S.; Shajib, M. S.; Reinisch, W.; Khan, W. I., Fecal calprotectin: its scope and utility in the management of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* **2016**,*51* (5), 434-46.
3. Gomollon, F.; Dignass, A.; Annese, V.; Tilg, H.; Van Assche, G.; Lindsay, J. O.; Peyrin-Biroulet, L.; Cullen, G. J.; Daperno, M.; Kucharzik, T.; Rieder, F.; Almer, S.; Armuzzi, A.; Harbord, M.; Langhorst, J.; Sans, M.; Chowers, Y.; Fiorino, G.; Juillerat, P.; Mantzaris, G. J.; Rizzello, F.; Vavricka, S.; Gionchetti, P., 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management. *J Crohns Colitis* **2017**,*11* (1), 3-25.
4. Consensus guidelines for the management of inflammatory bowel disease. *Arq Gastroenterol* **2010**,*47* (3), 313-25.
5. Silverberg, M. S.; Satsangi, J.; Ahmad, T.; Arnott, I. D.; Bernstein, C. N.; Brant, S. R.; Caprilli, R.; Colombel, J. F.; Gasche, C.; Geboes, K.; Jewell, D. P.; Karban, A.; Loftus, E. V., Jr.; Pena, A. S.; Riddell, R. H.; Sachar, D. B.; Schreiber, S.; Steinhart, A. H.; Targan, S. R.; Vermeire, S.; Warren, B. F., Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* **2005**,*19 Suppl A*, 5a-36a.
6. Baumgart, D. C.; Sandborn, W. J., Crohn's disease. *Lancet* **2012**,*380* (9853), 1590-605.
7. Fernandes, C.; Allocca, M.; Danese, S.; Fiorino, G., Progress with anti-tumor necrosis factor therapeutics for the treatment of inflammatory bowel disease. *Immunotherapy* **2015**,*7* (2), 175-90.
8. Bouguen, G.; Levesque, B. G.; Feagan, B. G.; Kavanaugh, A.; Peyrin-Biroulet, L.; Colombel, J. F.; Hanauer, S. B.; Sandborn, W. J., Treat to target: a proposed new paradigm for the management of Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* **2015**,*13* (6), 1042-50.e2.
9. Billiet, T.; Rutgeerts, P.; Ferrante, M.; Van Assche, G.; Vermeire, S., Targeting TNF-alpha for the treatment of inflammatory bowel disease. *Expert Opin Biol Ther* **2014**,*14* (1), 75-101.

10. Peyrin-Biroulet, L.; Ferrante, M.; Magro, F.; Campbell, S.; Franchimont, D.; Fidder, H.; Strid, H.; Ardizzone, S.; Veereman-Wauters, G.; Chevaux, J. B.; Allez, M.; Danese, S.; Sturm, A., Results from the 2nd Scientific Workshop of the ECCO. I: Impact of mucosal healing on the course of inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* **2011**,5 (5), 477-83.
11. Neurath, M. F.; Travis, S. P., Mucosal healing in inflammatory bowel diseases: a systematic review. *Gut* **2012**,61 (11), 1619-35.
12. Shah, S. C.; Colombel, J. F.; Sands, B. E.; Narula, N., Systematic review with meta-analysis: mucosal healing is associated with improved long-term outcomes in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* **2016**,43 (3), 317-33.
13. Benitez, J. M.; Meuwis, M. A.; Reenaers, C.; Van Kemseke, C.; Meunier, P.; Louis, E., Role of endoscopy, cross-sectional imaging and biomarkers in Crohn's disease monitoring. *Gut* **2013**,62 (12), 1806-16.
14. Sauter, B.; Beglinger, C.; Girardin, M.; Macpherson, A.; Michetti, P.; Schoepfer, A.; Seibold, F.; Vavricka, S. R.; Rogler, G., Monitoring disease activity and progression in Crohn's disease. A Swiss perspective on the IBD ahead 'optimised monitoring' recommendations. *Digestion* **2014**,89 (4), 299-309.
15. Best, W. R.; Beckett, J. M.; Singleton, J. W.; Kern, F., Jr., Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* **1976**,70 (3), 439-44.
16. Harvey, R. F.; Bradshaw, J. M., A simple index of Crohn's-disease activity. *Lancet* **1980**,1 (8167), 514.
17. Vermeire, S.; Schreiber, S.; Sandborn, W. J.; Dubois, C.; Rutgeerts, P., Correlation between the Crohn's disease activity and Harvey-Bradshaw indices in assessing Crohn's disease severity. *Clin Gastroenterol Hepatol* **2010**,8 (4), 357-63.
18. Leake, I., IBD: a score to settle--measuring Crohn's disease activity. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2013**,10 (10), 564.
19. Chang, S.; Malter, L.; Hudesman, D., Disease monitoring in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **2015**,21 (40), 11246-59.
20. Qiu, Y.; Mao, R.; Chen, B. L.; He, Y.; Zeng, Z. R.; Xue, L.; Song, X. M.; Li, Z. P.; Chen, M. H., Fecal calprotectin for evaluating postoperative recurrence of Crohn's disease: a meta-analysis of prospective studies. *Inflamm Bowel Dis* **2015**,21 (2), 315-22.
21. D'Inca, R.; Caccaro, R., Measuring disease activity in Crohn's disease: what is currently available to the clinician. *Clin Exp Gastroenterol* **2014**,7, 151-61.
22. Papay, P.; Ignjatovic, A.; Karmiris, K.; Amarante, H.; Milheller, P.; Feagan, B.; D'Haens, G.; Marteau, P.; Reinisch, W.; Sturm, A.; Steinwurz, F.; Egan, L.; Panes, J.; Louis, E.; Colombel, J. F.; Panaccione, R., Optimising monitoring in the management of Crohn's disease: a physician's perspective. *J Crohns Colitis* **2013**,7 (8), 653-69.
23. Mosli, M. H.; Zou, G.; Garg, S. K.; Feagan, S. G.; MacDonald, J. K.; Chande, N.; Sandborn, W. J.; Feagan, B. G., C-Reactive Protein, Fecal Calprotectin, and Stool Lactoferrin for Detection of Endoscopic Activity in Symptomatic Inflammatory Bowel Disease Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Gastroenterol* **2015**,110 (6), 802-19; quiz 820.

24. Voudoukis, E.; Karmiris, K.; Oustamanolakis, P.; Theodoropoulou, A.; Sfiridaki, A.; Paspatis, G. A.; Koutroubakis, I. E., Association between thrombocytosis and iron deficiency anemia in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **2013**,*25* (10), 1212-6.
25. Voudoukis, E.; Karmiris, K.; Koutroubakis, I. E., Multipotent role of platelets in inflammatory bowel diseases: a clinical approach. *World J Gastroenterol* **2014**,*20* (12), 3180-90.
26. Novak, K. L.; Panaccione, R., Will cross-sectional imaging replace endoscopy for monitoring response to therapy in Crohn's disease? *Gastroenterology* **2014**,*146* (2), 334-6.
27. Ordas, I.; Rimola, J.; Rodriguez, S.; Paredes, J. M.; Martinez-Perez, M. J.; Blanc, E.; Arevalo, J. A.; Aduna, M.; Andreu, M.; Radosevic, A.; Ramirez-Morros, A. M.; Pino, S.; Gallego, M.; Jauregui-Amezaga, A.; Ricart, E.; Panes, J., Accuracy of magnetic resonance enterography in assessing response to therapy and mucosal healing in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **2014**,*146* (2), 374-82.e1.
28. Annese, V.; Daperno, M.; Rutter, M. D.; Amiot, A.; Bossuyt, P.; East, J.; Ferrante, M.; Gotz, M.; Katsanos, K. H.; Kiesslich, R.; Ordas, I.; Repici, A.; Rosa, B.; Sebastian, S.; Kucharzik, T.; Eliakim, R., European evidence based consensus for endoscopy in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* **2013**,*7* (12), 982-1018.
29. Magro, F.; Langner, C.; Driessen, A.; Ensari, A.; Geboes, K.; 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., European consensus on the histopathology of inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* **2013**,*7* (10), 827-51.
30. Mary, J. Y.; Modigliani, R., Development and validation of an endoscopic index of the severity for Crohn's disease: a prospective multicentre study. Groupe d'Etudes Therapeutiques des Affections Inflammatoires du Tube Digestif (GETAID). *Gut* **1989**,*30* (7), 983-9.
31. Cellier, C.; Sahmoud, T.; Froguel, E.; Adenis, A.; Belaiche, J.; Bretagne, J. F.; Florent, C.; Bouvry, M.; Mary, J. Y.; Modigliani, R., Correlations between clinical activity, endoscopic severity, and biological parameters in colonic or ileocolonic Crohn's disease. A prospective multicentre study of 121 cases. The Groupe d'Etudes Therapeutiques des Affections Inflammatoires Digestives. *Gut* **1994**,*35* (2), 231-5.
32. Daperno, M.; D'Haens, G.; Van Assche, G.; Baert, F.; Bulois, P.; Maunoury, V.; Sostegni, R.; Rocca, R.; Pera, A.; Gevers, A.; Mary, J. Y.; Colombel, J. F.; Rutgeerts, P., Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD. *Gastrointest Endosc* **2004**,*60* (4), 505-12.
33. Sipponen, T.; Nuutinen, H.; Turunen, U.; Farkkila, M., Endoscopic evaluation of Crohn's disease activity: comparison of the CDEIS and the SES-CD. *Inflamm Bowel Dis* **2010**,*16* (12), 2131-6.
34. Vuitton, L.; Marteau, P.; Sandborn, W. J.; Levesque, B. G.; Feagan, B.; Vermeire, S.; Danese, S.; D'Haens, G.; Lowenberg, M.; Khanna, R.; Fiorino, G.; Travis, S.; Mary, J. Y.; Peyrin-Biroulet, L., IOIBD technical review on endoscopic indices for Crohn's disease clinical trials. *Gut* **2016**,*65* (9), 1447-55.

35. Koutroumpakis, E.; Katsanos, K. H., Implementation of the simple endoscopic activity score in crohn's disease. *Saudi J Gastroenterol* **2016**,*22* (3), 183-91.
36. Schoepfer, A. M.; Beglinger, C.; Straumann, A.; Trummler, M.; Vavricka, S. R.; Bruegger, L. E.; 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. *Am J Gastroenterol* **2010**,*105* (1), 162-9.
37. 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* **2000**,*47* (4), 506-13.
38. Sipponen, T.; Karkkainen, P.; Savilahti, E.; Kolho, K. L.; Nuutinen, H.; Turunen, U.; Farkkila, M., Correlation of faecal calprotectin and lactoferrin with an endoscopic score for Crohn's disease and histological findings. *Aliment Pharmacol Ther* **2008**,*28* (10), 1221-9.
39. D'Haens, G.; Ferrante, M.; Vermeire, S.; Baert, F.; Noman, M.; Moortgat, L.; Geens, P.; Iwens, D.; Aerden, I.; Van Assche, G.; Van Olmen, G.; Rutgeerts, P., Fecal calprotectin is a surrogate marker for endoscopic lesions in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* **2012**,*18* (12), 2218-24.
40. Langhorst, J.; Elsenbruch, S.; Koelzer, J.; Rueffer, A.; Michalsen, A.; Dobos, G. J., Noninvasive markers in the assessment of intestinal inflammation in inflammatory bowel diseases: performance of fecal lactoferrin, calprotectin, and PMN-elastase, CRP, and clinical indices. *Am J Gastroenterol* **2008**,*103* (1), 162-9.
41. af Bjorkesten, C. G.; Nieminen, U.; Turunen, U.; Arkkila, P.; Sipponen, T.; Farkkila, M., Surrogate markers and clinical indices, alone or combined, as indicators for endoscopic remission in anti-TNF-treated luminal Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* **2012**,*47* (5), 528-37.
42. Bodelier, A. G.; Jonkers, D.; van den Heuvel, T.; de Boer, E.; Hameeteman, W.; Masclee, A. A.; Pierik, M. J., High Percentage of IBD Patients with Indefinite Fecal Calprotectin Levels: Additional Value of a Combination Score. *Dig Dis Sci* **2017**,*62* (2), 465-472.
43. Vieira, A.; Fang, C. B.; Rolim, E. G.; Klug, W. A.; Steinwurz, F.; Rossini, L. G.; Candelaria, P. A., Inflammatory bowel disease activity assessed by fecal calprotectin and lactoferrin: correlation with laboratory parameters, clinical, endoscopic and histological indexes. *BMC Res Notes* **2009**,*2*, 221.
44. Nogueira, I. M.; Miszputen, S. J.; Ambrogini Jr, O.; Artigiani-Neto, R.; Carvente, C. T.; Zanon, M. I., Assessment of the response of patients with Crohn's disease to biological therapy using new non-invasive markers: lactoferrin and calprotectin. *Arq Gastroenterol* **2013**,*50* (2), 130-7.
45. Kotze, L. M.; Nisihara, R. M.; Marion, S. B.; Cavassani, M. F.; Kotze, P. G., FECAL CALPROTECTIN: levels for the ethiological diagnosis in Brazilian patients with gastrointestinal symptoms. *Arq Gastroenterol* **2015**,*52* (1), 50-4.

### **3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS:**

O presente estudo justifica-se pela relevância do tema, dada à necessidade de se avaliar a atividade inflamatória intestinal em pacientes com DC especialmente se realizada de forma não invasiva. A calprotectina fecal pode tornar-se mais uma ferramenta que auxilie o médico na tomada de decisão frente ao paciente com DC. Assim, propõe-se este trabalho.

#### **3.1 Objetivo geral:**

Investigar o desempenho de marcadores inflamatórios com ênfase na calprotectina fecal no diagnóstico da atividade da doença de Crohn, empregando-se como padrão de referência os achados endoscópicos.

#### **3.2 Objetivos específicos:**

Comparar os valores medianos da fCal entre pacientes com DC e controles com colonoscopia normal.

Comparar os valores medianos do IADC e dos marcadores inflamatórios (fCal, PCR, hemoglobina e contagem de plaquetas) entre pacientes com DC com diferentes graus de atividade da doença definidos pelo escore endoscópico SES-CD;

Correlacionar o IADC e marcadores inflamatórios (fCal, PCR, hemoglobina e contagem de plaquetas) com o SES-CD;

Avaliar o desempenho da calprotectina fecal e PCR no diagnóstico da atividade da doença de Crohn, definida pelo escore endoscópico SES-CD, a partir do cálculo de sensibilidade, especificidade, valores preditivos e razão de verossimilhança;

Estabelecer a sensibilidade, especificidade, valores preditivos e acurácia do uso em série da fCal e da PCR, a partir de cenários hipotéticos de probabilidade de atividade inflamatória da DC e propor um fluxograma de avaliação e seguimento desses pacientes.

## **4. METODOLOGIA:**

Trata-se de estudo observacional, analítico com inclusão prospectiva dos pacientes realizado entre novembro de 2011 e junho de 2016. Foram incluídos pacientes com diagnóstico prévio de doença de Crohn (DC), acompanhados no Ambulatório de Intestino ou internados na Enfermaria de Gastroenterologia do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (IAG-HC/UFMG).

Os critérios de inclusão foram: pacientes adultos, com idade igual ou superior a 18 anos e diagnóstico de DC em atividade ou remissão, que tinham indicação de realizar colonoscopia, quer seja para avaliar remissão ou atividade da doença, rastreamento de neoplasia colorretal, avaliação do efeito do tratamento. Foram excluídos os pacientes que apresentavam qualquer um dos seguintes critérios: recusa em realizar a colonoscopia; preparo intestinal inadequado que impedisse a avaliação da mucosa; exame incompleto por dificuldade técnica; não envio de amostras de fezes por parte dos pacientes; uso de anti-inflamatórios não esteroidais; diagnóstico de neoplasia colorretal maligna, presença de ostomia ou cirurgia de ileocectomia prévia.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais sob o Parecer no. ETIC 00 70.0.203.000-11 (anexo)

### **4.1 Pacientes**

Os pacientes selecionados para a colonoscopia foram encaminhados para consulta médica, quando recebiam o cartão do IADC (Figura 1) sendo orientados a preenchê-lo nos sete dias que antecediam tal avaliação. Na consulta o paciente era avaliado clinicamente com a finalidade de preencher o IADC (Tabela 1), entregava amostra de fezes colhidas no mesmo dia ou na véspera, em frasco seco e lhe era explicado o preparo intestinal para realização do exame colonoscópico. O hemograma e a dosagem PCR foram realizados no Laboratório Central do HC/UFMG, antes da avaliação clínica. Pela técnica utilizada para dosagem da PCR, o limite inferior de detecção é de 5mg/L. Assim, para resultados inferiores a 5mg/L foi atribuído o valor de 1mg/L, para fins de cálculos estatísticos.

Os pacientes do grupo controle foram selecionados entre indivíduos com indicação de realizar colonoscopia para rastreio de câncer colorretal e que não apresentavam doença do trato gastrointestinal conhecida e que não viessem a apresentar alterações no exame endoscópico.

**Figura 1: Cartão de Índice de Atividade na Doença de Crohn para preenchimento pelo paciente**

GEN - CAD

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**HOSPITAL DAS CLÍNICAS**  
 Serviço de Gastroenterologia, Nutrição, Cirurgia Geral e do Aparelho Digestivo  
 (GEN-CAD)



**Cartão do paciente para acompanhamento - CDAI**

PACIENTE: \_\_\_\_\_

DATA \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ REGISTRO \_\_\_\_\_

Registra os dados observados nos 7 dias seguintes a consulta

Data							
1-Número de evacuações com fezes líquidas ou líquidas pastosas							
2- Dor abdominal (0-ausente; 1- leve; 2-moderada; 3-grave)							
3- Estado geral (0-bem; 1-regular, 2-mal;3-muito mal;4-péssimo).							

**Tabela 1: Índice de Atividade de Doença de Crohn**

Variável	Fator multiplicador	Subtotal
1) Número de evacuações líquidas ou líquido-pastosas nos últimos 7 dias	2	= _____
2) Classificação da dor/cólicas abdominais nos últimos 7 dias (0=sem dor, 1=dor leve, 2=dor moderada, 3=dor intensa)	5	= _____
3) Sensação de bem-estar nos últimos 7 dias (0= bem, 1=regular, 2=mal, 3=muito mal, 4=péssimo)	7	= _____
4) Afecções relacionadas com a DC:		
▪ artrite ou artralgia		
▪ irite/uveíte	20	= _____
▪ eritema nodoso ou pioderma gangrenoso ou estomatite aftóide		
▪ fissura ou fístula ou abscesso perianal		
▪ outras fístulas		
▪ febre acima de 37,8°C durante os 7 últimos dias	30	= _____
5) Terapia antidiarréica (0 = nenhuma, 1 = sim)		
6) Massa abdominal (0=nenhuma, 2=questionável, 5=indubitável)	10	= _____
7) Hematócrito	6	= _____
Sexo masculino: 47 – Hct		Somar ou
Sexo feminino: 42 – Hct		subtrair
8) Peso	1	= _____
Peso padrão - peso corporal real x 100/ peso padrão		Somar ou subtrair

(Best et al., 1976)\*

\* Best, W. R.; Becketl, J. M.; Singleton, J. W.; Kern, F., Jr., Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* **1976**,70 (3), 439-44.

## 4.2 Calprotectina fecal:

A determinação de calprotectina fecal foi realizada pelo método de ELISA, utilizando-se o kit comercial de reagentes (BÜHLMANN Laboratories AG®) conforme recomendação do fabricante. O limite inferior de detecção desse kit é 30mcg/g de fezes e o superior é 1800mcg/g de fezes. Assim, valores inferiores a 30mcg/g foram atribuídos como sendo os mesmos 30mcg/g e aqueles maiores que 1800 mcg/g também tiveram esse valor mantido.

## 4.3 Ileocoloscopia:

O preparo intestinal foi realizado com solução de polietilenoglicol 4000 ou lactulose, ambos dissolvidos em água e simeticona, além de dieta líquida restrita no dia anterior ao exame. Durante aileocoloscopia, utilizou-se o escore endoscópico simplificado (SES-CD), que leva em consideração quatro variáveis pontuadas de 0 a 3, a serem avaliadas em cada um dos cinco segmentos examinados (íleo distal, cólon direito, cólon transversal, cólon esquerdo e reto): tamanho das úlceras (0: ausência de úlceras; 1: úlceras menores que 5mm; 2: úlceras entre 5 e 20mm; 3: úlceras maiores que 20mm); superfície ulcerada (0: nenhuma; 1: menor que 10%, 2: entre 10 e 30%; 3: maior que 30%); superfície acometida pela inflamação (0: segmento não acometido; 1: menor que 50% de acometimento; 2: entre 50 e 75% de acometimento; 3: mais que 75% de acometimento); Estenose (0: ausência de estenose; 1: estenose única transponível; 2: múltiplas estenoses transponíveis; 3: estenose intransponível)\*.

A estratificação do SES-CD conforme o grau de atividade endoscópica foi assim realizada:

- Inativo: SES-CD = 0 a 2;
- Atividade leve: SES-CD 3 a 6;
- Atividade moderada a grave: SES-CD  $\geq$  7.

\* Daperno, M.; D'Haens, G.; Van Assche, G.; Baert, F.; Bulois, P.; Maunoury, V.; Sostegni, R.; Rocca, R.; Pera, A.; Gevers, A.; Mary, J. Y.; Colombel, J. F.; Rutgeerts, P., Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD. *Gastrointest Endosc* **2004**,60 (4), 505-12.

Optou-se por estratificar da forma acima, uma vez que, do ponto de vista clínico, há relevância em diferenciar os pacientes em remissão endoscópica, daqueles com atividade leve e moderada a grave. Isto em virtude da abordagem do paciente com atividade de doença moderada e grave ser semelhantes.

As colonoscopias foram realizadas por um único endoscopista, com ampla experiência em doenças intestinais e treinado no uso do referido escore, que desconhecia o resultado dos exames de calprotectina, hemograma, PCR e IADC. Utilizou-se o aparelho Fujifilm (Fujifilm Co, Japão) de alta definição.

#### **4.4 Análise estatística:**

O cálculo do tamanho amostral de pelo menos 21 pacientes com DC em cada um dos três grupos de acordo com o escore de atividade endoscópica SES-CD obtém-se 80% de poder estatístico na detecção de uma diferença de um desvio padrão (DP) na média dos grupos com relação à calprotectina. Considerou-se nos cálculos um DP, o valor da calprotectina de 252,14, que foi obtido de forma ponderada de estudo com desenho semelhante\*\*, e com nível de significância de 0,05. Para isso, utilizou-se o *Software Minitab 14 Release*.

Para verificação da distribuição das variáveis contínuas foi realizado o teste de Shapiro-Wilk. O teste exato de Fischer e o qui-quadrado foram utilizados para verificar associação de variáveis categóricas entre os grupos. A análise de correlação dos marcadores não invasivos de atividade inflamatória com o escore endoscópico foi feita através do teste não-paramétrico de Spearman. Para a análise de medianas de dois grupos (controle versus pacientes, pacientes em remissão versus paciente em atividade) utilizou-se o teste de Mann-Whitney. Quando realizada a comparação de mediana entre os três grupos de pacientes com DC (remissão, atividade leve e moderada a grave), o nível de significância foi ajustado para 0,0167, que corresponde à correção de Bonferroni, conseguida a partir do nível de significância 0,05 dividido pelos 3 grupos. Para a comparação de medianas entre esses três grupos e utilizou-se o teste Jonckheere-Terpstra ou Kruskal-Wallis.

\*\* Schoepfer, A. M.; Beglinger, C.; Straumann, A.; Trummler, M.; Vavricka, S. R.; Bruegger, L. E.; 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. *Am J Gastroenterol* **2010**,*105* (1), 162-9.

Os valores de corte dos exames não invasivos foram obtidos utilizando-se a curva ROC (Receiver Operating Characteristic Curve), sendo selecionados aqueles que apresentavam

o maior valor de soma de sensibilidade e especificidade, correspondendo ao Índice de Youden.

A prevalência de pacientes com DC em atividade não é conhecida e difere entre os centros. Mas, para fins de discussão, adotamos a prevalência da atividade da doença na nossa amostra para calcularmos os valores preditivos, positivo e negativo, bem como a probabilidade pós-teste a partir da razão de verossimilhança para resultado positivo.

## **5. Artigo 1:**

**“Correlation of fecal calprotectin, clinical and serology inflammatory activity markers with different degrees of endoscopic activity, evaluated through simple endoscopic score for Crohn’s disease (SES-CD)”**

**Penna, FGC<sup>1</sup>; Rosa, RM<sup>2</sup>; Cunha, PFS<sup>3</sup>; Souza, SCS<sup>3</sup>; Ferrari, MLA<sup>4</sup>.**

- 1) Physician at the Instituto Alfa de Gastroenterologia, Hospital das Clínicas of the Federal University of Minas Gerais (UFMG). Ph.D. Student of the Graduate Program in Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto. School of Medicine of UFMG, Belo Horizonte.**
- 2) Physician at the Instituto Alfa de Gastroenterologia, Hospital das Clínicas of the Federal University of Minas Gerais (UFMG). Master of Science degree from the Graduate program in Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto. School of Medicine of UFMG, Belo Horizonte.**
- 3) Medical Students in the School of Medicine of the Federal University of Minas Gerais (UFMG). Research scholarships through Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.**
- 4) Associate Professor of the Department of Internal Medicine of the School of the Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte.**

## Summary

**Introduction:** Effective control of the inflammatory process in Crohn's disease (CD) is reflected on intestinal mucosal healing. The performances of fecal calprotectin (fcal), clinical and serologic parameters in inflammatory activity evaluation, as well as their correlation to the simple endoscopic score (SES-CD) are the goals of this study.

**Methods:** Patients with CD referred for ileocolonoscopy were prospectively included and distributed according to the degree of endoscopic inflammatory activity into: group 1 – remission; group 2 – mild activity; and group 3 – moderate to severe activity. The different degrees of endoscopic activity were correlated to the following indexes: Crohn's disease activity index (CDAI), fCal, serum C-reactive protein (CRP), and hemogram. The control group was composed of individuals referred to colorectal cancer screening without known intestinal disease.

**Results:** Eighty colonoscopies were performed in patients with CD and 21 in the control group. The control group had a lower median fCal (59.7mcg/g) than patients with CD (683mcg/g,  $p < 0.001$ ). Moderate Spearman correlation occurred between SES-CD and CRP ( $r = 0.525$ ), fCal ( $r = 0.450$ ), and CDAI ( $r = 0.407$ ), while weak correlation was found with platelet count ( $r = 0.257$ ). Only fCal distinguished patients in remission from those with mild activity (236.6mcg/g x 654.9mcg/g,  $p = 0.014$ ) or moderate to severe (236.6mcg/g x 1128mcg/g,  $p < 0.001$ ). A fCal cut-off 155mcg/g is sensitive (96%) and accurate (78%) for diagnosis of endoscopic activity.

**Conclusion:** fCal presented greatest diagnostic accuracy than the others activity markers for endoscopic activity of patients with CD, moderate correlation to SES-CD, and capacity to discriminate patients in remission from those with mild or moderate to severe activity.

**Key Words:** Fecal calprotectin, Crohn's disease, simple endoscopic score for Crohn's disease SES-CD, C-reactive protein.

## 5.1 Introduction:

Crohn's disease (CD) is a recurrent disease, with active and remissive periods, with symptoms such as abdominal pain, fever, diarrhea, and weight loss (1). Clinical progression is variable and chronic inflammatory activity is responsible for structural damage of the intestine, even in patients who are asymptomatic or have prolonged clinical remission, representing approximately 10% of the studied samples (2,3). Since effective control of inflammatory process is reflected in healing of intestinal mucosa and the healed mucosa is directly related to lower recurrence, complication rates and the need for surgical treatment, it is necessary, for effective clinical practice, to use methods that safely measure intestinal inflammation (4-6). Efficient therapeutic approach should aim to control tissue inflammation for mucosal healing and improve patient prognosis (7,8). Frequent, objective, and regular evaluations of the inflammatory process are necessary to guide therapy (3,9).

Ileocolonoscopy with biopsy of intestinal segments is the standard procedure for evaluation of CD inflammatory activity. However, despite its usefulness, endoscopy entails a series of inconveniences: invasiveness, high cost, the need for anesthesia, which presents its own risk, and are associated to potential bleeding of the mucosa and intestinal perforation (10,11). Furthermore, it is not always well tolerated by patients (7). In developing countries, such as Brazil, it is also a somewhat inaccessible exam.

The ideal marker for the evaluation of CD inflammatory activity should be minimally invasive or noninvasive, low cost, easily disseminated, and accurate (11). Unfortunately, none of the available markers possess all these traits, although promising new markers are surging.

Clinical indexes, such as Crohn's disease activity index (CDAI), have a weak correlation with endoscopic activity and high subjectivity, both from a patient's symptom report and a physician's evaluation. The subjective aspect may correspond to 40% of the total score (12-14). The serum C-reactive protein (CRP) may be altered during inflammation, infection, and tissue damage; have a short half-life; is easily accessible through blood sampling; and is useful in sequential evaluation of inflammatory processes. However, CRP has low specificity, since it can elevate during any inflammatory or infectious

condition. For approximately 15% of the population, CRP remains unaltered even during an inflammatory process (15-17).

Hemogram alterations, such as anemia, may be associated to CD inflammation. The anemia has multiple origins, such as chronic disease anemia, nutritional anemia (deficiency of B12 vitamin, folic acid, and/or iron), or secondary to medication. Increased platelet count is also an inflammatory activity marker, resultant of increased production of thrombopoietin, due to interleucine-6 stimulation. Platelets participate in the perpetuation of the process since they release, in their turn, pro-inflammatory mediators (18-20).

Fecal markers, such as calprotectin and lactoferrin, are identified and quantified proteins in feces, and their measurement is useful since they are noninvasive, low cost, low risk, highly specific to intestinal inflammatory processes, and highly correlated to endoscopic exam (17). Review of the literature has shown correlation between endoscopic scores and fecal calprotectin (fCal) (10,21). However, few studies sought to establish cut-off points to define the presence and degrees of inflammatory activities. In the Brazilian population with CD, there are no studies comparing fCal with endoscopic scores.

The present study seeks to evaluate CD inflammatory activity using clinical and laboratory (hemogram, C reactive protein and fecal calprotectin) noninvasive markers and correlate them to endoscopic findings, evaluated through the Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease – SES-CD (22). The objective was to determine the ability of markers in discriminating remission, mild, and moderate to severe activity at colonoscopy.

## **5.2 Patients and Methods:**

### **5.2.1 Sample:**

Between November of 2011 and June of 2016, 65 patients, 18 years of age or older and previously diagnosed with active or in remission CD, referred to ileocolonoscopy, were recruited from the patients seen in the Outpatient Unit for Intestinal Diseases or Internal Medicine ward of the Instituto Alfa de Gastroenterologia of Hospital das Clínicas of the Federal University of Minas Gerais (IAG-HC/UFMG).

Of the 65 cases, 13 were submitted to ileocolonoscopy twice, and in one patient the procedure was repeated in three distinct occasions during the study, in a total of 80 overall procedures. Exclusion criteria were refusal to undergo colonoscopy; inadequate intestinal preparation, impeding mucosal evaluation; incomplete exam due to technical difficulties; lack of stool sample for measurement of calprotectin; use of non-steroid anti-inflammatory; diagnosis of colorectal cancer, ostomies, or previous ileocelectomy.

The control group consisted in 21 individuals with no history of intestinal disease, submitted to ileocolonoscopy for screening of colorectal cancer and presenting, at endoscopic exam, no polyps over 5mm of diameter, diverticulitis, bleeding, or signs of intestinal mucosa inflammation.

The study was approved by the Ethics Committee of Research of the Federal University of Minas Gerais, filed as Parecer no. ETIC 00 70.0.203.000-11.

### **5.2.2 Clinical and Laboratory Evaluation:**

Recruited patients gave their written informed consent and, before colonoscopy, were interviewed and examined by the researcher. They filled in the card for CDAI score calculation, which is the clinical index for quantification of inflammatory activity. Blood and fecal samples were drawn for measurement of hemogram, serum C-reactive protein (CRP), and fecal calprotectin (fCal).

Fecal calprotectin was measured through ELISA method, with the commercial kit BÜHLMANN Laboratories AG®), according to manufacturer's instructions. This method does not allow for measurements below 30mcg/g or above 1800 mcg/g. Therefore, for statistical analysis, these values were applied on patients who presented values of  $\leq 30\text{mcg/g}$  or  $\geq 1800\text{mcg/g}$ , respectively.

### **5.2.3 Endoscopic Evaluation:**

An experienced practitioner, skilled in endoscopic scoring, performed all colonoscopies and was blind to the results of fCal, hemogram, CRP, and CDAI. SES-CD score and the high definition Fujifilm scope (Fujifilm Co, Japan) were used to measure endoscopic disease activity.

The SES-CD scale proposed by the International Organization of Inflammatory Bowel Disease (23) and Koutroumpakis et al. (24) was used for grouping of patients with CD

into groups based on their endoscopic disease activity: group 1, endoscopic remission – SES-CD = 0-2; group 2, mild activity – SES-CD = 3-6; and group 3, moderate to severe activity – SES-CD  $\geq$  7. It was important to differentiate between patients in endoscopic remission and those with mild or moderate to severe activity since these various conditions lead to different therapeutic approaches.

#### **5.2.4 Statistics:**

A sample of at least 21 patients with CD for each of the three groups were determined through SES-CD, obtaining 80% statistic power in the detection of a 1 standard deviation (SD) difference in the average of the groups in relation to calprotectin. In calculations, 1 SD was considered to be calprotectin of 252.14 mcg/g, a value obtained in a study with similar design (10), and significance level of 0.05. Software Minitab 14 Release was used.

Shapiro-Wilk test was used to verify sample distribution. Variables did not present normal distribution and values are presented as medians, with interquartile range (P<sub>25</sub> – P<sub>75</sub>). Fisher's exact test and chi square were used to verify association of categorical variables between the groups. Spearman's non-parametric test was used to evaluate correlation of noninvasive markers for inflammatory activity with endoscopic score.

Mann-Whitney test was employed to analyze medians between two groups (control versus patients, patients in remission versus patients in activity). When medians of the three groups of patients with CD were compared, significance level was adjusted to 0.0167, which corresponds to Bonferroni's correction, achieved through significance level of 0.05 divided by the three groups. Jonckheere-Terpstra or Kruskal-Wallis test was used to compare medians between the three groups.

Cut-off values for noninvasive exams were obtained through ROC curve, determined by highest value for the sum of sensitivity and specificity, corresponding to Youden Index. Five further values were selected for fecal calprotectin to ensure emphasis on sensitivity or specificity, as needed, to assess its usefulness as a marker. Area under ROC curve was used to calculate an accuracy for each exam.

### 5.3 Results:

#### 5.3.1 Clinical characteristics

The patients with CD were male in 52.5% and median age was of 34 years ( $P_{25}=25$  e  $P_{75}=44$ ). No significant differences were encountered between the three subgroups stratified according to endoscopic inflammatory activity and Montreal classification (25, 26), as shown in Table 1. However, the control group, consisting of 21 individuals without know intestinal disease, showed a predominance of female gender (76.2%) and the median age of 54 years ( $P_{25} = 47.5$  and  $P_{75} = 62$ ), a statistically significant difference in relation to the CD group ( $p < 0.001$ ).

After checking the hypothesis of association between the outcome variable (SES-CD) and the possible explanatory variables (age, sex, location of the disease, age at diagnosis, behavior of CD and fCal) using the Pearson chi-square test, Kruskal -Wallis and Fisher's exact test, age, age at diagnosis and fCal were found to be associated with the SES-CD with a significance level of 0.20. When carrying out the ordinal logistic regression, it was found that only fCal was significantly associated with the outcome.

**Table 1: Clinical characteristics of patients with Crohn's disease and control group**

	Endoscopic Remission n = 27	Mild activity n = 21	Moderate to severe activity n = 32	p value
Gender:				
Male	11 (40,7%)	15 (71,4%)	16 (50,0%)	
Female	16 (59,3%)	6 (28,6%)	16 (50,0%)	
Age (P <sub>25-75</sub> )	40,0 (29,0 – 50,0)	41 (23,5-50,0)	32,5 (24-36,8)	0,102*
<hr/>				
Montreal Classification	n (%)	n (%)	n (%)	
Age at diagnosis				
A <sub>1</sub> (≤16years)	3 (11,1)	1 (4,8)	4 (12,5)	0,149**
A <sub>2</sub> (17-40)	16 (59,3)	15 (71,4)	25 (78,1)	
A <sub>3</sub> (>40 years)	8 (29,6)	5 (23,8)	3 (9,4)	
Disease Phenotype				
B <sub>1</sub>	5 (18,5)	4 (19,0)	11 (34,4)	
B <sub>1p</sub>	5 (18,5)	6 (28,6)	9 (28,1)	
B <sub>2</sub>	8 (29,7)	5 (23,8)	9 (28,1)	0,342**
B <sub>2p</sub>	2 (7,4)	1 (4,8)	1 (3,1)	
B <sub>3</sub>	5 (18,5)	4 (19,0)	0 (0)	
B <sub>3p</sub>	2 (7,4)	1 (4,8)	2 (6,3)	
Location of disease				
L <sub>1</sub>	10 (37,0)	8 (38,1)	7 (21,9)	
L <sub>2</sub>	4 (14,8)	4 (19,0)	8 (25,0)	
L <sub>3</sub>	11 (40,8)	8 (38,1)	17 (53,1)	0,628**
L <sub>1</sub> + L <sub>4</sub>	2 (7,4)	1 (4,8)	0 (0)	
<hr/>				
Medication				
5-ASA	14 (51,9)	12 (57,1)	14 (43,8)	
Thiopurine	19 (70,3)	14 (66,7)	20 (62,5)	
Anti-TNF	6 (22,2)	0 (0)	11 (34,4)	
Antibiotics	4 (14,8)	9 (42,9)	2 (6,3)	
Prednisone	9 (33,3)	7 (33,3)	19 (59,4)	
Metotrexate	0 (0)	0 (0)	1 (3,1)	
Tracolumus	0 (0)	0 (0)	1 (3,1)	

P<sub>25</sub>: percentile 25; P<sub>75</sub>: percentile 75; \*Kruskal-Wallis Test; \*\*Fischer Exact Test. Age at diagnosis: A<sub>1</sub>: below 16 years of age; A<sub>2</sub>: between 17 and 40 years of age; A<sub>3</sub>: above 40 years of age. Location: L<sub>1</sub>: ileum; L<sub>2</sub>: colon; L<sub>3</sub>: ileocolonic; L<sub>4</sub>: upper gastrointestinal tract. Behavior: B<sub>1</sub>: inflammatory; B<sub>2</sub>: stenosing; B<sub>3</sub>: penetrating; p=perianal; Anti-TNF (infliximab, adalimumab); Antibiotics (metronidazole, ciprofloxacin)

### 5.3.2 Correlation between endoscopic activity index and serologic and fecal markers for inflammation.

The SES-CD of 80 colonoscopies was compared to CDAI ( $r = 0.407$ ), CRP ( $r = 0.525$ ), and fCal ( $r = 0.450$ ); all presented moderate Spearman correlation, with statistical significance ( $p < 0.001$ ). Platelet count showed weak correlation ( $r = 0.257$ ), although with statistical significance ( $p < 0.022$ ). However, no significant correlation was found to hemoglobin levels.

The fCal median for the control group was of 59.7mcg/g ( $P_{25}=30$  and  $P_{75}=224.2$ mcg/g) and of 683 mcg/g ( $P_{25}=241.6$  and  $P_{75}=1531.8$ mcg/g) for the group with CD, which were significantly higher ( $p < 0.001$ ) (Table 2). Higher levels of fCal were also observed when comparing subgroups in disease remission ( $SES-CD \leq 2$ ) and those in endoscopic activity ( $SES-CD > 3$ ) to the control group, as shown in Table 2.

**Table 2: Fecal calprotectin (mcg/g) values in different subgroups (remission and endoscopic activities) of patients with Crohn's disease, compared to the control group**

	Fecal calprotectin– mcg/g ( $P_{25}$ - $P_{75}$ )	p Value
Control group (n=21)	59.7 (30.0 - 224.2)	<0.001
Patients with CD (n=80)	683.0 (241.6 – 1531.8)	
Endoscopic remission: SES-CD = 0-2 (n=27)	236.6 (90.7 – 810.5)	0.019 <sup>1</sup>
Endoscopic activity: SES-CD $\geq$ 3 (n=53)	1020.1 (386-1800)	<0.001 <sup>2</sup>

<sup>1</sup>: P value of comparison between endoscopic remission and control groups.

<sup>2</sup>: P value of comparison between endoscopic activity and control groups.

Significant p Value:  $p < 0.05$ . Test: Mann-Whitney.

Noninvasive markers were evaluated regarding diagnostic accuracy of inflammatory activity. Median levels of markers were compared between patients with endoscopic remission ( $SES-CD = 0-2$ ) and those in activity ( $SES-CD \geq 3$ ), (Table 3). Platelet count, CRP, and fCal could differentiate remission from endoscopic activity.

**Table 3: Value of medians of non-invasive markers of patients in endoscopic remission (SES-CD = 0-2) and those with endoscopic activity (SES-CD  $\geq$  3)**

	Endoscopic remission (P <sub>25</sub> – P <sub>75</sub> ) n=27	Endoscopic activity (P <sub>25</sub> – P <sub>75</sub> ) n=53	P Value
CDAI	93.0 (39.0-152.0)	128.0 (64.0-228.0)	0.082
Hb(g/dl)	12.8 (11.5-14.2)	13.2 (12.4-14.5)	0.438
Platelets (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	286.0 (218.0-315.0)	313.0 (254.2-380.2)	0.041
CRP (mg/L)	5.0 (5.0-11.0)	16.6 (5.9-32.1)	<0.001
fCal (mcg/g)	236.6 (90.7-810.5)	1020.1 (387.0-1800.0)	<0.001

Values expressed in medians, P<sub>25</sub> – P<sub>75</sub>: Percentiles 25 and 75.

Significant p Value: p<0.05. Test: Mann-Whitney.

CDAI: Crohn's disease activity index; Hb: hemoglobin, CRP: serum C-reactive protein, fCal: fecal calprotectin.

Medians of CDAI score, hemoglobin, platelet count, CRP, and fCal were compared for SES-CD degrees to assess the performance of noninvasive markers to stratify endoscopic activity levels (Table 4). With the exception of hemoglobin, the markers differed significantly in all groups according to endoscopic score. For the variables with significantly statistical difference, further comparison between different endoscopic activity levels is shown in Table 5. The only marker that significantly differentiated between endoscopic remission and activity, both mild and moderate to severe, was fCal. CDAI distinguished between moderate to severe and mild activity and patients in remission. CRP was useful to differentiate patients in remission from those with moderate to severe activity. Platelet count was not of use for stratification of various levels of endoscopic activity (Table 5).

**Table 4 – Comparison of values noninvasive markers according to the degree of endoscopic activity (SES-CD), in 80 patients with Crohn's disease**

	SES-CD: 0-2 n= 27	SES-CD: 3-6 n= 21	SES-CD: $\geq$ 7 n= 32	P Value
CDAI	93 (39-152)	73 (30-126)	194 (100.25- 286.5)	0.002
Hb(g/dl)	12.8 (11.5-14.2)	13.5 (12.6- 14.3)	13.05 (12.1-14.5)	0.677
Platelets( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	286 (218-315)	310 (259-354)	338 (260-384)	0.035
CRP(mg/L)	5.0 (5-11.02)	12.25 (5- 25.21)	18.15 (8.94-39.2)	<0.001
fCal (mcg/g)	236.6 (90.7- 810.5)	654.9 (386- 1549)	1128 (390.4- 1800)	<0.001

Significant p Value:  $p < 0.05$ . Test: Jonckheere-Terpstra.

CDAI: Crohn's disease activity index; Hb: hemoglobin, CRP: serum C-reactive protein, fCal: fecal calprotectina

**Table 5 – Summary of results of comparison between medians of noninvasive markers according to degree of endoscopic activity (SES-CD)**

	Remission X Mild Activity	Remission X Moderate to severe Activity	Mild activity X Moderate to severe Activity
CDAI	$p=0.372$	$p=0.001^*$	$p=0.002^*$
Platelets ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	$p=0.156$	$p=0.045$	$p=0.0504$
CRP (mg/L)	$p=0.112$	$p < 0.001^*$	$p=0.074$
fCal (mcg/g)	$p= 0.014^*$	$p < 0.001^*$	$p=0.157$

\* Significant p Value:  $p < 0.0167$ . Test: Mann-Whitney.

CDAI: Crohn's disease activity index; Hb: hemoglobin, CRP: serum C-reactive protein, fCal: fecal calprotectina

### 5.3.3 Determination of cut-off values for noninvasive exams:

Cut-off points for markers with positive correlation to endoscopic alterations (platelet count, CRP, and fCal) were calculated through ROC curve (Figure 1 and Table 6). This analysis was not performed for hemoglobin as it had no correlation to endoscopic activity, nor for CDAI, since there are established cut-off points for remission and activity for this index in literature.

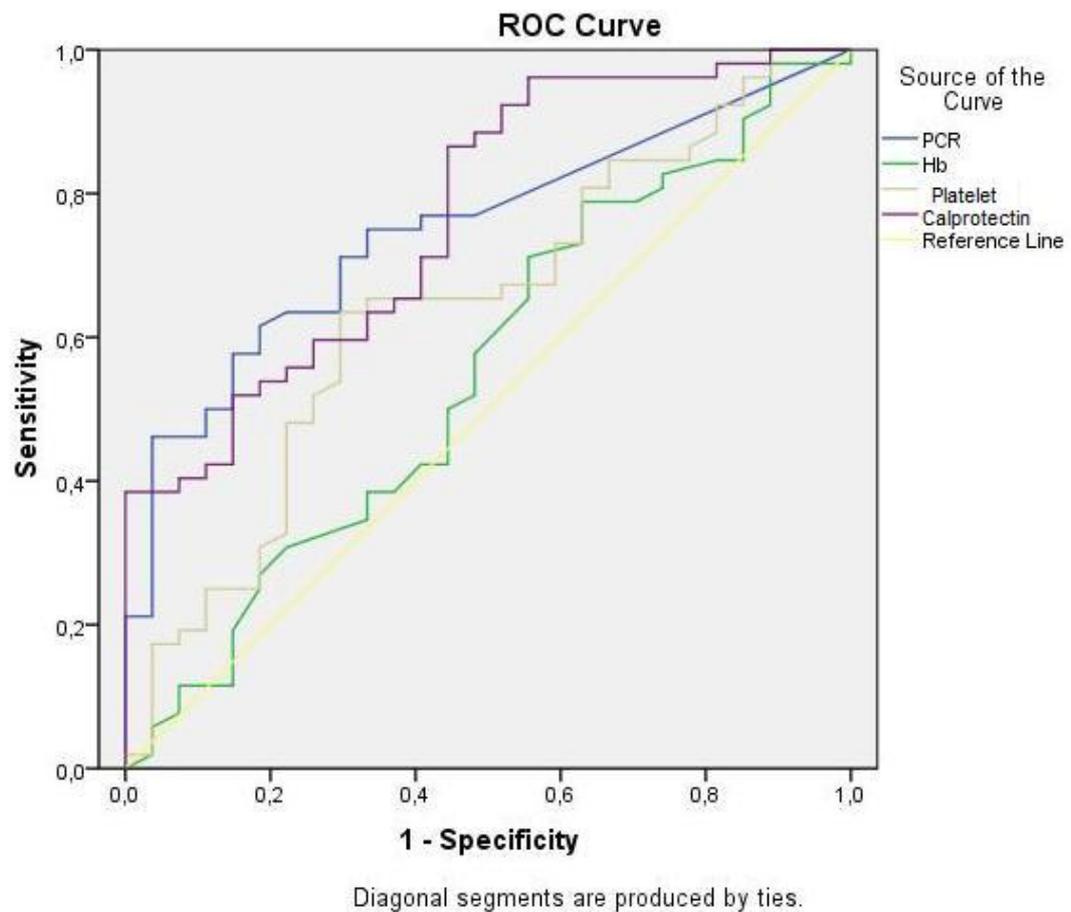


Figure 1: ROC curves for non-invasive markers.

**Table 6: Accuracy of biomarkers in the diagnosis of inflammatory activity in 80 patients with Crohn's disease**

	Area under curve ROC	CI 95%	P Value
CRP	0.75	0.64 - 0.86	<0.001
Platelet count	0.64	0.51 - 0.77	0.041
Fecal calprotectin	0.77	0.66 – 0.88	<0.001
Hemoglobin	0.55	0.42 – 0.69	0.438

CRP: Serum C-reactive protein; CI 95%: confidence interval of 95%.

Significant p Value:  $p < 0.05$

Sensitivity, specificity, and likelihood ratios for positive and negative results of the different biomarkers for diagnosis of CD activity were calculated through cut-off points established with ROC curve. There is no consensus, in the literature, regarding the ideal reference value for fCal for diagnosis of intestinal inflammatory activity. Therefore, different cut-off points were selected in order to assess which had the best performance. Prevalence of inflammatory activity in the sample was applied to establish positive predictive value, negative predictive value, and accuracy (Table 7).

**Table 7: Sensitivity (Sens), specificity (Spec), positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) and accuracy (A) for each biomarker and their respective cut-offs and confidence intervals of 95% (CI 95%) in the diagnosis of inflammatory activity in 80 patients with Crohn's disease**

	Sens	CI 95%	Spec	CI 95%	PPV	CI 95%	NPV	CI 95%	A	CI 95%
fCal $\geq$ 155 mcg/g	0.96	0.91 – 1.0	0.44	0.27 – 0.61	0.77	0.68 – 0.86	0.86	0.68 – 1.0	0.78	0.70 – 0.86
fCal $\geq$ 199 mcg/g	0.90	0.83 – 0.97	0.48	0.31 – 0.65	0.77	0.68 – 0.86	0.72	0.53 – 0.90	0.76	0.67 – 0.84
fCal $\geq$ 246 mcg/g	0.89	0.82 – 0.97	0.52	0.35 – 0.69	0.78	0.69 – 0.88	0.70	0.53 - 0.89	0.76	0.68 – 0.85
fCal $\geq$ 273 mcg/g	0.87	0.79 – 0.95	0.56	0.39 – 0.73	0.79	0.70 – 0.88	0.68	0.52 – 0.86	0.76	0.68 – 0.85
fCal $\geq$ 1009 mcg/g	0.52	0.40 – 0.64	0.85	0.73 – 0.97	0.87	0.77 – 0.98	0.48	0.35 – 0.60	0.63	0.54 – 0.85
fCal $\geq$ 1473 mcg/g	0.40	0.28 – 0.52	0.93	0.84 – 1.0	0.91	0.82 – 1.0	0.44	0.33 – 0.56	0.58	0.48 – 0.68
PCR $\geq$ 6.7 mg/L	0.75	0.65 – 0.85	0.67	0.51 – 0.83	0.81	0.72 – 0.91	0.58	0.43 – 0.73	0.72	0.64 – 0.81
Pla $\geq$ 292,500/mm <sup>3</sup>	0.65	0.54 – 0.74	0.67	0.51 – 0.83	0.79	0.69 – 0.90	0.5	0.35 – 0.64	0.66	0.56 – 0.75

fCal: fecal calprotectin. CRP: serum C-reactive protein. Platelets: platelet count. CI 95%: confidence interval of 95%.

Sens: Sensitivity. Spec: specificity. PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value; A: accuracy.

The same cut-off values for biomarkers were used to assess likelihood ratios for positive and negative results, posttest odds ratio, and posttest likelihood for CD activity as shown in Table 8.

**Table 8: Likelihood ratio for positive result (LR+), likelihood ratio for negative result (LR-) and its inverse (1/LR-), posttest odds ratio (posttest OR), and probability following tests (posttest P) of Crohn's disease activity for each noninvasive marker exams and their respective cut-offs.**

	LR+	LR-	1/LR-	Posttest OR	Posttest P
fCal $\geq$ 155 mcg/g	1.73	0.08	11.69	3.36	0.77
fCal $\geq$ 199 mcg/g	1.74	0.20	5.01	3.38	0.77
fCal $\geq$ 246 mcg/g	1.83	0.22	4.49	3.56	0.78
fCal $\geq$ 273 mcg/g	1.95	0.24	4.12	3.77	0.79
fCal $\geq$ 1009 mcg/g	3.50	0.56	1.77	6.80	0.87
fCal $\geq$ 1473mcg/g	5.45	0.64	1.55	10.58	0.91
CRP $\geq$ 6.7 mg/L	2.25	0.38	2.66	4.36	0.81
Pla $\geq$ 292,500/mm <sup>3</sup>	1.96	0.51	1.92	3.80	0.79

fCal: fecal calprotectin. CRP: serum C-reactive protein. Pla: Platelet count.

LR+: Likelihood ratio for positive result; LR-: Likelihood ratio for negative result; 1/LR-: likelihood ratio in patients in remission; OR: *odds ratio*; Posttest L: Posttest probability of CD activity.

#### 5.4 Discussion:

Diagnosis and follow-up of patients with inflammatory intestinal disease is frequently complex and includes a combination of clinical, laboratory, endoscopic, hystopathologic, and radiologic aspects (20). Periods of inflammatory activity, particularly for CD, are frequently underestimated or recognition is delayed due to lack of specificity or invasiveness of available procedures (12, 17). Biomarkers that determine type, severity, prognosis, and therapeutic response are clinically relevant and have a direct impact on therapeutic decisions and, consequently, on patient prognosis. Researchers in the field are in constant search for an ideal biomarker.

Groups with CD and different levels of endoscopic inflammatory activity were similar for gender, age, and disease phenotype. Significant differences were observed in relation to control group, which was older than the CD group. This is due to the profile of recruited individuals, since their referral to ileocolonoscopy was for colorectal cancer screening.

The markers with the best correlation to SES-CD were, respectively, CRP ( $r=0.525$ ), fCal ( $r=0.450$ ), CDAI ( $r=0.407$ ), and platelet count ( $r=0.257$ ). These results are similar to those reported by Sipponen et al. (21), who evaluated 87 patients with CD and found the following correlations to SES-CD: fCal ( $r=0.662$ ), CRP ( $r=0.522$ ), CDAI ( $r=0.346$ ), and platelet count ( $r=0.290$ ). Schoepfer et al. (10) and Lin et al. (27) corroborate these findings.

Hemoglobin showed no correlation to endoscopic activity, as also described by Sipponen et al. (21). CD's anemia is multifactorial by nature and reflects not only enteric bleeding, but also Crohnic inflammatory activity, vitamin and mineral deficiency, and adverse reaction of medication; this may account for lack of correlation to intestinal injury (18).

Fecal calprotectin has been shown to be useful in differentiating patients with CD from individuals without inflammatory bowel disease, a finding that is similar to literature data (10, 28-30). Significant difference was observed even when CD in remission was compared to the control group.

Mucosal healing is the main goal for inflammatory bowel diseases treatment, as it is known to be directly related to decreased permanent structural damage to the gastrointestinal tract (4, 6). Therefore, identification of markers that can safely distinguish between remission and endoscopic activity, including mild activity, is important. Colonoscopy is the standard method; however, it is limited by its invasiveness. In this study, platelet count, CRP, and fCal were shown to be useful in differentiating patients in remission from those with endoscopic activity. Of these, fCal was the only one that distinguished remission ( $SES-CD \leq 2$ ) from mild or moderate to severe activity. This result, particularly the distinction between remission and mild endoscopic activity, is an important contribution to clinical approach since it can guide early treatment adjustments, with positive repercussions for long term outcome of the disease. Similar results were

described in studies that took place in Europe (10,21), North America (31), and Asia (27); however, there are no reports of similar assessments in the Latin American population.

ROC curve identified cut-off reference values for biomarkers with greatest sensitivity and specificity for diagnosis of inflammatory activity. Among the studied markers fCal, showed best diagnostic accuracy. For CRP, the cut-off of 6.7 mg/L showed satisfactory diagnostic accuracy, with more sensitivity in relation to specificity. This result differs from Schoepfer et al. (10) findings, in which sensitivity and specificity had lower values. Platelet count had intermediate values both for sensitivity and specificity and was shown to be useful as an adjunct marker in identification of CD intestinal inflammation.

Analysis of cut-off values for fCal showed that 273mcg/g had the best sensitivity and specificity, as shown by Youden Index. There is no consensus, in the literature, regarding the best value for characterization of inflammatory activity in CD. In order to distinguish different values used for diagnosis of inflammatory activity, values similar to previous reports in literature and with high Youden index were chosen: 155mcg/g, 199mcg/g, and 246mcg/g. Two other fCal values were selected, 1009mcg and 1473mcg/g, to evaluate the performance of a value with greater specificity, since the other values prioritized sensitivity.

In evaluating positive and negative predictor values, and accuracy of selected cutoffs, 155mcg/g presented the best results. This value had excellent sensitivity (96%) and a 78% diagnostic accuracy, demonstrating potential for usefulness in clinical practice since it is able to identify almost all patients with endoscopic inflammatory activity. Based on analysis of likelihood ratios, values lower than 155mcg/g are eleven times more likely in patients in disease remission, which may support follow-up without a need for colonoscopy.

Many studies suggest cutoff points of 200mcg/g or 250mcg/g for diagnosis of inflammatory activity in DC, which are similar to the 199mcg/g or 243mcg/g found in this study (11,17). Furthermore, some studies consider values of up to 280mcg/g (32,33) for diagnosis of CD activity, which is close to the value of 273mcg/g found in this sample. In the studied sample, such values showed decreased sensitivity when compared to the cutoff of 155mcg/g, without significant increase in specificity or positive predictor value. However, accuracy remained similar for all of these values.

High specificity for diagnosis of inflammatory activity was found for cutoff values of 1009 mcg/g and, especially 1473 mcg/g, with a posttest likelihood of 91% for the latter, and 87% for the former, when the result was positive. However, concurrently to increased specificity, there is loss of sensitivity. High cutoff value for fCal was also studied by Lin et al(27), with a value of 918mcgg obtaining 100% specificity and 50% sensitivity rates.

Based on the data, the cutoff value of 155mcg/g for fCal was shown to be useful to evaluate the treatment goal of mucosal healing in CD, since this cutoff value privileges sensitivity and has a high negative predictor value, both important traits for exclusion of intestinal mucosa injury.

This study has several potential limitations. The first was the option of not performing serial measurements of calprotectin, which could increase the accuracy of this test. However, this was also a strategy adopted by other authors in different studies. Second, only one kit of calprotectin was used, which, although already validated, does not allow extrapolation to other methods of dosing this marker. Third, the study of the small intestine was not performed through enterography, which could allow more reliable conclusions about the inflammatory activity. However, all patients included in this study had ileal or ileocolonic involvement, allowing to infer that ileocolonoscopy could be used to diagnose inflammatory activity in this sample. Finally, the number of patients in the endoscopic remission group, although estimated before the start of the study, was responsible for the large confidence intervals found in the specificity values.

The study permitted the following conclusions: fCal, CRP, CDAI, and platelet count showed correlation to endoscopic activity; fCal had greater diagnostic capacity since it allowed for differential diagnosis between endoscopic remission and mild or moderate to severe activity; cutoff level for fCal of 155mcg/g appears to be ideal in noninvasive assessment of inflammatory activity as it presents good sensitivity (96%), diagnostic accuracy of endoscopic activity of 78%, and significant negative predictor value; values above 1009 mcg/g and, specifically those over 1473 mcg/g are indicative of intestinal inflammatory activity in CD.

## 5.5 REFERENCES:

1. Baumgart, D. C.; Sandborn, W. J., Crohn's disease. *Lancet* **2012**, *380* (9853), 1590-605.
2. Fernandes, C.; Allocca, M.; Danese, S.; Fiorino, G., Progress with anti-tumor necrosis factor therapeutics for the treatment of inflammatory bowel disease. *Immunotherapy* **2015**, *7* (2), 175-90.
3. Bouguen, G.; Levesque, B. G.; Feagan, B. G.; Kavanaugh, A.; Peyrin-Biroulet, L.; Colombel, J. F.; Hanauer, S. B.; Sandborn, W. J., Treat to target: a proposed new paradigm for the management of Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* **2015**, *13* (6), 1042-50.e2.
4. Peyrin-Biroulet, L.; Ferrante, M.; Magro, F.; Campbell, S.; Franchimont, D.; Fidder, H.; Strid, H.; Ardizzone, S.; Veereman-Wauters, G.; Chevaux, J. B.; Allez, M.; Danese, S.; Sturm, A., Results from the 2nd Scientific Workshop of the ECCO. I: Impact of mucosal healing on the course of inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* **2011**, *5* (5), 477-83.
5. Neurath, M. F.; Travis, S. P., Mucosal healing in inflammatory bowel diseases: a systematic review. *Gut* **2012**, *61* (11), 1619-35.
6. Shah, S. C.; Colombel, J. F.; Sands, B. E.; Narula, N., Systematic review with meta-analysis: mucosal healing is associated with improved long-term outcomes in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* **2016**, *43* (3), 317-33.
7. Benitez, J. M.; Meuwis, M. A.; Reenaers, C.; Van Kemseke, C.; Meunier, P.; Louis, E., Role of endoscopy, cross-sectional imaging and biomarkers in Crohn's disease monitoring. *Gut* **2013**, *62* (12), 1806-16.
8. Gionchetti, P.; Dignass, A.; Danese, S.; Magro Dias, F. J.; Rogler, G.; Lakatos, P. L.; Adamina, M.; Ardizzone, S.; Buskens, C. J.; Sebastian, S.; Laureti, S.; Sampietro, G. M.; Vucelic, B.; van der Woude, C. J.; Barreiro-de Acosta, M.; Maaser, C.; Portela, F.; Vavricka, S. R.; Gomollon, F., 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 2: Surgical Management and Special Situations. *J Crohns Colitis* **2017**, *11* (2), 135-149.
9. Sauter, B.; Beglinger, C.; Girardin, M.; Macpherson, A.; Michetti, P.; Schoepfer, A.; Seibold, F.; Vavricka, S. R.; Rogler, G., Monitoring disease activity and progression in Crohn's disease. A Swiss perspective on the IBD ahead 'optimised monitoring' recommendations. *Digestion* **2014**, *89* (4), 299-309.
10. Schoepfer, A. M.; Beglinger, C.; Straumann, A.; Trummel, M.; Vavricka, S. R.; Bruegger, L. E.; 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. *Am J Gastroenterol* **2010**, *105* (1), 162-9.
11. Ikhtaire, S.; Shajib, M. S.; Reinisch, W.; Khan, W. I., Fecal calprotectin: its scope and utility in the management of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* **2016**, *51* (5), 434-46.
12. Chang, S.; Malter, L.; Hudesman, D., Disease monitoring in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **2015**, *21* (40), 11246-59.

13. Leake, I., IBD: a score to settle--measuring Crohn's disease activity. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2013**, *10* (10), 564.
14. Qiu, Y.; Mao, R.; Chen, B. L.; He, Y.; Zeng, Z. R.; Xue, L.; Song, X. M.; Li, Z. P.; Chen, M. H., Fecal calprotectin for evaluating postoperative recurrence of Crohn's disease: a meta-analysis of prospective studies. *Inflamm Bowel Dis* **2015**, *21* (2), 315-22.
15. D'Inca, R.; Caccaro, R., Measuring disease activity in Crohn's disease: what is currently available to the clinician. *Clin Exp Gastroenterol* **2014**, *7*, 151-61.
16. Papay, P.; Ignjatovic, A.; Karmiris, K.; Amarante, H.; Milheller, P.; Feagan, B.; D'Haens, G.; Marteau, P.; Reinisch, W.; Sturm, A.; Steinwurz, F.; Egan, L.; Panes, J.; Louis, E.; Colombel, J. F.; Panaccione, R., Optimising monitoring in the management of Crohn's disease: a physician's perspective. *J Crohns Colitis* **2013**, *7* (8), 653-69.
17. Mosli, M. H.; Zou, G.; Garg, S. K.; Feagan, S. G.; MacDonald, J. K.; Chande, N.; Sandborn, W. J.; Feagan, B. G., C-Reactive Protein, Fecal Calprotectin, and Stool Lactoferrin for Detection of Endoscopic Activity in Symptomatic Inflammatory Bowel Disease Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Gastroenterol* **2015**, *110* (6), 802-19; quiz 820.
18. Voudoukis, E.; Karmiris, K.; Oustamanolakis, P.; Theodoropoulou, A.; Sfiridaki, A.; Paspatis, G. A.; Koutroubakis, I. E., Association between thrombocytosis and iron deficiency anemia in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **2013**, *25* (10), 1212-6.
19. Voudoukis, E.; Karmiris, K.; Koutroubakis, I. E., Multipotent role of platelets in inflammatory bowel diseases: a clinical approach. *World J Gastroenterol* **2014**, *20* (12), 3180-90.
20. Gomollon, F.; Dignass, A.; Annese, V.; Tilg, H.; Van Assche, G.; Lindsay, J. O.; Peyrin-Biroulet, L.; Cullen, G. J.; Daperno, M.; Kucharzik, T.; Rieder, F.; Almer, S.; Armuzzi, A.; Harbord, M.; Langhorst, J.; Sans, M.; Chowers, Y.; Fiorino, G.; Juillerat, P.; Mantzaris, G. J.; Rizzello, F.; Vavricka, S.; Gionchetti, P., 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management. *J Crohns Colitis* **2017**, *11* (1), 3-25.
21. Sipponen, T.; Karkkainen, P.; Savilahti, E.; Kolho, K. L.; Nuutinen, H.; Turunen, U.; Farkkila, M., Correlation of faecal calprotectin and lactoferrin with an endoscopic score for Crohn's disease and histological findings. *Aliment Pharmacol Ther* **2008**, *28* (10), 1221-9.
22. Sostegni, R.; Daperno, M.; Scaglione, N.; Lavagna, A.; Rocca, R.; Pera, A., Review article: Crohn's disease: monitoring disease activity. *Aliment Pharmacol Ther* **2003**, *17* Suppl 2, 11-7.
23. Vuitton, L.; Marteau, P.; Sandborn, W. J.; Levesque, B. G.; Feagan, B.; Vermeire, S.; Danese, S.; D'Haens, G.; Lowenberg, M.; Khanna, R.; Fiorino, G.; Travis, S.; Mary, J. Y.; Peyrin-Biroulet, L., IOIBD technical review on endoscopic indices for Crohn's disease clinical trials. *Gut* **2016**, *65* (9), 1447-55.

24. Koutroumpakis, E.; Katsanos, K. H., Implementation of the simple endoscopic activity score in crohn's disease. *Saudi J Gastroenterol* **2016**,*22* (3), 183-91.
25. Silverberg, M. S.; Satsangi, J.; Ahmad, T.; Arnott, I. D.; Bernstein, C. N.; Brant, S. R.; Caprilli, R.; Colombel, J. F.; Gasche, C.; Geboes, K.; Jewell, D. P.; Karban, A.; Loftus, E. V., Jr.; Pena, A. S.; Riddell, R. H.; Sachar, D. B.; Schreiber, S.; Steinhart, A. H.; Targan, S. R.; Vermeire, S.; Warren, B. F., Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* **2005**,*19 Suppl A*, 5a-36a.
26. Satsangi, J.; Silverberg, M. S.; Vermeire, S.; Colombel, J. F., The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* **2006**,*55* (6), 749-53.
27. Lin, W. C.; Wong, J. M.; Tung, C. C.; Lin, C. P.; Chou, J. W.; Wang, H. Y.; Shieh, M. J.; Chang, C. H.; Liu, H. H.; Wei, S. C., Fecal calprotectin correlated with endoscopic remission for Asian inflammatory bowel disease patients. *World J Gastroenterol* **2015**,*21* (48), 13566-73.
28. Kotze, L. M.; Nisihara, R. M.; Marion, S. B.; Cavassani, M. F.; Kotze, P. G., FECAL CALPROTECTIN: levels for the ethiological diagnosis in Brazilian patients with gastrointestinal symptoms. *Arq Gastroenterol* **2015**,*52* (1), 50-4.
29. Menees, S. B.; Powell, C.; Kurlander, J.; Goel, A.; Chey, W. D., A meta-analysis of the utility of C-reactive protein, erythrocyte sedimentation rate, fecal calprotectin, and fecal lactoferrin to exclude inflammatory bowel disease in adults with IBS. *Am J Gastroenterol* **2015**,*110* (3), 444-54.
30. Caviglia, G. P.; Pantaleoni, S.; Touscoz, G. A.; Adriani, A.; Rosso, C.; Smedile, A.; Pellicano, R.; Astegiano, M.; Bresso, F., Fecal calprotectin is an effective diagnostic tool that differentiates inflammatory from functional intestinal disorders. *Scand J Gastroenterol* **2014**,*49* (12), 1419-24.
31. Jones, J.; Loftus, E. V., Jr.; Panaccione, R.; Chen, L. S.; Peterson, S.; McConnell, J.; Baudhuin, L.; Hanson, K.; Feagan, B. G.; Harmsen, S. W.; Zinsmeister, A. R.; Helou, E.; Sandborn, W. J., Relationships between disease activity and serum and fecal biomarkers in patients with Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* **2008**,*6* (11), 1218-24.
32. Wright, E. K., Calprotectin or Lactoferrin: Do They Help. *Dig Dis* **2016**,*34* (1-2), 98-104.
33. Lobaton, T.; Lopez-Garcia, A.; Rodriguez-Moranta, F.; Ruiz, A.; Rodriguez, L.; Guardiola, J., A new rapid test for fecal calprotectin predicts endoscopic remission and postoperative recurrence in Crohn's disease. *J Crohns Colitis* **2013**.

## **6. Artigo 2:**

**Valor da avaliação conjuntada da calprotectina fecal e proteína C reativa no diagnóstico da atividade inflamatória na doença de Crohn.**

**Penna, FGC<sup>1</sup>; Rosa, RM<sup>2</sup>; Cunha, PFS<sup>3</sup>; Souza, SCS<sup>3</sup>; Ferrari, MLA<sup>4</sup>.**

**1) Médico do Instituto Alfa de Gastroenterologia. Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto. Faculdade de Medicina da UFMG, Belo Horizonte.**

**2) Médico do Instituto Alfa de Gastroenterologia. Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Mestre do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto. Faculdade de Medicina da UFMG, Belo Horizonte.**

**3) Graduandos do curso de Medicina UFMG. Bolsistas de Iniciação Científica–CNPq.**

**4) Professora Associado Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da UFMG, Belo Horizonte.**

## Resumo

**Introdução:** O adequado controle do processo inflamatório na doença de Crohn (DC) se reflete na cicatrização da mucosa intestinal, objetivo atual do tratamento, resultando em menores taxas complicações. A investigação do desempenho isolado e em conjunto da calprotectina fecal (fCal) e proteína C reativa (PCR) para avaliação da atividade inflamatória, bem como a correlação desses com o escore endoscópico simplificado (SES-CD) são objetivos deste estudo.

**Métodos:** Pacientes com DC e indicação para realizar colonoscopia foram prospectivamente incluídos e alocados conforme a presença ou não de atividade inflamatória endoscópica. Foi realizada a correlação da fCal e PCR com o SES-CD, e avaliado a acurácia desses marcadores para diagnóstico da atividade inflamatória quando utilizados separadamente ou em série.

**Resultados:** Foram realizadas 80 colonoscopias em pacientes com DC. A mediana da fCal dos pacientes em remissão endoscópica (236,6mcg/g) foi significativamente menor que dos pacientes em atividade (1020,1mcg/g;  $p < 0,001$ ), o mesmo ocorrendo com a PCR (5mg/l e 16,64mg/l, respectivamente,  $p < 0,001$ ). Houve correlação moderada (correlação de Spearman) entre o SES-CD e a PCR ( $r = 0,525$ ) e fCal ( $r = 0,450$ ). Valor de corte de fCal de 155mcg/g apresenta grande sensibilidade (96%) e acurácia (78%) para diagnóstico de atividade endoscópica. Para a PCR, o valor de 6,7 mg/l apresenta sensibilidade de 75% e especificidade de 67%. O uso em série desses marcadores (fCal + PCR) apresenta melhor especificidade (82%). De acordo com a probabilidade de atividade inflamatória, diferentes cenários foram utilizados para avaliar o rendimento desses marcadores e um fluxograma foi proposto.

**Conclusão:** O uso da fCal e PCR são úteis na diferenciação dos pacientes em remissão daqueles em atividade. A análise conjunta desses exames, quando realizados em série, permite a tomada de decisão com grande grau de certeza, inclusive dispensando a realização de colonoscopia em muitas situações.

**Palavras-Chave:** Calprotectina fecal, proteína C reativa, doença de Crohn, escore endoscópico SES-CD.

## 6.1 Introdução:

A doença de Crohn(DC) é doença crônica recorrente, que evolui com períodos de atividade e remissão, frequentemente manifesta por dor abdominal, febre, diarreia e emagrecimento.<sup>1, 2</sup> A evolução clínica da doença é variável e a atividade inflamatória crônica é responsável pelo dano estrutural permanente do intestino, até mesmo naqueles pacientes que cursam com remissão clínica prolongada<sup>3-7</sup>. O controle eficaz do processo inflamatório tem reflexo direto na cicatrização da mucosa intestinal e a mucosa cicatrizada relaciona-se às menores taxas de recidiva clínica, complicações, hospitalizações e necessidade de tratamento cirúrgico<sup>8-12</sup>. Assim, para uma prática clínica eficaz, torna-se necessário a disponibilidade de métodos que avaliem com segurança o grau de inflamação intestinal, pois reavaliações efetivas, objetivas e regulares do processo inflamatório são necessárias para direcionar a terapêutica<sup>3, 13</sup>.

A ileocolonoscopia com biópsias dos segmentos intestinais continua sendo o exame padrão para a avaliação da atividade inflamatória na DC. No entanto, apesar da grande utilidade dos exames endoscópicos, eles apresentam uma série de inconvenientes: são invasivos, têm custoelevado, apresentam riscos relacionados ao procedimento anestésico, possibilidade de sangramento e perfuração intestinal<sup>14, 15</sup>. Ademais, nem sempre é exame bem aceito pelos pacientes<sup>10</sup>.

O marcador ideal para avaliação da atividade inflamatória na DC deve ser pouco ou não invasivo, ter baixo custo, ampla disponibilização e boa acurácia<sup>15</sup>. Infelizmente, nenhum dos disponíveis possui todas estas qualidades; no entanto, alguns têm demonstrado ser de grande utilidade.

A proteína C reativa (PCR) altera-se na inflamação, infecção, dano tecidual, tem meia vida curta e é útil na avaliação seriada de processos inflamatórios. Além disso, é amplamente disponível, por ser teste sanguíneo facilmente realizado. Entretanto, é pouco específica, podendo elevar-se em qualquer processo inflamatório e infeccioso, não sendo exclusiva para os processos intestinais. Aproximadamente 15% da população não apresenta elevação desta proteína, mesmo em quadro inflamatório vigente<sup>16-18</sup>.

Marcadores fecais, como a calprotectina (fCal) e a lactoferrina, são proteínas dosadas nas fezes emostram-se úteis por apresentarem as seguintes características: não são invasivos,

não apresentam riscos aos pacientes, têm custo relativo baixo, apresentam grande especificidade para processos inflamatórios intestinais, além de terem boa correlação com o exame endoscópico, conforme demonstrado na literatura<sup>14, 18-21</sup>.

O emprego de dois exames em série pode criar um terceiro método de avaliação da atividade inflamatória, com sensibilidade e especificidade diferentes do uso isolado de cada um deles. Para a correta interpretação da avaliação em conjunto, considera-se positivo quando os dois exames avaliados apresentam resultados positivos, em contrapartida se algum deles mostrar-se negativo avalia-se como sendo negativo o resultado final. A utilidade da PCR e fCal no diagnóstico de atividade inflamatória na DC está bem estabelecida na literatura<sup>14, 18, 19, 22</sup>. No entanto, ainda existem dúvidas quanto os melhores valores de corte e qual é o real benefício da avaliação em série desses exames.

O estudo tem como objetivo definir os melhores valores de corte da fCal e PCR para diagnóstico da atividade inflamatória com os respectivos valores de sensibilidade e especificidade, utilizando como referência o Escore Endoscópico Simplificado da doença de Crohn (SES-CD). A partir desses valores propõem-se calcular a sensibilidade e especificidade do uso em série da fCal+PCR. Além de se idealizar alguns cenários clínicos hipotéticos de prevalência de inflamação para se avaliar o rendimento da fCal e PCR, utilizadas de forma separada e em série, bem como a proposição de um fluxograma de avaliação da atividade inflamatória.

## **6.2 Métodos:**

### **6.2.1 Participantes:**

Foram incluídos prospectivamente, entre novembro de 2011 e junho de 2016, 65 pacientes com idade igual ou superior a 18 anos e diagnóstico prévio de DC em atividade ou em remissão, com indicação para se submeter à colonoscopia. Tais pacientes foram selecionados a partir da clientela assistida no Ambulatório de Intestino ou internados na Enfermaria de Gastroenterologia do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (IAG-HC/UFMG). Dos 65 casos incluídos, 13 realizaram colonoscopia em duas ocasiões e em um paciente o exame foi repetido em três momentos diferentes do estudo, totalizando 80 procedimentos endoscópicos. Foram excluídos aqueles que apresentavam qualquer um dos seguintes

critérios: recusa em realizar a colonoscopia; preparo intestinal inadequado que impedisse a avaliação da mucosa; exame incompleto por dificuldade técnica; não envio de amostras de fezes para realização da dosagem da calprotectina; uso de anti-inflamatórios não esteroidais; diagnóstico de neoplasia colorretal maligna, presença de ostomia ou cirurgia de ileocolectomia prévia.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais sob o Parecer no. ETIC 0070.0.203.000-11.

### **6.2.2 Avaliação clínica e laboratorial:**

Os pacientes selecionados para o estudo, antes de encaminhados à colonoscopia e após assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram submetidos à entrevista e exame clínico completo pelo pesquisador. Nesta mesma ocasião foi realizada a dosagem sérica da PCR e dosagem de fCal. A determinação de calprotectina fecal foi realizada pelo método de ELISA, utilizando-se o kit comercial de reagentes (BÜHLMANN Laboratories AG®). Método este, que não permite a definição de valores inferiores a 30mcg/g ou superiores a 1800 mcg/g. Assim, para efeito da análise estatística, estes valores foram atribuídos aos os pacientes que apresentam dosagem  $\leq 30$ mcg/g ou  $\geq 1800$ mcg/g, respectivamente.

### **6.2.3 Avaliação endoscópica:**

Os exames colonoscópicos foram realizados por um único endoscopista, experiente na aplicação de escores endoscópicos, com aparelho de alta definição da Fujifilm (Fujifilm Co, Japão), que desconhecia a avaliação clínica da atividade inflamatória da DC, resultados dos exames de fCal e PCR. Para a quantificação da atividade inflamatória endoscópica foi utilizado o Escore Endoscópico Simplificado da DC (SES-CD) e definido como remissão aqueles com pontuação entre 0 e 2 e atividade aqueles com SES-CD  $\geq 3$ , conforme proposto pela Organização Internacional de Doenças Inflamatórias Intestinais<sup>23</sup> e por Koutroumpakis<sup>24</sup>.

### **6.2.4 Análise Estatística:**

Um tamanho amostral de pelo menos 77 pacientes, sendo 51 desses em atividade inflamatória, obteria 81% de poder para detectar uma sensibilidade variando de 74 a 89% no diagnóstico de atividade inflamatória da DC pela calprotectina fecal. Para esse cálculo utilizou-se o teste binomial bilateral, com nível de significância de 0,05 e prevalência da

atividade inflamatória da DC de 0,66. Os cálculos foram realizados no software PASS 12. Esses intervalos de sensibilidade foram obtidos de uma metanálise que avaliou a especificidade e sensibilidade diagnóstica da fCal na DC.

As variáveis não possuem distribuição normal e os valores são apresentados em mediana, com a variação interquartil ( $P_{25} - P_{75}$ ). A análise de correlação dos marcadores não invasivos de atividade inflamatória com o escore endoscópico foi feita utilizando-se o teste não-paramétrico de Spearman. Para a análise de medianas dos dois grupos (pacientes em remissão versus paciente em atividade) utilizou-se o teste de Mann-Whitney. O teste exato de Fischer, qui-quadrado e teste Z foram utilizados para verificar associação de variáveis categóricas entre os grupos.

Os valores de corte da PCR e fCal foram obtidos por meio da curva ROC. Para a PCR, foi selecionado o valor de corte que apresentava a maior soma de sensibilidade e especificidade, correspondendo ao Índice de Youden. Para a fCal, além de apresentar Índice de Youden elevado, foi selecionado valor que privilegiasse a sensibilidade, por permitir o maior número de diagnóstico de atividade de doença. O uso da fCal e PCR em série, fCal+PCR, tem a sua sensibilidade e especificidade facilmente calculadas, conforme demonstrado a seguir:

Sensibilidade: sensibilidade da fCal x sensibilidade da PCR

Especificidade: (especificidade da fCal + especificidade da PCR) – (especificidade da fCal x especificidade da PCR)

Para avaliar o rendimento de cada um dos três exames (PCR, fCal e fCal+PCR) foram selecionadas a probabilidade de atividade clínica baixa (25%), intermediária (50%) e alta (75%). A definição desses valores de probabilidade clínica de atividade é baseado na apresentação clínica (diarreia, dor abdominal, perda de peso, anemia), no impacto da doença na vida do paciente e na história evolutiva da DC naquele indivíduo, conforme proposto por Peyrin-Biroulet<sup>25</sup>. Isso permite discutir a utilidade desses exames na prática clínica diária.

Após verificar a hipótese de associação entre a variável desfecho (SES-CD) e as possíveis variáveis explicativas (idade, sexo, localização, idade ao diagnóstico e comportamento da DC) por meio do teste qui-quadrado de Pearson, Mann-Whitney e teste exato de Fisher, concluiu-se que apenas a variável idade apresentou p valor inferior ao nível de

significância de 0,20. Como apenas a idade foi significativa na análise univariada, porém com p valor superior a 0,05, não há ajuste de modelo multivariado.

Para análise estatística, foi utilizado o programa SPSS, versão 18.

### **6.3 Resultados:**

#### **6.3.1 Características clínicas dos pacientes.**

Dos 65 pacientes incluídos com DC houve predomínio do gênero masculino (52,5%) e a idade mediana foi de 34 anos ( $P_{25}=25$  e  $P_{75}=44$ ). O perfil epidemiológico e fenotípico da DC, segundo a classificação de Montreal e as medicações utilizadas estão sumarizadas na Tabela 1.

**Tabela 1: Características clínicas dos pacientes com doença de Crohn**

	Remissão (n=27)	Atividade (n=53)	Valor p
Idade em anos (P <sub>25-75</sub> )	40 (29 – 50)	33 (24-42)	0,122*
Gênero			
Masculino – n (%)	11 (40,74)	31 (58,49)	0,934**
Feminino- n (%)	16 (59,26)	22 (41,51)	
	n (%)	n (%)	
Idade ao diagnóstico			
A <sub>1</sub> (≤16 anos)	3 (11,11)	5 (9,43)	0,271**
A <sub>2</sub> (17-40)	16 (59,26)	40 (75,47)	
A <sub>3</sub> (>40anos)	8 (29,63)	8 (15,10)	
Fenótipo da doença			
B <sub>1</sub>	5 (18,52)	15 (28,30)	0,534 §
B <sub>1p</sub>	5 (18,52)	15 (28,30)	
B <sub>2</sub>	8 (29,62)	14 (26,41)	
B <sub>2p</sub>	2 (7,41)	2 (3,78)	
B <sub>3</sub>	5 (18,52)	4 (7,54)	
B <sub>3p</sub>	2 (7,41)	3 (5,67)	
Localização da doença			
L <sub>1</sub>	10 (37,04)	15 (28,30)	0,453 §
L <sub>2</sub>	4 (14,81)	12 (22,64)	
L <sub>3</sub>	11 (40,74)	25 (47,17)	
L <sub>1+ L4</sub>	2 (7,41)	1 (1,89)	
Medicação			
5-ASA	14 (51,85)	26 (49,10)	0,813 ¢
Tiopurinas	19 (70,40)	34 (64,20)	0,571 ¢
Anti-TNF	6 (22,22)	11 (20,80)	0,880 ¢
Antibióticos	4 (14,81)	11 (20,80)	0,763 ¢
Prednisona	9 (33,33)	26 (49,10)	0,167 ¢
Metotrexate	0 (0)	1 (1,90)	1,00 ¢
Tracolimus	0 (0)	1 (1,90)	1,00 ¢

\*: Teste de Mann-Whitney; \*\* Teste de Qui-quadrado; §: Teste de Fischer; ¢: Teste Z

P<sub>25</sub>: percentil 25; P<sub>75</sub>: percentil 75; Valores de idade expressos em mediana.

Idade ao diagnóstico: A1: antes dos 16 anos de idade; A2: entre 17 e 40 anos de idade; A3: após 40 anos de idade. Localização: L1: íleo terminal; L2: cólon; L3: íleo-colônico; L4: trato gastrointestinal superior. Comportamento: B1: inflamatório; B2: estenosante; B3: penetrante; p=perianal; Anti-TNF (infliximabe, adalimumabe); Antibióticos ( metronidazol, ciprofloxacino)

### 6.3.2 Correlação entre índice de atividade endoscópica e a PCR e fCal:

Ao se comparar o SES-CD das 80 colonoscopias com a PCR ( $r=0,525$ ) e fCal ( $r=0,450$ ), a correlação mostrou-se moderada (correlação de Spearman) e com significância estatística ( $p<0,001$ ).

A PCR e fCal foram avaliadas quanto à capacidade de diagnosticar atividade inflamatória. Realizou-se a comparação dos valores das medianas desses marcadores nos pacientes em remissão endoscópica ( $SES-CD = 0-2$ ) e aqueles em atividade ( $SES-CD \geq 3$ ), (Tabela 2). Observa-se que ambos foram capazes de diferenciar a remissão da atividade endoscópica.

**Tabela 2 – Valores das medianas da Proteína C Reativa (PCR) e Calprotectina fecal (fCal) de pacientes em remissão ( $SES-CD = 0-2$ ) e atividade endoscópica ( $SES-CD \geq 3$ ).**

	Remissão endoscópica (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> )	Atividade endoscópica (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> )	Valor p
PCR (mg/L)	5,0 (5,0-11,02)	16,64 (5,9-32,07)	<0,001
fCal (mcg/g)	236,6 (90,7- 810,5)	1020,1 (386,95 - 1800)	<0,001

P<sub>25</sub>: percentil 25; P<sub>75</sub>: percentil 75; Valores de idade expressos em mediana.

### 6.3.3 Determinação de valores de corte para PCR e fCal:

Os valores de acurácia para diagnóstico de atividade inflamatória da PCR e fCal foram obtidos utilizando-se a área sob a curva ROC (Tabela 3).

**Tabela 3: Acurácia da Proteína C Reativa (PCR) e Calprotectina Fecal (fcal).**

	Área Sob a Curva (ROC)	IC 95%	Valor p
PCR	0,75	0,64-0,86	<0,001
fCal	0,77	0,66-0,88	<0,001

IC 95%: Intervalo de confiança de 95%.

Para a PCR, o valor de 6,7mg/L apresentou o melhor Índice de Youden e, para a fCal, o valor de 155mcg/g privilegia a sensibilidade, permitindo o diagnóstico da quase

totalidade dos pacientes com DC em atividade na amostra estudada. A partir desses valores, foi calculada a sensibilidade e a especificidade do teste em série fCal+PCR (Tabela 4). Nota-se que a avaliação em conjunto desses dois marcadores mostrou sensibilidade mais baixa e especificidade mais elevada, quando comparada aos dois exames isoladamente.

**Tabela 4: Sensibilidade (Sens) e especificidade (Espec) dos exames avaliados isoladamente e em conjunto.**

	Sensibilidade	IC 95%	Especificidade	IC 95%
PCR $\geq$ 6,7mg/L	0,75	0,64-0,85	0,67	0,51-0,83
fCal $\geq$ 155 mcg/g	0,96	0,91-1,0	0,44	0,27-0,61
fCal+PCR	0,72	0,61-0,83	0,82	0,68-0,95

PCR: Proteína C reativa. fCal: Calprotectina fecal. fCal + PCR: teste em série de fCal e PCR.

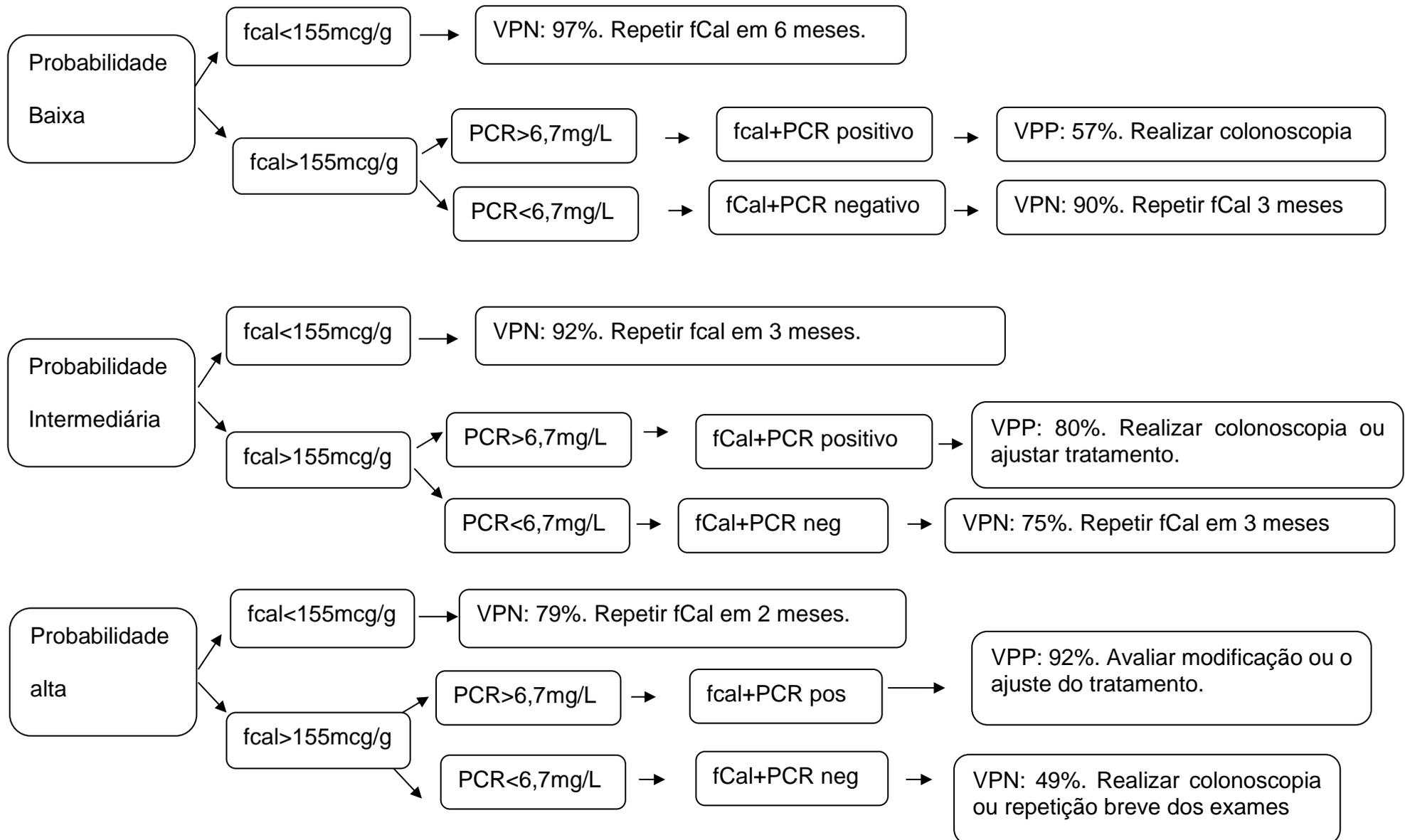
Na avaliação hipotética de três cenários representados pela baixa probabilidade de atividade inflamatória da doença, probabilidade pré-teste de 25%; intermediária, probabilidade pré-teste de 50% e alta probabilidade de atividade, isto é probabilidade pré-teste de 75% foi possível calcular os valores preditivos, positivo e negativo, bem como a acurácia de cada um desses marcadores, nos diferentes cenários (Tabela 5). A partir desses valores, considerou-se um fluxograma de acompanhamento dos pacientes com DC conforme demonstrado na Figura 1.

**Tabela 5 – Cenários hipotéticos de atividade da doença de Crohn e respectivos valores preditivos positivo, negativo e acurácia, com os intervalos de confiança de 95% de cada um dos exames**

Probabilidade pré-teste	fCal			PCR			fCal+PCR		
	VPP (IC95%)	VPN (IC95%)	A (IC95%)	VPP (IC95%)	VPN (IC95%)	A (IC95%)	VPP (IC95%)	VPN (IC95%)	A (IC95%)
Baixa: 25%	0,37 (0,25-0,48)	0,97 (0,92-1,00)	0,57 (0,48-0,67)	0,43 (0,28-0,58)	0,89 (0,81-0,97)	0,69 (0,60-0,78)	0,57 (0,40-0,74)	0,90 (0,83-0,97)	0,79 (0,71-0,87)
Intermediária: 50%	0,63 (0,53-0,74)	0,92 (0,81-1,00)	0,70 (0,61-0,79)	0,69 (0,57-0,82)	0,73 (0,60-0,86)	0,71 (0,62-0,80)	0,80 (0,68-0,91)	0,75 (0,63-0,86)	0,77 (0,69-0,85)
Alta: 75%	0,84 (0,76-0,92)	0,79 (0,58 – 1,00)	0,83 (0,76-0,91)	0,87 (0,79-0,95)	0,47 (0,31-0,64)	0,73 (0,64-0,82)	0,92 (0,85-0,99)	0,49 (0,34-0,64)	0,74 (0,66-0,83)

VPP: Valor preditivo positivo; VPN: Valor Preditivo Negativo. A: acurácia. IC 9%5: Intervalo de confiança de 95%.  
PCR: Proteína C reativa. fCal: Calprotectina fecal. fCal + PCR: teste em série de fCal e PCR.

Figura 1: Fluxograma de acompanhamento dos pacientes com doença de Crohn a partir da probabilidade clínica de atividade da doença:



VPP: Valor preditivo positivo; VPN: Valor Preditivo Negativo. PCR: Proteína C reativa. fCal: Calprotectina fecal. fCal + PCR: teste em série de fCal e PCR.

#### 6.4 Discussão:

O diagnóstico e o acompanhamento de pacientes com doença inflamatória intestinal é frequentemente complexo e requer a combinação de aspectos clínicos, laboratoriais, endoscópicos, histopatológicos e radiológicos<sup>1,2</sup>. O reconhecimento dos períodos de atividade inflamatória, em especial na DC, é frequentemente subestimado ou tardio devido à falta de especificidade ou à invasividade dos métodos disponíveis<sup>13,16,17,26</sup>. A existência de exames não invasivos que, de forma isolada ou combinada, permitam o diagnóstico da atividade inflamatória da DC é altamente desejável na prática clínica<sup>18</sup>.

A avaliação da mucosa intestinal por colonoscopia continua sendo o exame padrão para o diagnóstico de atividade inflamatória na DC. A cicatrização da mucosa é o objetivo terapêutico, por determinar melhor prognóstico e menor índice de complicações<sup>3,12</sup>. No entanto, por tratar-se de exame invasivo, disponibilidade restrita e elevado custo, tem-se a necessidade de encontrar marcadores com acurácia diagnóstica e que sejam não invasivos e amplamente disponíveis<sup>15</sup>. Na casuística estudada, a PCR e fCal apresentaram correlação moderada com o SES-CD ( $r=0,525$  e  $r=0,450$ , respectivamente). Resultados semelhantes foram descritos por Sipponen et al, que ao avaliarem 87 pacientes com DC encontraram os seguintes valores de correlação com o SES-CD para a fCal ( $r=0,662$ ) e PCR ( $r=0,522$ )<sup>19</sup>. Outros estudos, como o realizado por Schoepfer et al<sup>14</sup>, Lobatón et al<sup>27</sup> e Lin et al<sup>28</sup> vieram posteriormente, corroborar estes achados.

A fCal e a PCR usadas de forma isoladas para diagnóstico da atividade inflamatória na DC é objeto de estudo de vários trabalhos, com valores de sensibilidade e especificidade também diversos, variando com os pontos de corte selecionados<sup>14,18,19,27-30</sup>. Na casuística estudada, valores de fCal foram significativamente diferentes entre pacientes em remissão e atividade endoscópica (236,6 mcg/g e 1020,1mcg/g, respectivamente;  $p<0,001$ ). O mesmo foi observado para a PCR (remissão: 5,0mg/L e atividade inflamatória: 16,7mg/L;  $p<0,001$ ). Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores<sup>14,19,28,31</sup>.

A análise da área sob a curva ROC mostrou a boa acurácia diagnóstica da fCal (0,77; IC 95%: 0,66-0,88,  $p<0,001$ ) e da PCR (0,75; IC 95%: 0,64-0,86;  $p<0,001$ ). Pontos de corte de PCR e fCal foram obtidos a partir da curva ROC. O valor de PCR de 6,7mg/L apresenta o maior Índice de Youden. Para a fCal, além de elevado Índice de Youden, o valor de 155mc/g apresenta alta sensibilidade para detecção da atividade inflamatória, permitindo detectar a quase totalidade

dos pacientes com inflamação intestinal. Em metanálise recente, foram incluídos estudos com variados valores de corte para detecção da atividade inflamatória na DC, tanto para fCal (variando de 50 a 280mcg/g) quanto para PCR (variando entre e 5 e 10mg/L), em concordância com os valores encontrados na casuística estudada<sup>18</sup>.

Com o objetivo de aumentar a capacidade diagnóstica dos exames não-invasivos na monitorização da atividade da DC e consequente melhoria e adequação do tratamento, alguns autores avaliaram a utilidade do uso conjunto desses marcadores. Langhorst et al propôs a combinação de marcadores fecais (calprotectina e lactoferrina), sérico (PCR) e clínico (Índice de Atividade da Doença de Crohn - IADC), sendo considerado positivo quando pelo menos dois desses três marcadores estivessem presentes. No entanto, não houve aumento na acurácia diagnóstica quando comparado com o uso isolado da fCal em pacientes com DC naquela casuística<sup>32</sup>. Posteriormente, Bjorkesten et al, analisaram a eficácia da combinação de PCR, fCal, IADC e Índice de Harvey-Bradshaw (IHB) na detecção da atividade inflamatória. Os autores verificaram que o uso do IHB e fCal de maneira concomitante foi superior a qualquer outro índice utilizado de forma isolada ou combinada, com acurácia diagnóstica de 88%<sup>33</sup>. Recentemente, Bodelier et al utilizaram a PCR e/ou o IHB para diagnosticar atividade inflamatória na DC, quando a fCal não estivesse positiva. Naquele estudo, houve aumento da sensibilidade e o escore combinado foi especialmente útil entre os pacientes com valores intermediários de fCal (entre 100 e 250mcg/g)<sup>34</sup>.

O uso em série da fCal e PCR, nessa casuística, apresentou uma boa especificidade (82%). Isso é especialmente útil, uma vez que os dois marcadores quando usados de forma isolada apresentam maior sensibilidade frente à especificidade. Assim, de acordo com a probabilidade clínica de atividade da DC, o uso desses exames de maneira combinada permite a melhor definição diagnóstica.

Para exemplificar a eficácia desses exames, três cenários clínicos foram estabelecidos, da mesma forma que proposto por Mosli et al<sup>18</sup>. O paciente de baixo risco (probabilidade pré-teste de 25%), isto é, aquele com a doença estável, sem recidivas da inflamação, com boa evolução e que raramente apresenta desconforto abdominal e/ou aumento na frequência evacuatória, sem comprometer a qualidade de vida de forma significativa, caso apresente fCal inferior a 155mcg/g tem probabilidade de 97% de não estar em atividade inflamatória, não necessitando de investigação adicional. A mesma conduta pode ser adotada no caso de fCal positiva e PCR negativa, tal cenário reflete, na análise em série desses dois exames, uma probabilidade de 90%

de não haver atividade endoscópica. Por outro lado, se ambos os exames estiverem positivos deve ser considerada a possibilidade de realizar colonoscopia.

Para os pacientes com sinais evidentes de atividade de doença, com diarreia, perda de peso, dor abdominal, impacto na qualidade de vida, além de história de recidivas inflamatórias frequentes, quando a fCal e a PCR estiverem positivas a probabilidade de haver realmente inflamação é de 92%, permitindo a adequação do tratamento mesmo sem a realização do exame endoscópico. Por outro lado, se a fCal estiver negativa a probabilidade de não haver inflamação é de 79%. Se a fCal estiver positiva e a PCR negativa a probabilidade de não haver inflamação é de apenas 49%, não se permitindo afastar atividade, devendo ser realizada colonoscopia ou repetição breve dos exames.

No cenário intermediário entre os descritos acima, em que há dúvida sobre atividade inflamatória, quando estimamos a probabilidade de doença ativa em 50%, se a fCal estiver negativa a probabilidade é de 92% de não haver inflamação. Se esse exame estiver positivo e a PCR negativa, a probabilidade de não haver inflamação é de 75%, devendo repetir os exames brevemente. Se ambos estiverem positivos a probabilidade de haver inflamação é de 80% e a confirmação por colonoscopia é desejável.

Este estudo tem várias potenciais limitações. A primeira foi a opção de não realizarmos aferições seriadas de calprotectina, que poderia aumentar a acurácia desse exame. Entretanto essa também foi uma estratégia adotada por outros autores em diferentes estudos. Segundo, foi utilizado apenas um kit de calprotectina, que, embora já validado, não permite extrapolação para outros métodos de dosagem desse marcador. Terceiro, não foi realizado o estudo do intestino delgado através de enterografia, que poderia permitir conclusões mais fidedignas sobre a atividade inflamatória. Entretanto, todos os pacientes incluídos nesse trabalho tinham acometimento ileal ou ileocolônico, permitindo inferir que a ileocolonosopia pode ser usada para diagnóstico de atividade inflamatória. Por fim, o número de pacientes no grupo em remissão endoscópica, embora tenha sido estimado previamente ao início do estudo, foi responsável pelos grandes intervalos de confiança encontrados nos valores de especificidade.

O estudo permite concluir que o uso da fCal e PCR são úteis na diferenciação dos pacientes em remissão daqueles em atividade, sendo exames com boa acurácia para diagnóstico da inflamação na DC. Além disso, a análise conjunta desses exames, quando realizados em série,

permite a tomada de decisão com grande grau de certeza, inclusive dispensando a realização de colonoscopia em muitas situações. A realização de trabalhos que avaliem a eficácia do fluxograma proposto é desejável.

## 6.5 Referências Bibliográficas

1. Baumgart, D. C.; Sandborn, W. J., Crohn's disease. *Lancet* **2012**,*380* (9853), 1590-605.
2. Gomollon, F.; Dignass, A.; Annese, V.; Tilg, H.; Van Assche, G.; Lindsay, J. O.; Peyrin-Biroulet, L.; Cullen, G. J.; Daperno, M.; Kucharzik, T.; Rieder, F.; Almer, S.; Armuzzi, A.; Harbord, M.; Langhorst, J.; Sans, M.; Chowers, Y.; Fiorino, G.; Juillerat, P.; Mantzaris, G. J.; Rizzello, F.; Vavricka, S.; Gionchetti, P., 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management. *J Crohns Colitis* **2017**,*11* (1), 3-25.
3. Bouguen, G.; Levesque, B. G.; Feagan, B. G.; Kavanaugh, A.; Peyrin-Biroulet, L.; Colombel, J. F.; Hanauer, S. B.; Sandborn, W. J., Treat to target: a proposed new paradigm for the management of Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* **2015**,*13* (6), 1042-50.e2.
4. Fernandes, C.; Allocca, M.; Danese, S.; Fiorino, G., Progress with anti-tumor necrosis factor therapeutics for the treatment of inflammatory bowel disease. *Immunotherapy* **2015**,*7* (2), 175-90.
5. Peyrin-Biroulet, L.; Ferrante, M.; Magro, F.; Campbell, S.; Franchimont, D.; Fidder, H.; Strid, H.; Ardizzone, S.; Veereman-Wauters, G.; Chevaux, J. B.; Allez, M.; Danese, S.; Sturm, A., Results from the 2nd Scientific Workshop of the ECCO. I: Impact of mucosal healing on the course of inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* **2011**,*5* (5), 477-83.
6. Neurath, M. F.; Travis, S. P., Mucosal healing in inflammatory bowel diseases: a systematic review. *Gut* **2012**,*61* (11), 1619-35.
7. Shah, S. C.; Colombel, J. F.; Sands, B. E.; Narula, N., Systematic review with meta-analysis: mucosal healing is associated with improved long-term outcomes in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* **2016**,*43* (3), 317-33.
8. Colombel, J. F.; Narula, N.; Peyrin-Biroulet, L., Management Strategies to Improve Outcomes of Patients With Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* **2017**,*152* (2), 351-361.e5.
9. Khanna, R.; Bressler, B.; Levesque, B. G.; Zou, G.; Stitt, L. W.; Greenberg, G. R.; Panaccione, R.; Bitton, A.; Pare, P.; Vermeire, S.; D'Haens, G.; MacIntosh, D.; Sandborn, W. J.; Donner, A.; Vandervoort, M. K.; Morris, J. C.; Feagan, B. G., Early combined immunosuppression for the management of Crohn's disease (REACT): a cluster randomised controlled trial. *Lancet* **2015**,*386* (10006), 1825-34.
10. Benitez, J. M.; Meuwis, M. A.; Reenaers, C.; Van Kemseke, C.; Meunier, P.; Louis, E., Role of endoscopy, cross-sectional imaging and biomarkers in Crohn's disease monitoring. *Gut* **2013**,*62* (12), 1806-16.

11. Gionchetti, P.; Dignass, A.; Danese, S.; Magro Dias, F. J.; Rogler, G.; Lakatos, P. L.; Adamina, M.; Ardizzone, S.; Buskens, C. J.; Sebastian, S.; Laureti, S.; Sampietro, G. M.; Vucelic, B.; van der Woude, C. J.; Barreiro-de Acosta, M.; Maaser, C.; Portela, F.; Vavricka, S. R.; Gomollon, F., 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 2: Surgical Management and Special Situations. *J Crohns Colitis* **2017**, *11* (2), 135-149.
12. Sandborn, W. J.; Hanauer, S.; Van Assche, G.; Panes, J.; Wilson, S.; Petersson, J.; Panaccione, R., Treating beyond symptoms with a view to improving patient outcomes in inflammatory bowel diseases. *J Crohns Colitis* **2014**, *8* (9), 927-35.
13. Sauter, B.; Beglinger, C.; Girardin, M.; Macpherson, A.; Michetti, P.; Schoepfer, A.; Seibold, F.; Vavricka, S. R.; Rogler, G., Monitoring disease activity and progression in Crohn's disease. A Swiss perspective on the IBD ahead 'optimised monitoring' recommendations. *Digestion* **2014**, *89* (4), 299-309.
14. Schoepfer, A. M.; Beglinger, C.; Straumann, A.; Trummler, M.; Vavricka, S. R.; Bruegger, L. E.; 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. *Am J Gastroenterol* **2010**, *105* (1), 162-9.
15. Ikhtaire, S.; Shajib, M. S.; Reinisch, W.; Khan, W. I., Fecal calprotectin: its scope and utility in the management of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* **2016**, *51* (5), 434-46.
16. D'Inca, R.; Caccaro, R., Measuring disease activity in Crohn's disease: what is currently available to the clinician. *Clin Exp Gastroenterol* **2014**, *7*, 151-61.
17. Papay, P.; Ignjatovic, A.; Karmiris, K.; Amarante, H.; Milheller, P.; Feagan, B.; D'Haens, G.; Marteau, P.; Reinisch, W.; Sturm, A.; Steinwurz, F.; Egan, L.; Panes, J.; Louis, E.; Colombel, J. F.; Panaccione, R., Optimising monitoring in the management of Crohn's disease: a physician's perspective. *J Crohns Colitis* **2013**, *7* (8), 653-69.
18. Mosli, M. H.; Zou, G.; Garg, S. K.; Feagan, S. G.; MacDonald, J. K.; Chande, N.; Sandborn, W. J.; Feagan, B. G., C-Reactive Protein, Fecal Calprotectin, and Stool Lactoferrin for Detection of Endoscopic Activity in Symptomatic Inflammatory Bowel Disease Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Gastroenterol* **2015**, *110* (6), 802-19; quiz 820.
19. Sipponen, T.; Karkkainen, P.; Savilahti, E.; Kolho, K. L.; Nuutinen, H.; Turunen, U.; Farkkila, M., Correlation of faecal calprotectin and lactoferrin with an endoscopic score for Crohn's disease and histological findings. *Aliment Pharmacol Ther* **2008**, *28* (10), 1221-9.
20. 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. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **2016**, *28* (10), 1137-44.

21. Kopylov, U.; Rosenfeld, G.; Bressler, B.; Seidman, E., Clinical utility of fecal biomarkers for the diagnosis and management of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* **2014**,*20* (4), 742-56.
22. Sands, B. E., Biomarkers of Inflammation in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* **2015**,*149* (5), 1275-1285.e2.
23. Vuitton, L.; Marteau, P.; Sandborn, W. J.; Levesque, B. G.; Feagan, B.; Vermeire, S.; Danese, S.; D'Haens, G.; Lowenberg, M.; Khanna, R.; Fiorino, G.; Travis, S.; Mary, J. Y.; Peyrin-Biroulet, L., IOIBD technical review on endoscopic indices for Crohn's disease clinical trials. *Gut* **2016**,*65* (9), 1447-55.
24. Koutroumpakis, E.; Katsanos, K. H., Implementation of the simple endoscopic activity score in crohn's disease. *Saudi J Gastroenterol* **2016**,*22* (3), 183-91.
25. Peyrin-Biroulet, L.; Panes, J.; Sandborn, W. J.; Vermeire, S.; Danese, S.; Feagan, B. G.; Colombel, J. F.; Hanauer, S. B.; Rycroft, B., Defining Disease Severity in Inflammatory Bowel Diseases: Current and Future Directions. *Clin Gastroenterol Hepatol* **2016**,*14* (3), 348-354.e17.
26. Falvey, J. D.; Hoskin, T.; Meijer, B.; Ashcroft, A.; Walmsley, R.; Day, A. S.; Geary, R. B., Disease activity assessment in IBD: clinical indices and biomarkers fail to predict endoscopic remission. *Inflamm Bowel Dis* **2015**,*21* (4), 824-31.
27. Lobaton, T.; Lopez-Garcia, A.; Rodriguez-Moranta, F.; Ruiz, A.; Rodriguez, L.; Guardiola, J., A new rapid test for fecal calprotectin predicts endoscopic remission and postoperative recurrence in Crohn's disease. *J Crohns Colitis* **2013**.
28. Lin, W. C.; Wong, J. M.; Tung, C. C.; Lin, C. P.; Chou, J. W.; Wang, H. Y.; Shieh, M. J.; Chang, C. H.; Liu, H. H.; Wei, S. C., Fecal calprotectin correlated with endoscopic remission for Asian inflammatory bowel disease patients. *World J Gastroenterol* **2015**,*21* (48), 13566-73.
29. Walsham, N. E.; Sherwood, R. A., Fecal calprotectin in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Gastroenterol* **2016**,*9*, 21-9.
30. Chang, S.; Malter, L.; Hudesman, D., Disease monitoring in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **2015**,*21* (40), 11246-59.
31. Wright, E. K., Calprotectin or Lactoferrin: Do They Help. *Dig Dis* **2016**,*34* (1-2), 98-104.
32. Langhorst, J.; Elsenbruch, S.; Koelzer, J.; Rueffer, A.; Michalsen, A.; Dobos, G. J., Noninvasive markers in the assessment of intestinal inflammation in inflammatory bowel diseases: performance of fecal lactoferrin, calprotectin, and PMN-elastase, CRP, and clinical indices. *Am J Gastroenterol* **2008**,*103* (1), 162-9.
33. af Bjorkesten, C. G.; Nieminen, U.; Turunen, U.; Arkkila, P.; Sipponen, T.; Farkkila, M., Surrogate markers and clinical indices, alone or combined, as indicators

for endoscopic remission in anti-TNF-treated luminal Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* **2012**,*47* (5), 528-37.

34. Bodelier, A. G.; Jonkers, D.; van den Heuvel, T.; de Boer, E.; Hameeteman, W.; Masclee, A. A.; Pierik, M. J., High Percentage of IBD Patients with Indefinite Fecal Calprotectin Levels: Additional Value of a Combination Score. *Dig Dis Sci* **2017**,*62* (2), 465-472.

**7. ANEXOS:**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

**Parecer nº. ETIC 0070.0.203.000-11**

**Interessado(a): Prof. Aloísio Sales da Cunha  
Departamento de Clínica Médica  
Faculdade de Medicina - UFMG**

---

**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 03 de junho de 2011, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Avaliação dos efeitos da suplementação nutricional com e sem TGB-B2 sobre o estado nutricional, permeabilidade intestinal e parâmetros inflamatórios em pacientes com doença de Crohn em atividade"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Maria Teresa Marques Amaral', is written over a horizontal line.

**Profª. Maria Teresa Marques Amaral  
Coordenadora do COEP-UFMG**

Manuscripts submitted to Journal of Crohn's and Colitis



**Correlation of fecal calprotectin, clinical and serology inflammatory activity markers with different degrees of endoscopic activity, evaluated through simple endoscopic score for Chron's disease (SES-CD)**

Journal:	<i>Journal of Crohn's and Colitis</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	PENNA, FRANCISCO; Hospital das Clinicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto Alfa de Gastroenterologia; Instituto de Previdencia dos Servidores do Estado de Minas Gerais, Rosa, Rodrigo ; Hospital das Clinicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto Alfa de Gastroenterologia Cunha, Pedro; Universidade Federal de Minas Gerais Faculdade de Medicina, Clínica Médica Souza, Stella; Universidade Federal de Minas Gerais Faculdade de Medicina, Clínica Médica Ferrari, Maria de Lourdes; Universidade Federal de Minas Gerais Faculdade de Medicina, Internal Medicine
Subject:	Biomarkers, Endoscopy
Classifications:	Endoscopy, Biomarkers

SCHOLARONE™  
Manuscripts

<https://mc.manuscriptcentral.com/ecco-jcc>

---

[Home](#)[Author](#)[Review](#)

## Submission Confirmation

[Print](#)

Thank you for your submission

**Submitted to**

Journal of Crohn's and Colitis

**Manuscript ID**

ECCO-JCC-2017-0701

**Title**

Correlation of fecal calprotectin, clinical and serology inflammatory activity markers with different degrees of endoscopic activity, evaluated through simple endoscopic score for Chron's disease (SES-CD)

**Authors**

PENNA, FRANCISCO

Rosa, Rodrigo

Cunha, Pedro

Souza, Stella

Ferrari, Maria de Lourdes

**Date Submitted**

19-Sep-2017

---

---

[Author Dashboard](#)